



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

FLÁVIA DEBIAGI

**APROVEITAMENTO DE RESÍDUOS LIGNOCELULÓSICOS
DA AGROINDÚSTRIA PELA COMBINAÇÃO DE
PROCESSOS FÍSICOS E QUÍMICOS**

Londrina
2017

FLÁVIA DEBIAGI

**APROVEITAMENTO DE RESÍDUOS LIGNOCELULÓSICOS
DA AGROINDÚSTRIA PELA COMBINAÇÃO DE
PROCESSOS FÍSICOS E QUÍMICOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Biotecnologia do Departamento de Bioquímica e Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Orientadora: Profa.Dra.Suzana Mali de Oliveira

Londrina
2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Debiagi, Flávia.

Aproveitamento de resíduos lignocelulósicos da agroindústria pela combinação de processos físicos e químicos / Flávia Debiagi. - Londrina, 2017.
129 f. : il.

Orientador: Suzana Mali de Oliveira.

Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2017.
Inclui bibliografia.

1. Resíduos lignocelulósicos agroindustriais - Tese. 2. Celulose nanofibrilada - Tese. 3. Açúcares fermentescíveis - Tese. 4. Extrusão reativa - Tese. I. Mali de Oliveira, Suzana. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. III. Título.

FLÁVIA DEBIAGI

**APROVEITAMENTO DE RESÍDUOS LIGNOCELULÓSICOS DA
AGROINDÚSTRIA PELA COMBINAÇÃO DE PROCESSOS FÍSICOS E
QUÍMICOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Biotecnologia do Departamento de Bioquímica e Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora Profa. Dra. Suzana Mali de Oliveira
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Gizilene Maria de Carvalho
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Maria Victória Eiras Grossmann
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Paula Cristina de Sousa Faria-
Tischer
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Thais de Souza Rocha
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 13 de dezembro de 2017.

DEDICO

Dedico essa tese a minha mãe Tereza Lordani, minha Rainha, meu grande amor, mestre e incentivadora da minha vida, e a minha insubstituível irmã, Renata.

Dedico essa tese ao meu esposo Eduardo Fassina, meu amor e companheiro.

Dedico á minha prima Maria Amélia, meu anjo no céu.

Dedico aos meu avôs Amélia Lordani e José Lordani (*in memoria*), meus exemplos de carinho e fé.

Dedico essa tese a minha orientadora Suzana Mali de Oliveira, exemplo de mestre, amiga e ser humano.

AGRADECIMENTOS

À Deus, meu refúgio e força, onde sempre encontrei respostas para os meus problemas.

À minha orientadora Profa. Dra. Suzana Mali de Oliveira, pela forma amiga como conduziu esse trabalho, por estar sempre disposta a me ajudar, por confiar em mim durante esses anos de convivência, por não me deixar desistir, por despertar em mim o interesse pela pesquisa e pela profissão acadêmica. Por estar sempre pronta a escutar e a ensinar, por me estimular a ir atrás dos meus objetivos, enfim por vencer os desafios ao meu lado. Serei sempre grata a você.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior) pela bolsa concedida durante os quatro anos de doutorado.

A UEL (universidade Estadual de Londrina) e aos docentes do programa de pós graduação em bioquímica e biotecnologia, pelo apoio e ensinamentos.

A professora Dra Maria Victória Eiras Grossmann , ao professor Dr Fabio Yamashita ao técnico Nelson Fuzinato, e a pós-doutoranda Ana Paula Bilck, pela concessão da extrusora empregada neste trabalho e auxílio durante o processo.

A Prof. Dra Renata Katsuko Takayama Kobayashi e a querida doutoranda (e amiga) Sara do laboratório de microbiologia da UEL, pelo auxílio com as análises de microbiologia.

A Prof Dra. Paula C.S. Faria-Tisher pelo auxílio com as análise de AFM e TGA.

A professora Dra Suzana Nixdorf e ao doutorando Thiago pelo auxílio e apoio com as análises de HPLC.

Aos estagiários Renan, Gabriela e Ana Clara, pelo carinho, amizade e acima de tudo pelo grande esforço e comprometimento para a realização deste trabalho.

Aos funcionários do Departamento de Bioquímica e Biotecnologia (CCE/UEL): Nelson Janeiro Rodriguez, Sérgio Nascimento Evangelista, Sandra Aparecida Defende e Elda pela amizade, colaboração e auxílio.

A minha linda família, em especial minha mãe (Tereza), minha irmã (Renata), minha avó (Amélia), meu esposo (Eduardo), minha pequena Malu, minha segunda família (sogros, cunhadas (os) e sobrinhos) e a minha terapeuta Adail. Obrigado por estarem sempre do meu lado comemorando minhas vitórias e/ou enxugando minhas lágrimas, sem vocês não chegaria até aqui. Aos meus anjos no céu (vó Zé e prima-irmã Maria), vocês nos deixaram durante esse período, comemoram comigo o início de tudo, tenho certeza que estão felizes com essa conquista, a saudade é imensa. Foram longos 3 anos e agora essa vitória é nossa.

Enfim a todos os professores, amigos e familiares que colaboraram direta ou indiretamente pela realização desse trabalho, MUITO OBRIGADA QUE DEUS CONTINUE ILUMINANDO A VIDA DE VOCÊS!!

*Para realizar grandes conquistas, devemos
não apenas agir, mas também sonhar; não
apenas planejar, mas também acreditar.
Anatole France*

DEBIAGI, Flávia. **Aproveitamento de resíduos lignocelulósicos da agroindústria pela combinação de processos físicos e químicos.** 2017. 129 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo geral promover o aproveitamento de resíduos da agroindústria (casca de soja, casca de aveia e farelo de trigo) empregando-se a combinação de processos físicos e químicos, visando a produção de celulose nanofibrilada via extrusão reativa, assim como, o estudo do emprego da explosão a vapor e ultrassonicação como processos de pré-tratamento dos resíduos com vistas à extração de açúcares fermentescíveis. Para a produção de celulose nanofibrilada (NFC), a casca de aveia (OH) e a casca de soja (SH) foram submetidas ao processo de extrusão reativa, combinada ou não ao branqueamento com ácido peracético. Posteriormente, a casca de aveia *in natura* e a NFC obtida da OH foram impregnadas com nanopartículas de prata biológicas (bio-NPAg) e avaliou-se a sua atividade antibacteriana frente à bactéria *Escherichia Coli*. Para OH e SH, o emprego da extrusão reativa combinada ou não ao branqueamento resultaram em NFC com diâmetros na escala nanométrica e comprimento de vários micrômetros. Independente do resíduo, as amostras de NFC produzidas nesse trabalho apresentaram elevados teores de celulose (> 87 %), maior cristalinidade e estabilidade térmica que os resíduos *in natura*. Além disso, foi possível observar que as suspensões de NFC obtidas a partir da OH e SH apresentaram-se estáveis e sem a presença de sedimentação quando estocadas em temperatura ambiente por 24 h. Entretanto, somente quando empregada a OH foi possível observar a presença de um material homogêneo, formado apenas de NFC. Apenas a casca de aveia *in natura* impregnada com bio-NPAg apresentou atividade antimicrobiana frente a bactéria *E.coli*. Para o estudo do pré-tratamento dos resíduos, a casca de aveia (OH) e farelo de trigo (WB) foram submetidos ao processo de explosão a vapor ou ultrassonicação, combinados a diferentes reagentes (H₂SO₄, NaOH ou água destilada). Em relação ao pré-tratamento dos resíduos, o processo mais efetivo foi o que empregou a explosão a vapor na presença de H₂SO₄, tanto para WB quanto para OH. Além disso, observou-se um aumento no conteúdo de celulose e decréscimo no de lignina e hemiceluloses para ambos os resíduos (OH e WB). Os processos empregados nesse trabalho, tanto para a produção de NFC, quanto para o pré-tratamento dos resíduos, mostraram-se efetivos, com a vantagem de reduzir os tempos de processo e por gerar uma menor quantidade de efluentes quando comparados aos processos convencionais de obtenção de NFC e pré-tratamentos químicos.

Palavras-chave: Resíduos agroindustriais. Celulose nanofibrilada. Extrusão reativa. Explosão a vapor. Ultrassonicação. Açúcares fermentescíveis.

DEBIAGI, Flávia. **Utilization of lignocellulosic residues from agroindustry by the combination of physical and chemical processes.** 2017. 129 p. Thesis (Doctoral Degree in Biotechnology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

ABSTRACT

The present work had as objectives the use of agroindustrial residues (soybean hull, oat hull and wheat bran) using the combination of physical and chemical processes, aiming at the production of nanofibrillated cellulose through reactive extrusion, as well as, the study of steam explosion and ultrasonication as processes of pretreatment of the residues aiming the extraction of fermentable sugars. For the production of nanofibrillated cellulose (NFC), oat hulls (OH) and soybean hulls (SH) were subjected to the reactive extrusion combined or not with bleaching with peracetic acid. Subsequently, the raw OH and NFC obtained from OH were impregnated with biological silver nanoparticles (bio-NPAg) and it was evaluated its antibacterial activity against *Escherichia coli*. For OH and SH, the use of reactive extrusion combined or not with bleaching resulted in NFC with diameters at the nanometer scale and lengths of several micrometers. Regardless of the residue, the NFC samples produced in this work presented high cellulose contents (> 87 %), higher crystallinity and thermal stability than the raw residues. In addition, it was possible to observe that NFC suspensions obtained from OH and SH were stable when stored at room temperature for 24 h. However, only when it was used OH was possible to observe the presence of a homogeneous material, consisting only of NFC. Only the raw OH impregnated with bio-NPAg presented antimicrobial activity against *E. coli*. For the pre-treatment of the residues, the oat hull (OH) and wheat bran (WB) were subjected to steam explosion and ultrasonication, combined with different reagents (H₂SO₄, NaOH or distilled water). In relation to the pretreatment of the residues, the most effective process was the one that used the steam explosion in the presence of H₂SO₄, for both WB and OH. In addition, an increase in cellulose and a decrease in lignin and hemicelluloses contents were observed for both residues (OH and WB). The processes used in this work, both for the NFC production and for the pretreatment of the residues were effective, with the advantage of reducing the process times and low generation of effluents when compared to the conventional processes employed to the obtaining of NFC and chemical pretreatments.

Keywords: Agroindustrial residues. Nanofibrillated cellulose. Reactive extrusion. Steam explosion. Ultrasonication. Fermentable sugars.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO I: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1 - Diagrama dos constituintes da biomassa lignocelulósica.....	23
Figura 2 - Estrutura química da celulose	23
Figura 3 - Representação esquemática das associações químicas que ocorrem na parede celular vegetal.	25
Figura 4 - Estruturas químicas dos monossacarídeos encontrados nas hemiceluloses.....	27
Figura 5 - Representação estrutura química da lignina.	29
Figura 6 - Morfologia do grão de aveia.	32
Figura 7 - Esquema ilustrando a desestruturação do complexo lignocelulósico provocado por um pré-tratamento da biomassa.....	35
Figura 8 - Tipos de pré-tratamentos e suas respectivas técnicas.....	36
Figura 9 - Mecanismo da hidrólise ácida na celulose	42
Figura 10 - Esquema hierárquico a partir da biomassa da madeira até a nanocelulose.....	49
Figura 11 - Diagrama do conceito de biorrefinaria apresentando o potencial de valor agregado dos produtos	54

CAPÍTULO II: NANOFIBRILATED CELLULOSE OBTAINED FROM OAT HULLS BY REACTIVE EXTRUSION

Figure 1 - Micrographs obtained using SEM: OH, EOH, EOH1 and BOH	72
Figure 2 - AFM pictures for cellulose nanocrystals: EOH2 and BEOH.....	73
Figure 3 - FT-IR spectra of OH, EOH, EOH1,- EOH1, BOH, and BEOH	74
Figure 4 - X-ray diffractograms of OH, EOH, EOH1, EOH1, BOH, and BEOH	75
Figure 5 - TGA curves of OH, EOH, EOH1, EOH1, BOH and BEOH	76

CAPÍTULO III: NANOFIBRILLATED CELLULOSE FROM SOYBEAN HULLS USING BLEACHING COMBINED TO REACTIVE EXTRUSION

Figure 1 - Micrographs obtained using SEM: SH, ESH, ESH1 and BSH.	90
Figure 2 - AFM pictures for cellulose nanocrystals: ESH2 (A) and BESH (B).....	92
Figure 3 - FT-IR spectra of SH, ESH, ESH1,- ESH1, BSH, and BESH.....	93
Figure 4 - X-ray diffractograms of SH, ESH, ESH1, BSH, and BESH.....	94
Figure 5 - TGA curves of SH, BSH, and BESH.....	95

CAPÍTULO IV: PRODUÇÃO DE CASCA DE AVEIA OU CELULOSE NANOFIBRILADA IMPREGNADAS COM NANOPARTÍCULAS DE PRATA BIOLÓGICAS

Figura 1 - Microscopia de força atômica (AFM) da bio-NP_{Ag} e das amostras OH_{Ag}, e BEOH_{Ag}103

CAPÍTULO V: COMBINATION OF PHYSICAL AND CHEMICAL PRETREATMENTS ON PROPERTIES OF WHEAT BRAN AND OAT HULLS

Figure 1 - FTIR of WB submitted to steam explosion and ultrasonication..... 120

Figure 2 - FTIR of OH submitted to steam explosion and ultrasonication 120

Figure 3 - DRX of WB submitted to steam explosion and ultrasonication 122

Figure 4 - DRX of OH submitted to steam explosion and ultrasonication 122

Figure 5 - SEM of WB submitted to steam explosion and ultrasonication..... 124

Figure 6 - SEM of OH submitted to steam explosion and ultrasonication 124

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Tabela 1 - Descrição dos pré-tratamentos físicos para resíduos lignocelulósicos.	38
Tabela 2 - Descrição dos pré-tratamentos químicos para os resíduos lignocelulósicos	41
Tabela 3 - Descrição dos pré-tratamentos físico-químicos para os resíduos lignocelulósicos.	44
Tabela 4 - Tipos de nanoceluloses.....	48
Tabela 5 - Técnicas de extração da celulose da parede celular.....	50

CAPÍTULO II: NANOFIBRILATED CELLULOSE OBTAINED FROM OAT HULLS BY REACTIVE EXTRUSION

Table 1 - Processing conditions to obtain nanofibrillated cellulose from oat hulls.....	67
Table 2 - Cellulose, hemicelluloses and lignin contents and crystallinity index (CI) of oat hulls samples submitted to reactive extrusion and/or to bleaching.....	70
Table 3 - TGA parameters of oat hulls samples submitted to reactive extrusion and/or to bleaching	77

CAPÍTULO III: NANOFIBRILLATED CELLULOSE FROM SOYBEAN HULLS USING BLEACHING COMBINED TO REACTIVE EXTRUSION

Table 1 - Processing conditions to obtain nanofibrillated cellulose from SH.....	85
Table 2 - Cellulose, hemicelluloses and lignin contents and crystallinity index (CI) of SH samples submitted to reactive extrusion and/or to bleaching.....	89
Table 3 - TGA parameters of SH, BSH and BESH	96

CAPÍTULO IV: PRODUÇÃO DE CASCA DE AVEIA OU CELULOSE NANOFIBRILADA IMPREGNADAS COM NANOPARTÍCULAS DE PRATA BIOLÓGICAS

Tabela 1 - Controle de esterilidade das amostras	104
Tabela 2 - Teste antimicrobiano das amostras frente à bactéria <i>E.coli</i>	105

CAPÍTULO V: COMBINACIÓN DE FÍSICAS Y QUÍMICAS PRETRATAMIENTOS EN LAS PROPIEDADES DE LA CASCARA DE TRIGO Y CÁSCARA DE AVEANA

Table 1 - Total and reducing sugars and xylose contents of WB samples submitted to steam explosion and ultrasonication	115
Table 2 - Total and reducing sugars and xylose contents of OH samples submitted to steam explosion and ultrasonication	116
Table 3 - Monosaccharides contents of WB submitted to steam explosion and ultrasonication	117
Table 4 - Monosaccharides contents of OH submitted to steam explosion and ultrasonication	117
Table 5 - Cellulose, hemicellulose and lignin of WB and residual solid fractions obtained from WB submitted to steam explosion and ultrasonication	118
Table 6 - Cellulose, hemicellulose and lignin of OH and residual solid fractions obtained from WB submitted to steam explosion and ultrasonication	119
Table 7 - Crystallinity indexes (CI) of WB and OH submitted to steam explosion and ultrasonication	123

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	CAPÍTULO I : REVISÃO DA LITERATURA	21
2.1	RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS.....	21
2.1.1	Celulose.....	23
2.1.2	Hemiceluloses	26
2.1.3	Lignina	29
2.1.4	Casca de Soja	30
2.1.5	Casca de Aveia	31
2.1.6	Farelo de Trigo	33
2.2	MÉTODOS DE PRÉ-TRATAMENTO DOS RESÍDUOS LIGNOCELULÓSICOS	34
2.2.1	Métodos Físicos de Pré-tratamento dos Resíduos Lignocelulósicos.....	37
2.2.1.1	Ultrassonicação como pré-tratamento dos resíduos lignocelulósicos	39
2.2.2	Métodos Químicos de Pré-tratamento dos Resíduos Lignocelulósicos	40
2.2.2.1	Pré-tratamento ácido	41
2.2.2.2	Pré-tratamento alcalino	43
2.2.3	Métodos Físico-Químicos de Pré-tratamento dos Resíduos Lignocelulósicos	44
2.2.3.1	Explosão a vapor.....	45
2.2.4	Métodos Biológicos de Pré-tratamento dos Resíduos Lignocelulósicos	46
2.3	MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DA CELULOSE E NANOCELULOSE DE RESÍDUOS LIGNOCELULÓSICOS	47
2.3.1	Extrusão Reativa Para Extração De Celulose e Nanocelulose.....	52
2.4	CONCEITO DE BIORREFINARIAS E O APROVEITAMENTO DOS RESÍDUOS LIGNOCELULÓSICOS	53
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56

3	CAPÍTULO II : NANOFIBRILATED CELLULOSE OBTAINED FROM OAT HULLS BY REACTIVE EXTRUSION.....	64
3.1	INTRODUCTION	65
3.2	MATERIAL AND METHODS	66
3.2.1	Material.....	66
3.2.2	Reactive extrusion for production of NFC	66
3.2.3	Centesimal composition of oat hulls	68
3.2.4	Characterization of OH and OH submitted to reactive extrusion.	68
3.2.4.1	Cellulose, hemicellulose and lignin contents	68
3.2.4.2	Scanning electron microscopy (SEM).....	68
3.2.4.3	Atomic force microscopy (AFM).....	68
3.2.4.4	Fourier Transform-Infrared Spectroscopy (FT-IR)	69
3.2.4.5	X-ray diffraction (XRD)	69
3.2.4.6	Thermogravimetric analysis (TGA)	69
3.2.5	Statistical analysis	69
3.3	RESULTS AND DISCUSSION	70
3.3.1	Scanning electron microscopy (SEM).....	72
3.3.2	Atomic force microscopy (AFM).....	73
3.3.3	Fourier Transform-Infrared Spectroscopy (FT-IR)	74
3.3.4	X-ray diffraction	75
3.3.5	Thermogravimetric analysis (TGA).	76
3.4	CONCLUSIONS	78
	REFERENCES.....	79
4	CAPÍTULO III: NANOFIBRILLATED CELLULOSE FROM SOYBEAN HULLS USING BLEACHING COMBINED TO REACTIVE EXTRUSION.....	82
4.1	INTRODUCTION	83
4.2	MATERIAL AND METHODS	84
4.2.1	Material.....	84
4.2.2	Production of NFC	84
4.2.3	Centesimal composition of soybean hulls.....	85
4.2.4	Characterization of SH and SH submitted to bleaching and/or to reactive extrusion.	86

4.2.4.1	Cellulose, hemicelluloses and lignin contents.....	86
4.2.4.2	Scanning electron microscopy (SEM).....	86
4.2.4.3	Atomic force microscopy (AFM).....	86
4.2.4.4	Fourier Transform-Infrared Spectroscopy (FT-IR).	87
4.2.4.5	X-ray diffraction (XRD)	87
4.2.4.6	Thermogravimetric analysis (TGA).	87
4.2.4.7	Statistical analysis	87
4.3	RESULTS AND DISCUSSION	88
4.3.1	Centesimal composition of soybean hulls.....	88
4.3.2	Scanning electron microscopy (SEM).....	90
4.3.3	Atomic force microscopy (AFM).....	91
4.3.4	Fourier Transform-Infrared Spectroscopy (FT-IR)	92
4.3.5	X-ray diffraction (XRD)	94
4.3.6	Thermogravimetric analysis (TGA)	95
4.4	CONCLUSION	96
5	CAPÍTULO IV: PRODUÇÃO DE CASCA DE AVEIA OU CELULOSE NANOFIBRILADA IMPREGNADAS COM NANOPARTÍCULAS DE PRATA BIOLÓGICAS	99
5.1	INTRODUÇÃO	100
5.2	MATERIAL E MÉTODOS	101
5.2.1	Material.....	101
5.2.2	Métodos.....	101
5.2.2.1	Produção de celulose nanofibrilada.....	101
5.2.2.2	Impregnação com nanopartículas de prata biológicas (bio-NPAg).....	102
5.2.2.3	Microscopia de força atômica (AFM)	102
5.2.2.4	Análise da atividade antimicrobiana contra <i>E.coli</i>	102
5.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	103
5.3.1	Microscopia de Força Atômica (AFM)	103
5.3.2	Atividade Antimicrobiana Frente à Bactéria <i>E.coli</i>	104
5.4	CONCLUSÃO	106
	REFERÊNCIAS	107

6	CAPÍTULO V: COMBINATION OF PHYSICAL AND CHEMICAL PRETREATMENTS ON PROPERTIES OF WHEAT BRAN AND OAT HULLS	108
6.1	INTRODUCTION	109
6.2	MATERIAL AND METHODS	110
6.2.1	Material.....	110
6.2.2	Methods.....	110
6.2.2.1	Steam explosion	110
6.2.2.2	Ultrasonication.....	111
6.2.2.3	Quantification of sugars on liquid ydrolysates.....	111
6.2.2.3.1	<i>Total sugars</i>	111
6.2.2.3.2	Reducing sugars.....	111
6.2.2.3.3	Xylose.....	112
6.2.2.3.4	Content of monossacharides determined by HPLC (high-performance liquid chromatography)	112
6.2.2.4	Characterization of the residual solid fraction.....	113
6.2.2.4.1	Cellulose, hemicelluloses and lignin contents.....	113
6.2.2.4.2	Scanning electron microscopy (SEM).....	113
6.2.2.4.3	Fourier transform-infrared spectroscopy (FT-IR)	113
6.2.2.4.4	X-ray diffraction	113
6.2.2.5	Statistical analysis	114
6.3	RESULTS AND DISCUSSION	115
6.3.1	Quantification of Sugars in The Hydrolysates Samples.....	115
6.3.2	Cellulose, hemicelluloses and lignin contents of residual solid fraction.....	118
6.3.3	Fourier transform-infrared spectroscopy (FT-IR)	119
6.3.4	X-ray diffraction (XRD)	121
6.3.5	Scanning electron microscopy (SEM).....	123
6.4	CONCLUSION.....	125
	REFERENCES	126
	CONSIDERAÇÕES FINAIS	129

1 INTRODUÇÃO

O elevado uso de recursos fósseis, como o gás natural e o petróleo, faz com que os mesmos tornem-se cada vez mais escassos, o que se reflete negativamente na produção de alimentos, produtos químicos, materiais, combustíveis e fornecimento de energia. Neste contexto, é de extrema importância que a economia mundial comece a se basear em matérias-primas obtidas de fontes renováveis para a produção de bens de consumo (APPRICH et al., 2014; BRINCHI et al., 2013).

Muitos dos resíduos gerados pela agroindústria podem ser uma alternativa para reverter esse quadro, dentre eles os resíduos lignocelulósicos, como cascas, farelos, bagaços, palhas de cereais e leguminosas, já que são materiais abundantes e de baixo custo. Caracterizam-se por apresentar uma composição heterogênea, contendo geralmente celulose, hemiceluloses, amido, lignina, lipídios e proteínas.

O aproveitamento de resíduos agroindustriais está inserido no conceito de biorrefinarias, as quais têm como objetivo explorar diferentes matérias-primas renováveis para a obtenção de biocombustíveis e produtos clássicos oriundos do petróleo, sempre respeitando os critérios da sustentabilidade em seus processos (COTANA et al., 2014; DUQUE et al., 2014). Segundo Abdul khalil et al. (2014), o sistema de biorrefinarias pode também ser compreendido como a evolução das tecnologias, que visa explorar o potencial dos resíduos em conjunto com processos biológicos, químicos e térmicos, tendo como resultado produtos variados, com baixo custo e melhor competitividade.

Dentre estes produtos, se destaca a celulose, material que pode ser obtido a partir dos resíduos lignocelulósicos, após sua deslignificação, ou ainda, a nanocelulose, obtida através da hidrólise ácida da celulose. Dois tipos de nanocelulose podem ser obtidas a partir da celulose de origem vegetal: os nanocristais de celulose, que possuem formato de agulha, dimensão igual ou inferior a 100 nm e natureza altamente cristalina; e as nanofibras ou celulose nanofibrilada, que se apresentam na forma de fibras alongadas com diâmetro inferior a 100 nm e comprimento de vários micrômetros, consistindo de regiões cristalinas e amorfas alternadas (ABDUL KHALIL et al., 2014).

A utilização da nanocelulose como material de reforço em matrizes poliméricas vem se destacando, uma vez que oferece melhorias significativas nas

propriedades térmicas, mecânicas e de barreira dos compósitos biodegradáveis (ABDUL KHALIL et al., 2014; FLAUZINO NETO et al., 2013).

Visando ampliar as aplicações da celulose e nanocelulose, estas podem ser modificadas com a inserção de grupamentos químicos com atividade antimicrobiana, como por exemplo, as nanopartículas de prata. As fibras e nanofibras de celulose com propriedades antimicrobianas podem ser empregadas para a produção de embalagens ativas, que têm como objetivo prolongar o tempo de vida útil dos alimentos e diminuir a transmissão de microrganismos patogênicos (SEYDIM; SARIKUS, 2006).

Outra possibilidade de aplicação para os resíduos lignocelulósicos é a transformação dos polissacarídeos presentes na sua composição, em especial celulose e hemiceluloses, em açúcares fermentescíveis, através do processo de sacarificação. Estes açúcares têm grande potencial de aplicação, tais como substratos para fermentação alcoólica na produção de bioetanol, ou como ingredientes na indústria de alimentos. O bioetanol oriundo de resíduo agroindustrial, também conhecido como etanol de segunda geração, tem despertado maior interesse da comunidade científica nas duas últimas décadas, e o desenvolvimento de tecnologias de baixo custo para sua produção é importante no sentido de diminuir o déficit comercial associado à produção de etanol, reduzir a emissão dos gases que causam efeito estufa e melhorar a estabilidade de preços (SINGH; SUHAG; DHAKA, 2015; WU et al., 2014). Entretanto, para que o processo de sacarificação seja eficiente é necessário um pré-tratamento do resíduo para a sua deslignificação, deixando a celulose e as hemiceluloses disponíveis para sacarificação.

Para aplicação dos resíduos agroindustriais, são necessários processos convencionais de deslignificação, nos quais empregam-se uma quantidade elevada de soluções básicas ou ácidas. A hidrólise ácida propriamente dita da celulose envolve longos tempos de reação e baixos rendimentos de produção. Assim como são geradas grandes quantidades de efluentes nas etapas de lavagem ao final da sua produção (HAAJ et al., 2013). Portanto, a busca por processos menos poluentes para a obtenção destes materiais é um desafio nesta área, podendo resultar em tecnologias sustentáveis para a sua obtenção, a partir de diferentes matérias-primas (LAURICHESSE; AVÉROUS, 2014).

Uma tecnologia que pode ser empregada no processo de modificação física e química dos resíduos lignocelulósicos é a extrusão reativa, a qual emprega ação de

pressão, temperatura e cisalhamento em uma única etapa, e que pode ser realizada na presença de reagentes químicos. Dessa forma, há um ganho significativo em eficiência, combinando-se os processos de mistura e modificação química, sem a geração de efluentes, ou com uma redução significativa da geração de efluentes, o que reduziria o impacto ambiental associado à produção destes materiais, e também favoreceria a viabilidade comercial dos produtos (LIU et al., 2009). De acordo com Merci et al. (2015) é possível se extrair celulose e obter-se celulose microcristalina, a partir da casca de soja empregando-se o processo de extrusão reativa.

Outra tecnologia que pode ser empregada, em especial como pré-tratamento visando a sacarificação da celulose e hemiceluloses dos resíduos lignocelulósicos é a ultrassonicação, processo físico que ainda é pouco relatado na literatura para esta finalidade. Os mecanismos de modificação dos resíduos são atribuídos ao fenômeno da cavitação, isto é, o impacto produzido pelo colapso das bolhas proporciona um importante benefício na desestruturação da superfície dos materiais lignocelulósicos (SUN; TOMKINSON, 2002; YACHMENEV et al., 2009).

Vale ressaltar, que no Brasil a agroindústria é responsável por gerar inúmeras fontes de biomassa, que não são adequadamente aproveitadas, transformando-as em resíduos industriais, tais como a casca de soja, a casca de arroz, a casca de aveia e o farelo de trigo, dentre outros. Todas são matérias-primas ricas em celulose, hemiceluloses e lignina (APPRICH et al., 2014; FLAUZINO NETO et al., 2013), e portanto, tornam-se atrativas tanto para a produção de celulose e nanocelulose, quanto para obtenção de açúcares fermentescíveis.

O presente trabalho teve como objetivo geral promover o aproveitamento de resíduos da agroindústria (casca de soja, casca de aveia e farelo de trigo) empregando-se a combinação de processos físicos e químicos, visando a produção de celulose nanofibrilada via extrusão reativa, assim como, o estudo do emprego da explosão a vapor e ultrassonicação como processos de pré-tratamento dos resíduos com vistas à extração de açúcares fermentescíveis.

Este trabalho foi subdividido em capítulos, organizados como descrito abaixo:

- Capítulo I – Revisão da literatura.
- Capítulo II – Artigo 1 – Nanofibrilated cellulose obtained from oat hulls by reactive extrusion – artigo a ser enviado para publicação na Revista Industrial Crops and Products.

- Capítulo III – Artigo 2 – Nanofibrillated cellulose from soybean hulls using bleaching combined to reactive extrusion – artigo a ser enviado para publicação na Revista Journal of Cellulose.

- Capítulo IV- Artigo 3 - Produção de casca de aveia ou celulose nanofibrilada impregnadas com nanopartículas de prata biológicas – *short communication* a ser publicado na Revista Industrial Crops and Products.

- Capítulo V- Artigo 4 - Combination of physical and chemical pretreatments on properties of wheat bran and oat hulls - artigo a ser enviado para publicação na Revista Industrial Crops and Products.

2 CAPÍTULO I : REVISÃO DA LITERATURA

2.1 RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS

Os avanços no setor petroquímico proporcionaram o desenvolvimento de uma série de polímeros sintéticos, os quais são utilizados como matéria-prima na produção dos mais variados produtos. Entretanto, o esgotamento dos combustíveis fósseis, associado a uma crescente conscientização dos seus impactos ambientais têm aumentado interesse no uso de recursos de fonte renovável (LAURICHESSE; AVÉROUS, 2014).

Nesse contexto, nos últimos anos têm se discutido o conceito de biorrefinarias, que abrange a associação de instalações e processos para converter a biomassa renovável em biocombustíveis e outros produtos clássicos oriundos do petróleo. Uma biorrefinaria integrada é capaz de converter de forma eficiente uma ampla variedade de matérias-primas de biomassa em biocombustíveis e bioprodutos, com o objetivo de através da inovação reduzir os custos, melhorar a competitividade destes novos produtos e, acima de tudo, explorar o potencial de alguns resíduos industriais (SOUSA-AGUIAR et al., 2014).

De acordo Espino et al. (2014), o desenvolvimento de biorrefinarias está vinculado ao uso de materiais provenientes da biomassa. O Ministério do Meio Ambiente (2015) define biomassa como todo recurso renovável que provêm de matéria orgânica (vegetal ou animal), e que tem por objetivo principal a produção de energia. Apresentam baixo custo, são altamente disponíveis e provenientes de fonte renovável. Segundo Behera et al. (2014) os tipos de biomassa podem ser classificados com base em:

- Resíduos industriais: serragem, produtos oriundos das fábricas de papel e da indústria de alimentos, etc.
- Resíduos agrícolas: palhas, cascas, sementes, espigas, talos, etc.
- Resíduos domésticos: resíduos de cozinha, esgoto, papéis usados, etc.

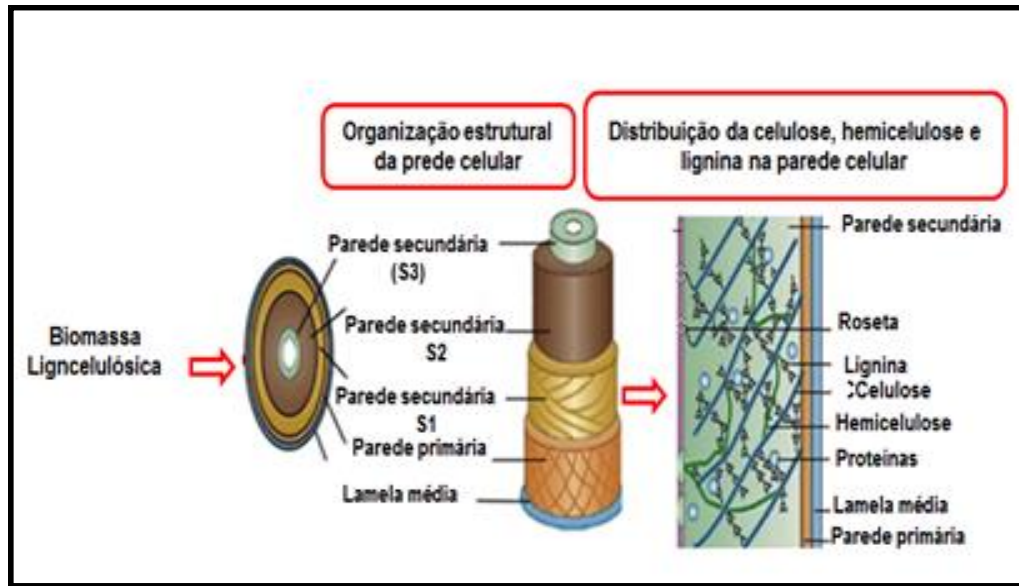
A biomassa agrícola constitui o tipo de resíduo mais abundante na terra, e como o Brasil possui a agricultura como base da sua economia, o setor agroindustrial brasileiro gera uma grande quantidade destes resíduos (GUPTA;

VERMA, 2015; SANTOS et al., 2013). Forster-Carneiro et al. (2013) investigaram a disponibilidade dos resíduos agroindustriais e agropecuários no Brasil para o ano de 2020. Os resultados sugerem que a cana de açúcar possui a maior disponibilidade agrônômica, seguida da soja, arroz, milho, laranja, trigo, algodão, mandioca e tabaco. A utilização de resíduos agroindustriais poderá trazer benefícios para o setor agrícola, pois pode ser uma fonte adicional de lucro para os produtores e também ajudar na diversificação da agroindústria (SANTOS et al., 2013).

O emprego dos resíduos lignocelulósicos permite uma redução significativa, tanto no volume de resíduos acumulados no meio ambiente, como na obtenção de novos materiais. Assim, uma reutilização eficiente desses resíduos é de grande importância, não só para minimizar o impacto ambiental, mas também para a obtenção de produtos com maior valor agregado (SANTOS et al., 2013).

A composição química dos resíduos lignocelulósicos pode variar de acordo com a sua origem, e em geral, são compostos por celulose, hemiceluloses e lignina, podendo apresentar outros constituintes, tais como cinzas, proteínas, pectina, etc (BEHERA et al., 2014; LAURICHESSE; AVÉROUS, 2014; MENON; RAO, 2012). Na Figura 1 está apresentado um diagrama dos principais constituintes da biomassa lignocelulósica, estes materiais possuem camadas complexas, que compreendem a parede primária, a qual é depositada durante a fase de crescimento da planta e a parede secundária, constituída por três camadas (S1, S2 e S3). A camada S2 é determinante para as propriedades mecânicas das fibras, sendo formada por várias microfibrilas constituídas de celulose (Figura 1) (MENON; RAO, 2012).

Figura 1 - Diagrama dos constituintes da biomassa lignocelulósica

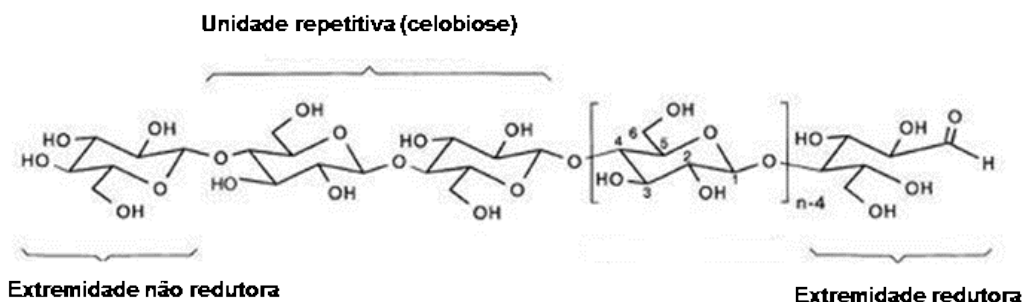


Fonte: MENON; RAO (2012).

2.1.1 Celulose

A celulose ($C_6H_{10}O_5$)_n é o principal constituinte da parede celular dos vegetais e possui a função de lhe conferir sustentação. Além disso, está presente nas bactérias, fungos e algas. Quimicamente, a celulose é um polissacarídeo, mais especificamente um homopolímero de moléculas de β-D- glicopiranoses unidas por ligações β 1 → 4. O grau de polimerização pode variar entre 200 a 1200 unidades de β-D-glicopiranoses. A celobiose é a unidade básica da celulose e é formada por duas unidades de (1-4) D-glicopiranoses (ANWAR; GULFRAZ; IRSHAD, 2014) (Figura 2).

Figura 2 - Estrutura química da celulose



Fonte: KLEMM et al. (1998)

Considerando-se a cadeia linear de celulose, sabe-se que uma importante característica da molécula de celulose é a diferenciação entre os seus grupamentos terminais, em uma das extremidades encontra-se o grupamento hidroxílico do carbono C-4, que é o terminal não redutor da molécula, e na outra extremidade da molécula encontra-se o terminal redutor (Figura 2). Vale ressaltar, que as reações não enzimáticas de degradação ou despolimerização da celulose ocorrem comumente a partir do terminal redutor da molécula, devido a sua maior reatividade (FENGEL; WEGENER, 1989).

Em sua organização supramolecular as moléculas de celulose apresentam-se como feixes de microfibrilas, com regiões altamente ordenadas, denominadas de fração cristalina, as quais estão alternadas com regiões menos ordenadas, conhecidas como fração amorfa da celulose, que por sua vez são mais acessíveis ao ataque de reagentes, enzimas ou até mesmo a absorção da água (MENON; RAO, 2012).

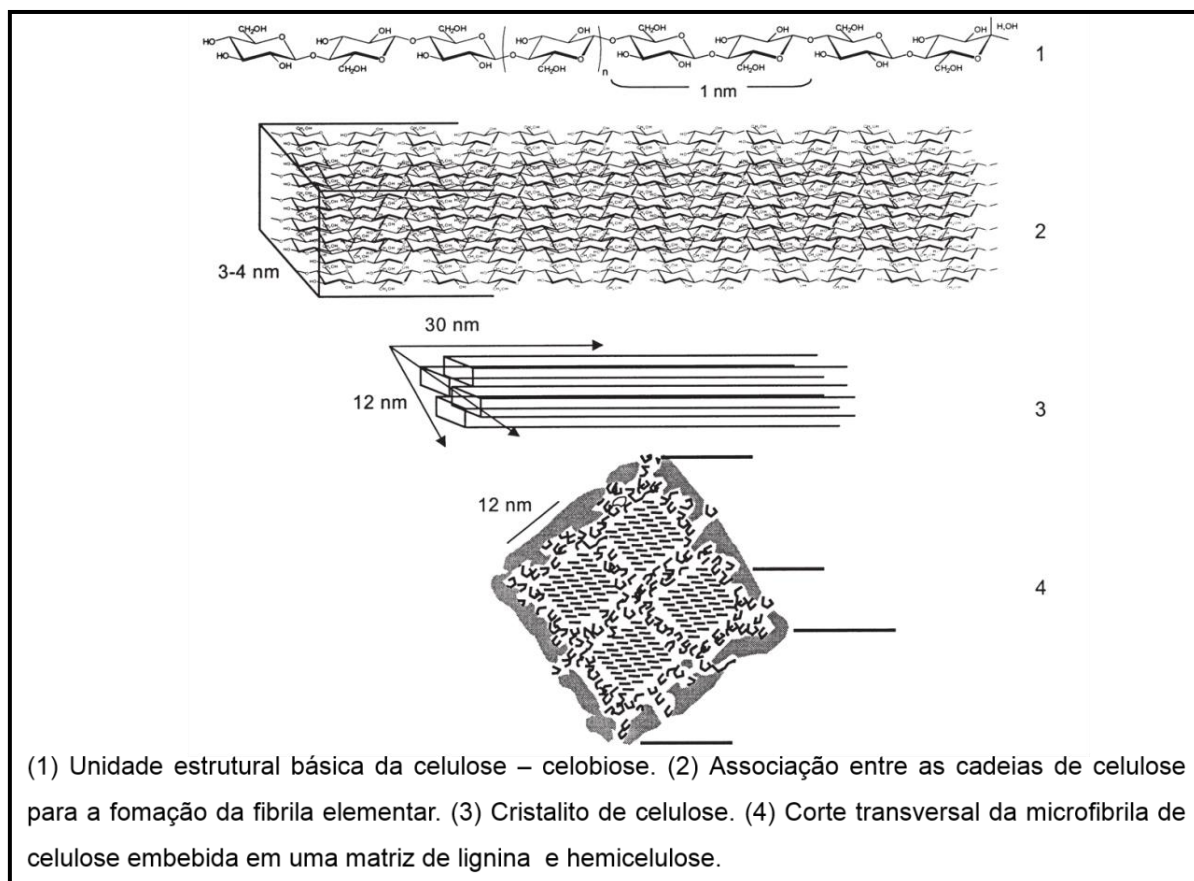
A ocorrência das regiões cristalinas é bastante influenciada pelas ligações de hidrogênio inter ou intramoleculares presentes no arranjo estrutural da celulose. Nas regiões cristalinas, onde existe uma maior organização molecular, há um arranjo geométrico estabilizado pelas ligações de hidrogênio que se repete nos eixos principais da estrutura (eixos cristalográficos) para formar o volume total do cristal. Em cristalografia, a esse arranjo geométrico dá-se o nome de célula unitária, a qual apresenta dimensões bem definidas, e no caso da celulose existe mais de uma forma alomórfica, ou seja, não há uma dimensão única para a célula unitária (LIMA; BORSALI, 2004).

A proporção entre as regiões cristalina e amorfa determina o índice de cristalinidade (IC) da celulose (D'ALMEIDA, 1981), e a técnica padrão utilizada para mensuração do IC é a difração de raios-X, que consiste na incidência de um feixe de elétrons que ao ser difratado fornece informações sobre a estrutura da amostra (SMITH, 1981).

Devido à linearidade do esqueleto celulósico, cadeias adjacentes formam um conjunto de agregados insolúveis em água denominados de fibrila elementar. Quatro fibrilas elementares são então agrupadas por uma monocamada de hemiceluloses, sendo posteriormente circundadas em uma matriz de hemiceluloses e lignina, associadas entre si por meio de interações físicas e ligações covalentes (RAMOS,

2003). O composto natural resultante desta íntima associação é denominado microfibrila celulósica (Figura 3).

Figura 3 - Representação esquemática das associações químicas que ocorrem na parede celular vegetal



Fonte: Adaptado de Ramos (2003).

Segundo O'Sullivan (1997) os principais polímeros da celulose proveniente dos resíduos lignocelulósicos, corresponde a celulose tipo I e tipo II. A celulose nativa (I) apresenta uma estrutura semicristalina composta por uma mistura de dois alomorfos I_α e I_β , os quais se alinham lado a lado e se estabilizam por ligações de hidrogênio (CHENG et al., 2011). A proporção entre I_α e I_β na celulose nativa pode variar de acordo com a sua origem, por exemplo, a celulose do algodão e da madeira possui predominância do tipo I_β . Já a celulose encontrada em certas bactérias e algas, possui predominância do tipo I_α (KLEMM et al., 2005).

Em contrapartida, a celulose tipo II pode ser obtida da celulose tipo I empregando dois diferentes processos. Na mercerização ocorre a conversão da celulose I em II, empregando um tratamento com hidróxido de sódio aquoso,

juntamente com condições previamente determinadas de agitação, temperatura e reagente. Já na regeneração, a conversão ocorre através da solubilização da celulose tipo I em um solvente, seguido da sua extrusão através de um orifício giratório, após recristalização da celulose durante a coagulação (KROON-BATENBURG; BOUMA; KROON, 1996).

Em geral, a celulose tipo II apresenta uma maior estabilidade do que a celulose tipo I, em virtude da sua extensa rede de ligações de hidrogênio, por isso há um grande interesse em sua produção. Nagarajan et al. (2017) concluíram através do seu estudo de revisão, que a celulose tipo II quando aplicada como biomassa para a produção de bioetanol, proporciona maiores concentrações de açúcares durante o processo de fermentação e maior produção do mesmo. Fato atribuído ao seu arranjo estrutural modificado, porosidade e grau de polimerização.

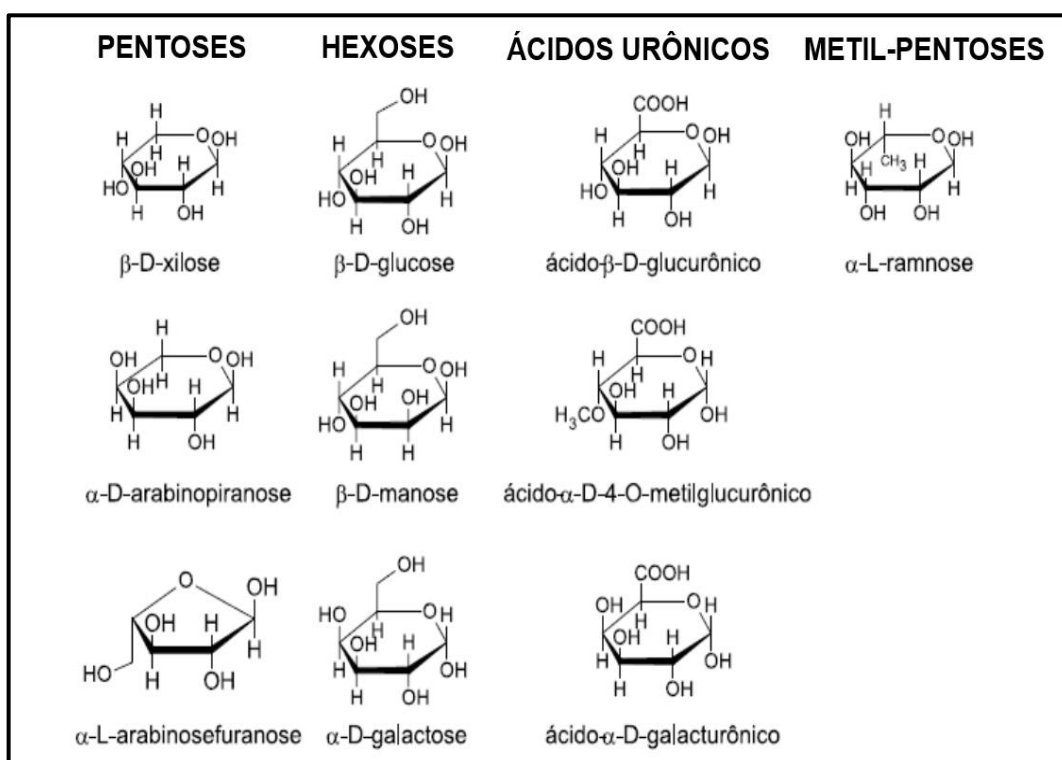
A identificação da celulose tipo I e II pode ser realizada através de análises de difratogramas de raios X. A celulose tipo II é caracterizada por picos 2 (θ) = 12° , 20° e 22° . Já a celulose tipo I apresenta picos 2 (θ) = $20,6^\circ$, $34,7^\circ$, $17,3^\circ$, $22,4^\circ$ (FLAUZINO NETO et al., 2013; MERCI et al., 2015).

2.1.2 Hemiceluloses

O segundo maior representante da biomassa lignocelulósica (20 a 50 %) corresponde às hemiceluloses, que atuam recobrando as fibrilas de celulose. Ao contrário da celulose, as hemiceluloses apresentam uma cadeia heterogênea, constituída por um complexo de carboidratos poliméricos, o que torna difícil se propor uma definição concreta para o termo hemicelulose. Considerando a sua complexidade, diversidade de constituintes monoméricos e polidispersão ao longo de sua grande variedade dentre os vegetais superiores, as hemiceluloses podem ser consideradas mais caracteristicamente como uma família de polissacarídeos presentes na parede celular vegetal (AKHTAR et al., 2016).

Como pode ser observado na Figura 4 os principais constituintes estruturais das hemiceluloses: D- xilose e D-arabinose (pentoses), L-ramnose (metil pentoses), D-glicose, D-manose, D-galactose (hexoses), ácido glicurônico, e outros D-ácidos carboxílicos (AKHTAR et al., 2016).

Figura 4 - Estruturas químicas dos monossacarídeos encontrados nas hemiceluloses



Fonte: AKHTAR et al., (2016).

As diferentes unidades monoméricas que formam as hemiceluloses permitem que estes polissacarídeos apresentem diferentes arranjos, assim como a presença de ramificações, possibilitadas pela presença de várias hidroxilas passíveis de serem esterificadas. As hemiceluloses são geralmente classificadas de acordo com o resíduo de açúcar principal no esqueleto, como, por exemplo, xilanas, mananas e glucanas. Dependendo da espécie da planta, estágio de desenvolvimento e tipo de tecidos, várias subclasses de hemiceluloses podem ser encontradas, incluindo glucuronoxilanas, arabinoxilanas, mananas lineares, glicomananas, galactomananas, galactoglicomananas, β-glucanas e xiloglucanas (OGEDA; PETRI, 2010). Considerando-se esta diversidade estrutural das hemiceluloses, a formação de ligações de hidrogênio entre as suas cadeias são relativamente restritas, dificultando a formação de regiões cristalinas ordenadas, como ocorre com a celulose (AKHTAR et al., 2016).

As hemiceluloses encontram-se associadas com a celulose e com a lignina, através de ligações de hidrogênio e ligações covalentes, respectivamente, e acredita-se que as interações entre hemiceluloses e as microfibrilas de celulose

sejam mais abundantes do que as interações entre as hemiceluloses e ligninas (OGEDA; PETRI, 2010).

Para o aumento da disponibilidade da celulose, as hemiceluloses precisam ser extraídas, e para isso vários pré-tratamentos podem ser utilizados. Esse heteropolissacarídeo apresenta uma estrutura amorfa e ramificada, com pouca resistência a hidrólise por ácidos (AKHTAR et al., 2016). De acordo com Farhat et al. (2017) a extração das hemiceluloses pode ser realizada por pré-tratamentos com ácidos diluídos, extração alcalina com hidróxido de sódio (NaOH), extração alcalina com peróxido, por extrusão, ou até mesmo a combinação de ambos.

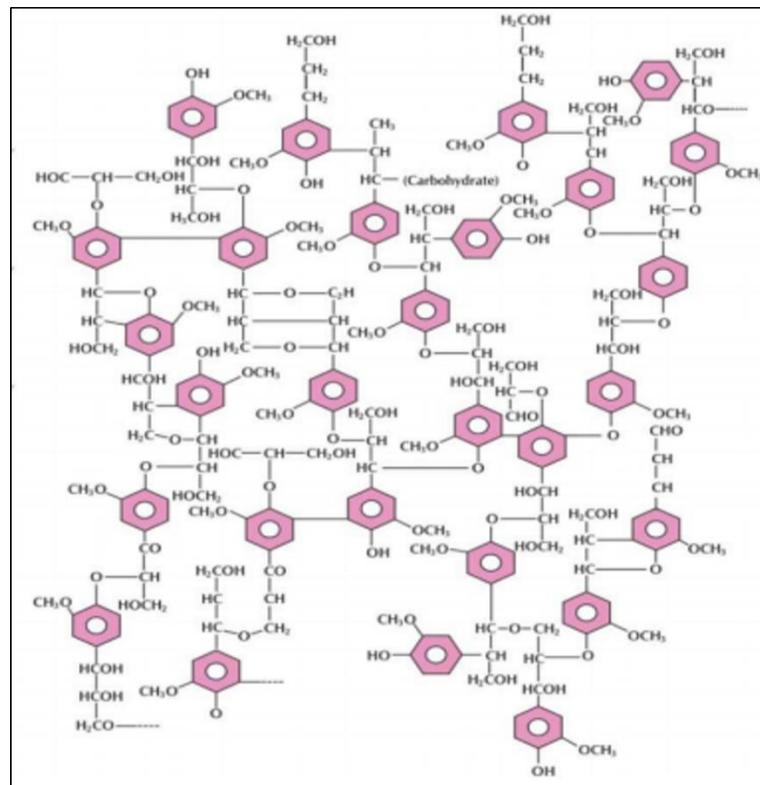
Segundo Hendriks e Zeeman (2009) as hemiceluloses são os componentes do complexo lignocelulósico mais sensíveis aos tratamentos termoquímicos, além disso, são susceptíveis à hidrólise ácida ou básica, sendo esta característica aproveitada para o desenvolvimento de aplicações onde as hemiceluloses devam ser solubilizadas ou removidas do material original. No entanto, alguns cuidados devem ser tomados, como o uso de tratamentos drásticos que possam levar à formação de produtos de degradação das hemiceluloses, tais como furfural e hidroximetilfurfural, que são inibidores em potencial dos processos fermentativos.

As hemiceluloses apresentam características promissoras, são biodegradáveis e biocompatíveis, permitindo sua aplicação na forma nativa ou modificada em vários setores, como por exemplo, produção de xilitol, obtenção de furfural, desenvolvimento de biossurfactantes, na constituição de filmes biodegradáveis, dentre outros. Na biomassa lignocelulósica, as hemiceluloses representam uma fração relativamente grande de polissacarídeos, no entanto, esse heteropolímero ainda é descartado durante vários processos industriais (PENG; SHE, 2014).

2.1.3 Lignina

Outro constituinte da biomassa é a lignina, um heteropolímero formado por redes poliméricas tridimensionais com unidades de fenilpropano interligadas por ligações éter (Figura 5). A lignina encontra-se presente em toda a biomassa vegetal e preenche as lacunas entre a celulose e as hemiceluloses. Atua conferindo rigidez a planta e proteção ao ataque de patógenos. Além disso, em processos biotecnológicos, a lignina dificulta a ação das celulases, sendo necessário realizar previamente o processo de deslignificação antes da hidrólise enzimática (AKHTAR et al., 2016).

Figura 5 - Representação estrutura química da lignina



Fonte: Adaptado de AKHTAR et al. (2016)

A lignina também é considerada um subproduto da produção do bioetanol (ANWAR; GULFRAZ; IRSHAD, 2014). A lignina residual pode ser utilizada para a produção de resinas fenólicas, adesivos, polifenóis entre outros. No entanto, para a liberação dos açúcares fermentescíveis (celulose e hemicelulose), os quais são utilizados como fonte de carbono em bioprocessos, a lignina é uma barreira

importante, a qual precisa ser removida para a liberação dos mesmos (WU et al., 2013).

A agroindústria brasileira gera muitas fontes de biomassa que não são devidamente aproveitadas, transformando-as em resíduos industriais, dentre os quais, alguns resíduos lignocelulósicos, como a casca de soja (resíduo do processamento do óleo de soja), o farelo de trigo (resíduo do processamento da farinha de trigo), a casca da aveia (resíduo do processamento da aveia), o bagaço de malte (resíduo fibroso da cervejaria), a casca do arroz (resíduo do beneficiamento do arroz), o bagaço de mandioca (resíduo de fecularias), a fibra da bananeira (resíduo resultante da cultura da banana), dentre outros. Desta forma, se torna vantajoso o aproveitamento destes materiais com as mais diferentes propostas de utilização no sentido de reduzir o seu acúmulo e não aproveitamento pela indústria.

2.1.4 Casca de Soja

A soja é um dos principais produtos agrícolas brasileiros, com uma produção de 111 milhões de toneladas na safra de 2016/2017. O Brasil é o segundo maior produtor mundial de soja, atrás apenas dos EUA que produziram 117 milhões de toneladas na safra de 2016/2017 (CONAB, 2017).

A casca de soja é um dos resíduos gerados através do processamento da soja para a obtenção de óleo. Esse resíduo representa 5 % do peso do grão, com uma demanda anual brasileira de aproximadamente 7 milhões de toneladas (CARDOSO et al., 2013; ROJAS et al., 2014; GIRI et al., 2017). Em sua grande maioria, a casca de soja é utilizada para alimentação animal. Entretanto, uma elevada quantidade desse resíduo é produzida e têm sido descartada no ambiente (FLAUZINO NETO et al., 2013).

De acordo com Rojas et al. (2014), a casca de soja pode conter quantidades variáveis de celulose (38 a 51 %), hemiceluloses (20 a 25 %), lignina (1 a 8 %), pectinas (4 a 8 %) e proteínas (11 a 15 %). A casca de soja apresenta uma pequena proporção de lignina quando comparada com os demais resíduos agroindustriais, fato que pode favorecer a sua reutilização para os mais diversos fins, como em processos fermentativos e na produção de nanocelulose (HICKERT et al., 2014).

Vários pesquisadores estão explorando as características da casca de soja para obtenção de novos materiais. Flauzino Neto et al. (2013) produziram

nanocristais de celulose a partir da celulose extraída da casca de soja empregando o método de hidrólise ácida. Rojas et al. (2014) observaram em seus estudos que a casca de soja pode ser uma matéria-prima promissora para a produção de bioetanol, em virtude de apresentar baixos teores de lignina.

Merci et al. (2015) produziram celulose microcristalina proveniente da casca de soja pelo método de extrusão reativa. Os autores observaram que o conteúdo de celulose aumentou significativamente passando de 31,19 % (amostra *in natura*) para 83,79 % (amostra extrusada). Além disso, houve um aumento no índice de cristalinidade de 33 % para 70 % para a amostra *in natura* e extrusada, respectivamente. Os autores concluíram que o processo de extrusão é um método efetivo para a produção de celulose microcristalina, além de gerar uma menor quantidade de efluentes e com menor custo que os métodos tradicionais.

Makela et al. (2017) avaliaram o potencial de produção de um *mix* de enzimas pelo fungo *Podospora anserina* utilizando três substratos diferentes, a casca de semente de algodão, a casca de soja e o farelo de trigo. Os resultados demonstraram que a utilização de casca de soja como fonte de carbono proporcionou uma maior produção do *mix* enzimático que os demais substratos. Além disso, o coquetel produzido demonstrou-se mais eficiente que o padrão enzimático.

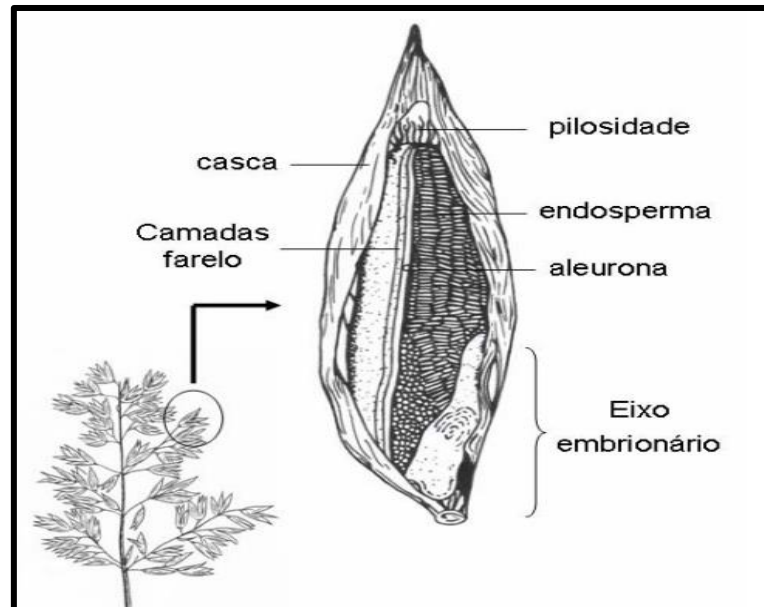
2.1.5 Casca de Aveia

A aveia é um cereal membro do gênero *Avena* que apresenta inúmeras possibilidades de utilização, tais como: produção de grãos (alimentação humana e animal), forragem (pastejo, feno, silagem ou cortada e fornecida fresca no cocho), cobertura do solo e adubação verde (proteção e melhoria das condições físicas do solo). A produção brasileira de aveia na safra de 2016/2017 foi de aproximadamente 706 mil toneladas, sendo Minas Gerais, Paraná e Rio Grande do Sul os principais produtores (CONAB, 2017).

A morfologia do grão de aveia pode ser dividida em germe (embrião), endosperma, farelo e casca (Figura 6). A industrialização da aveia gera a casca como principal resíduo, oriundo do processo de moagem, e que representa de 25 a

30 % do peso do grão, e desempenha função de proteção do grão frente a fatores ambientais e ao ataque de patógenos (FURLAN; DUARTE; MAULER, 2012).

Figura 6 - Morfologia do grão de aveia



Fonte: FURLAN; DUARTE; MAULER, (2012).

A composição química da casca da aveia pode variar devido às diferentes variedades deste cereal. Tamanini e Haully (2004) determinaram a composição da casca de aveia e verificaram que a mesma é composta por celulose (29 %), hemiceluloses (28 %), lignina (22 %) e cinzas (4 %). Geralmente, as cascas da aveia são destinadas à ração animal, no entanto, quando o resíduo é gerado em grandes quantidades torna-se um poluente ambiental (FURLAN; DUARTE; MAULER, 2012).

O descarte das cascas de aveia pode ser designado como um desperdício de matéria-prima, e de acordo com Tamanini e Haully (2004), os polissacarídeos presentes na casca podem ser utilizados para a obtenção dos mais variados produtos no setor alimentício, como na produção de pães, de biscoitos e de massas. Além disso, para a obtenção biotecnológica de xilitol, bioetanol ou como reforços de compósitos biodegradáveis. Estes autores empregaram a casca de aveia como matéria-prima para a produção de xilitol por fermentação descontínua, utilizando a levedura *Candida guilliermondii*, e obtiveram rendimento e produtividade volumétrica de xilitol de 0,54 g/g e 0,34 g/L.h, respectivamente.

Galdeano e Grossmann (2005) trataram a casca de aveia com peróxido de hidrogênio por extrusão reativa para empregar a fibra modificada na produção de biscoitos. A textura arenosa da aveia foi eliminada após o tratamento, evidenciando a eficiência do processo de extrusão, resultando em um nível de aceitação dos biscoitos incorporados da fibra modificada medido através de análise sensorial de 91 %.

Furlan, Duarte e Mauler (2012) utilizaram a casca de aveia para reforçar compósitos de polipropileno e observaram que este resíduo peneirado apresentou melhor adesão e foi mais facilmente incorporado na matriz polimérica, proporcionando boa resistência mecânica quando empregado em concentrações de até 20 %. No entanto, porcentagens superiores a 30 % de casca de aveia reduziram a resistência mecânica do material.

2.1.6 Farelo de Trigo

Cerca de 90 % da produção mundial de cereais é representada pelo trigo, associado ao arroz e ao milho. Anualmente, a produção mundial de trigo é de aproximadamente 650 milhões de toneladas, dos quais 69 % são destinados para o setor de alimentos. O Brasil contribuiu com 5534 mil de toneladas na safra de 2015/2016, com uma estimativa de 6726 para a safra de 2016/2017 (CONAB, 2017). A principal forma de consumo do trigo é na forma de farinha de trigo, e o seu processamento apresenta uma taxa de extração de 73 a 77 % (PRÜCKLER et al., 2014).

O principal resíduo industrial resultante da obtenção da farinha de trigo é o farelo, que representa cerca de 14 a 19 % da massa do grão (APPRICH et al., 2014; PRÜCKLER et al., 2014). Segundo Wood et al. (2016), em nível mundial são produzidos cerca de 90 milhões de toneladas do farelo de trigo por ano, este resíduo apresenta alta disponibilidade e baixo custo. Cerca de 55 % do farelo é destinado a nutrição humana e animal (APPRICH et al., 2014).

O farelo de trigo é composto majoritariamente por carboidratos não amiláceos (58 %), dentre os quais celulose (15 %) e hemiceluloses (38 %), além de proteínas (18 %) e amido (15 %), e um baixo teor de lignina (3 a 8 %) (FIGUEIRÓ; GRACIOLLI, 2011). De acordo com Apprich et al. (2014), ao contrário dos outros

resíduos lignocelulósicos, o farelo de trigo apresenta maiores níveis de proteínas e amido, e menores níveis de conteúdo lignocelulósico. Assim, o amido presente na sua composição pode ser convertido, através de pré-tratamentos (químicos ou enzimáticos), em glicose, que pode ser empregada como fonte de carbono para o crescimento de microrganismos. O conteúdo lignina é relativamente baixo em comparação a outros resíduos, fato que facilita a hidrólise enzimática (REISINGER et al., 2014).

A utilização do farelo de trigo é de grande interesse, uma vez que existem diferentes possibilidades para se obter novos produtos de valor agregado. O processo de hidrólise do farelo de trigo pode degradar os polissacarídeos complexos (amido, celulose e hemiceluloses) presentes na sua estrutura em açúcares simples (APPRICH et al., 2014). Favaro, Basaglia e Casella (2012) analisaram a hidrólise enzimática do farelo de trigo e obtiveram 376,1 g de açúcares / Kg de farelo, os quais foram utilizados em processo fermentativo para a produção de bioetanol.

Em virtude da sua elevada concentração de hemiceluloses, o farelo de trigo também para ser empregado como matéria prima para a produção de xilitol. Canilha et al. (2008) submeteram o farelo de trigo à hidrólise ácida e em seguida converteram a xilose liberada em xilitol (aproximadamente 95 %) empregando a levedura *Candida guilliermondii* FTI 20037.

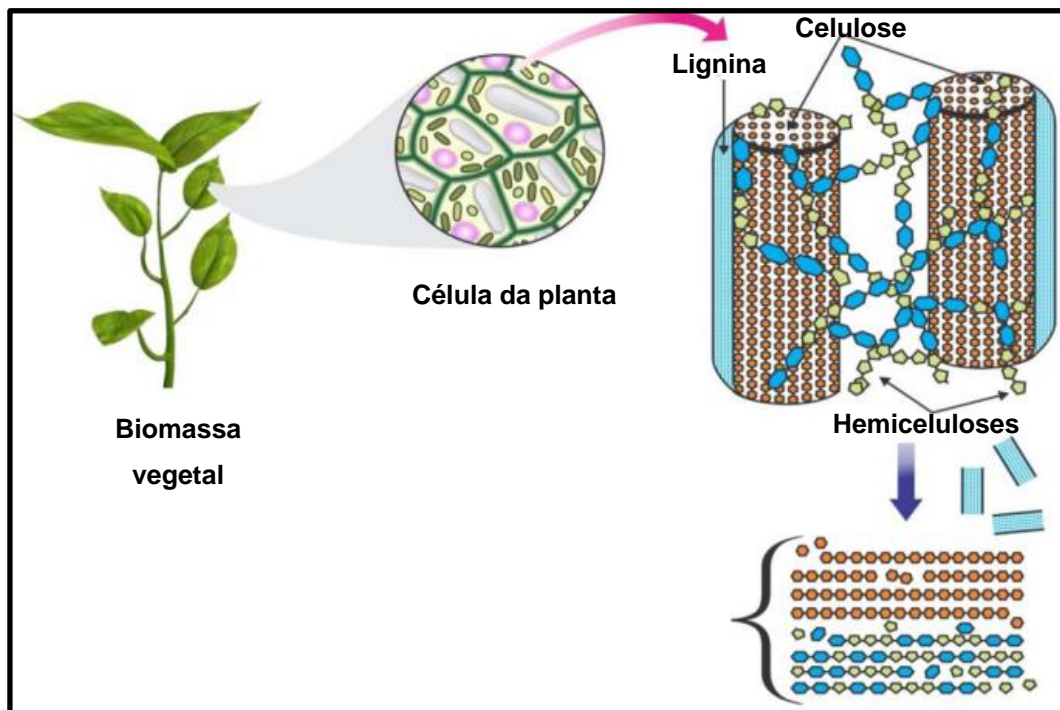
2.2 MÉTODOS DE PRÉ-TRATAMENTO DOS RESÍDUOS LIGNOCELULÓSICOS

Os métodos de pré-tratamento dos resíduos lignocelulósicos são imprescindíveis para o sucesso de um processo de sacarificação destes materiais. Segundo Sindhu, Binod e Pandey (2016), a etapa de pré-tratamento representa 40 % do custo total do processo de sacarificação, e portanto, técnicas empregadas de forma incompatível com a biomassa podem tornar o processo inviável, em virtude do seu alto custo, longo tempo de duração e formação de produtos inibitórios (BHUTTO et al., 2017).

Segundo Akhtar et al. (2016) um pré-tratamento efetivo se caracteriza por expor as fibras de celulose, proporcionando melhores condições ao ataque enzimático, diminuir custos de produção e a geração de sub-produtos, preservar as fibras de celulose e hemiceluloses e amenizar a produção de produtos inibitórios.

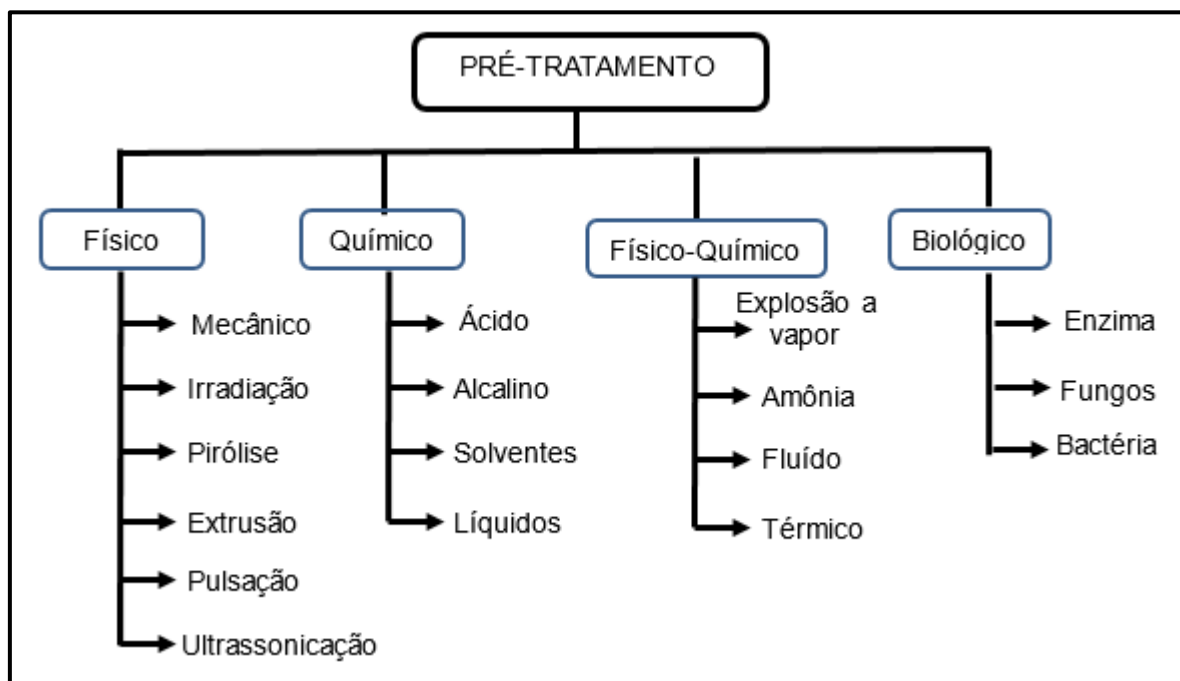
Vários métodos de pré-tratamento empregados em resíduos lignocelulósicos têm como objetivo desorganizar a estrutura da sua parede celular, desestruturando o complexo celulose-hemicelulose-lignina, liberando a celulose e as hemiceluloses para a produção de açúcares fermentescíveis a serem empregados como substratos para obtenção de novos produtos via processo fermentativo (MOOD et al., 2013). Na Figura 7 está apresentado um esquema ilustrando a desestruturação do complexo lignocelulósico.

Figura 7 - Esquema ilustrando a desestruturação do complexo lignocelulósico provocado por um pré-tratamento da biomassa vegetal



Fonte: AKHTAR et al. (2016).

Segundo Akhtar et al. (2016), os métodos de pré-tratamento podem ser classificados em físicos, químicos, físico-químico e biológico, os quais apresentam as mais variadas técnicas que podem ser empregadas durante o processo (Figura 8).

Figura 8 - Tipos de pré-tratamentos e suas respectivas técnicas

Fonte: Adaptado de AKHTAR et al. (2016).

Os resíduos agroindustriais também podem ser usados para a extração da celulose, matéria-prima que apresenta várias propriedades de interesse, tais como elevada rigidez, resistência, estabilidade térmica, química e física, o que consequentemente permite a sua aplicação em diversos processos sob diferentes condições operacionais (UMMARTYOTIN; MANUSPIYA, 2015).

Além do uso da celulose, na última década tem havido um grande interesse na pesquisa e desenvolvimento de materiais e nanomateriais obtidos a partir de fontes renováveis para as mais diferentes aplicações. O processo de hidrólise ácida tem sido amplamente estudado para a obtenção de nanocelulose. As regiões cristalinas das fibras de celulose são mais resistentes à hidrólise ácida do que as regiões amorfas, que podem ser então removidas, gerando materiais com maior cristalinidade e maior capacidade de interação, já que apresentam um aumento da sua área superficial (ABDUL KHALIL et al., 2014).

Entretanto, para a obtenção destes materiais e nanomateriais emprega-se uma quantidade elevada de soluções básicas ou ácidas no branqueamento dos resíduos lignocelulósicos e na hidrólise ácida, propriamente dita da celulose envolve longos tempos de reação e baixos rendimentos de produção, assim como são

geradas grandes quantidades de efluentes nas etapas de lavagem ao final da sua produção (HAAJ et al., 2013). Portanto, a busca por processos menos poluentes para a obtenção destes materiais é um desafio nesta área, podendo resultar em tecnologias sustentáveis para a sua obtenção, a partir de diferentes matérias-primas.

2.2.1 Métodos Físicos de Pré-tratamento dos Resíduos Lignocelulósicos

Geralmente, os métodos físicos de pré-tratamento dos resíduos lignocelulósicos são mais brandos que os químicos e físico-químicos, e podem ser utilizados em combinação com outros tipos de pré-tratamentos, e uma das vantagens é a ausência de efluentes. As técnicas que podem ser empregadas nos tratamentos físicos encontram-se citadas na Figura 8 e descritos na Tabela 1 (BRINCHI et al., 2013; MOOD et al., 2013; PRÜCKLER et al., 2014).

Tabela 1 - Descrição dos pré-tratamentos físicos para resíduos lignocelulósicos

Pré-tratamentos físicos	Características	Vantagens	Desvantagens
Moagem	Uso de moinhos específicos. Reduz a cristalinidade, tamanho da partícula e grau de polimerização.	Reduz o tamanho da partícula. Utilizado.	Elevado consumo de energia
Irradiação	Uso de raios gama e feixes de elétrons. Quebra das fibras e redução do peso molecular dos oligossacarídeos	Melhora a hidrólise enzimática e aumenta o rendimento de açúcares redutores.	Alto custo e dificuldade de aplicação industrial
Extrusão	Emprega elevada temperatura e pressão, através de uma extrusora. Proporciona desfibrilação da celulose.	Melhora a hidrólise enzimática, acesso a celulose e aumenta o rendimento de açúcares redutores	Alto custo
Ultrassonicação	Ondas ultrassônicas geram cavitação em líquidos, levando à colisão entre as partículas, que resultam em alterações da estrutura da biomassa	Baixa degradação da celulose, baixo custo e aumento da acessibilidade da celulose à ação de enzimas	Difícil utilização em larga escala
Pulsção elétrica	O campo elétrico proporciona a quebra da parede celular da biomassa	Melhora a transferência de massa. Pode ser realizado em temperatura ambiente e baixa energia.	Inativação de enzimas.

Fonte: Adaptado de AKHTAR et al. (2016)

Dentre os pré-tratamentos físicos, os mecânicos são altamente relatados na literatura, nos mais diversos resíduos. A moagem é geralmente considerada como o pré-tratamento inicial, sendo que vários tipos de moinhos (dois rolos, martelo, trituração e de disco) estão relatados e o tamanho final da partícula depende do tipo de moagem empregada (MOOD et al., 2013).

Mustafa et al. (2017) analisaram os efeitos da moagem prévia ao tratamento enzimático para a produção de biogás, utilizando a palha de arroz como substrato. De acordo com os resultados, o resíduo previamente moído submetido a 30 dias de tratamento biológico, proporcionou um aumento de 165 % no rendimento de metano, em comparação ao resíduo não tratado.

Yang et al. (2008) utilizaram a radiação gama como pré-tratamento do farelo de trigo e observaram um aumento no rendimento da glicose de 13 % a mais que o resíduo não tratado. Merci et al. (2015) produziram celulose microcristalina utilizando o método de extrusão reativa, a partir da casca de soja. Onal, Uzun e Putun (2017) observaram um maior rendimento do biodiesel, quando empregado a pirólise como pré-tratamento da casca da amêndoa.

2.2.1.1 Ultrassonicação como pré-tratamento dos resíduos lignocelulósicos

A ultrassonicação é uma tecnologia emergente para o pré-tratamento da biomassa vegetal, visa diminuir o tempo de reação para a deslignificação e a quantidade de reagente empregada durante o processo. Além disso, aumenta o rendimento dos açúcares glicose, xilose, entre outros (LIYAKATHALI et al., 2016).

O pré-tratamento por ultrassonicação utiliza a associação dos efeitos vibração mecânica e sonoquímicos na biomassa, os quais visam a alteração na sua estrutura superficial e produção de radicais antioxidantes que promovem alterações físicas e químicas nos componentes da fibra, respectivamente (BHUTTO et al., 2017).

O efeito das ondas eletromagnéticas na ultrassonicação é atribuído ao fenômeno de cavitação, o qual é proporcional a frequência empregada, sendo essa de 10 kHz a 20 MHz. Segundo Bhutto et al. (2017), durante a cavitação pode se observar a presença de um aumento de temperatura e pressão, em virtude do colapso das bolhas, o qual libera uma grande quantidade de energia. Nessas condições a estrutura cristalina do material sólido pode ser destruída através da fusão ou colisão das partículas, melhorando o processo de deslignificação e a disponibilidade dos polissacarídeos para hidrólise.

No método de ultrassonicação alguns parâmetros podem influenciar no aumento do processo de deslignificação e rendimento dos açúcares, tais como, modo de ultrassonicação (contínuo ou pulsado), frequência, processo, temperatura, solvente, aeração, dentre outros (BHUTTO et al., 2017).

Segundo Subhedar, Ray e Gogate (2017) os tratamentos usuais para o tratamento das deslignificação demandam elevado tempo e utilizam uma grande quantidade de reagentes. Portanto, a associação da ultrassonicação com o uso de

reagentes ácidos ou alcalinos, por exemplo, pode amenizar esse quadro. Os autores analisaram os efeitos da ultrassonicação associada ao tratamento alcalino e hidrólise enzimática de três resíduos (casca de amendoim, casca de coco e casca de pistache). Em todas as amostras, os autores observaram uma melhora significativa no processo de deslignificação e produção de açúcares fermentescíveis pela hidrólise enzimática.

2.2.2 Métodos Químicos de Pré-tratamento dos Resíduos Lignocelulósicos

Dentre os métodos químicos utilizados (Tabela 2), até o presente momento, a hidrólise ácida e a alcalina são os mais explorados e relatados na literatura. O pré-tratamento ácido dissolve a lignina e a hemicelulose, deixando a celulose mais acessível, mediante o uso de ácidos concentrados ou diluídos, enquanto os pré-tratamentos alcalinos levam à quebra da ligação éster entre lignina, celulose e hemiceluloses, sem degradação das hemiceluloses (AKTHAR et al., 2016).

Tabela 2 - Descrição dos pré-tratamentos químicos para os resíduos lignocelulósicos

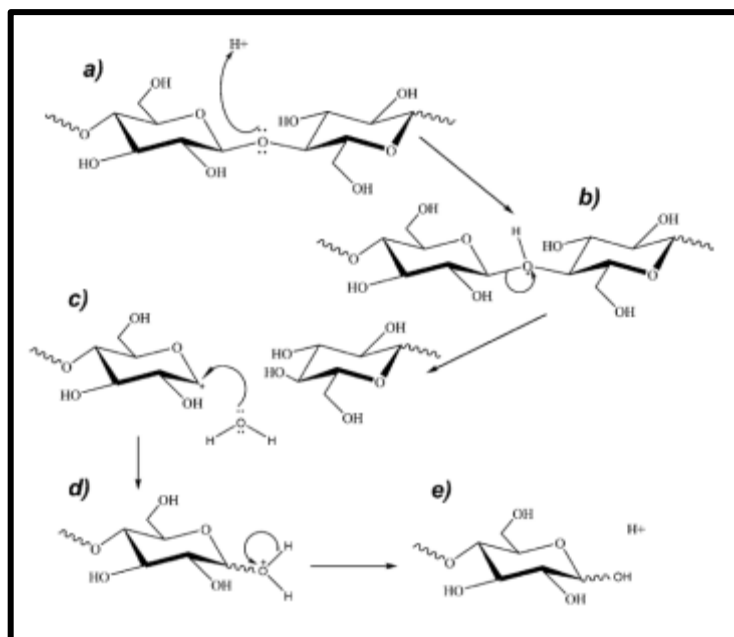
Pré-tratamentos físicos	Características	Vantagens	Desvantagens
Ácido	Realizada com ácidos diluídos em altas temperaturas, ou ácido concentrado com baixas temperaturas	Técnica simples e efetiva para a quebra da hemicelulose com alto rendimento de açúcar.	Processo de recuperação do ácido apresenta alto custo. Geração de componentes inibitórios.
Alcalino	Utiliza altas concentrações de reagente alcalinos em baixas temperaturas, por longo tempo	Efetivo para a quebra de ligação éster entre lignina, celulose e hemiceluloses, sem degradação das hemiceluloses	Alto custo, degradação da celulose
Solventes orgânicos	Utiliza solvente orgânico líquido e água quente para dissolver a lignina e a hemicelulose, preservando a celulose na fase sólida.	Recuperação da lignina e efetivo para o tratamento de madeira.	Elevado investimento, formação de compostos tóxicos e recuperação do solvente
Líquido iônico	Utiliza líquidos iônicos, os quais são substâncias compostas de íons e líquidas (<100 °C) à temperatura ambiente	Reuso do líquido iônico após o processo Substrato final com digestibilidade >90%	Alto custo dos líquidos iônicos

Fonte: AKHTAR et al. (2016); OGEDA; PETRI (2010)

2.2.2.1 Pré-tratamento ácido

Segundo Xiang et al. (2003) durante a hidrólise realizada pelo o ácido sulfúrico (H_2SO_4) na celulose ocorre uma reação heterogênea, a qual engloba fatores físicos e a reação química hidrolítica. O mecanismo molecular da clivagem das ligações β (1 \rightarrow 4) por ácidos encontra-se ilustrado na Figura 9.

Figura 9 - Mecanismo da hidrólise ácida na celulose



Fonte: XIANG et al. (2003).

No início da reação, ocorre a protonação do oxigênio glicosídico (Figura 9 a), o qual encontra-se entre duas unidades de glicose, formando um ácido conjugado (Figura 9 b). A clivagem da ligação C-O e a quebra do ácido conjugado, ocorre a formação de um carbocátion, o qual é estabilizado pela deslocação de par de elétrons existente sobre o oxigênio do anel glicosídico, adjacente a C1. Por fim, depois do ataque nucleofílico da água sobre C1 (Figura 9 c) com regeneração do ácido (Figura 9 d e 9 e) o processo de despolimerização é encerrado, com a produção de glicose (XIANG et al., 2003).

Entre os ácidos diluídos, o ácido sulfúrico é o de primeira escolha, em virtude de seu menor preço e por apresentar poucos problemas com corrosão quando comparado a outros ácidos. O uso de ácidos diluídos minimiza os riscos de corrosão dos equipamentos e proporciona alta taxa de recuperação de produtos químicos. O uso de ácido diluído deve ser combinado com elevadas temperaturas (180-230 °C) para se atingir a degradação completa da celulose e altos rendimentos de glicose (AKHTAR et al., 2016).

Segundo Ogeda e Petri (2010), em pré-tratamentos realizados com associação de altas temperaturas e ácido sulfúrico, as cadeias de celulose são degradadas em seu monômero, ou seja, moléculas de glicose, as quais podem ser degradadas em hidroximetil furfural. Em virtude da sua estrutura cristalina

predominante, a celulose necessita de elevada temperatura e altas concentrações de ácidos para a desassociação das moléculas de glicose. Ao contrário da celulose, a degradação das hemiceluloses requer condições mais brandas para liberação dos seus açúcares.

O emprego da hidrólise com ácido diluído em resíduo lignocelulósico está sendo explorado por diversos autores para a obtenção dos mais variados produtos. Cuevas et al. (2015) analisaram diferentes métodos de pré-tratamento (água aquecida, ácido sulfúrico e solventes orgânicos) do caroço de azeitona para posterior sacarificação do mesmo. A associação de ácido sulfúrico e solventes orgânicos foi efetiva e aumentou em 83 % o conteúdo de celulose. Henrique et al. (2013) produziram nanocristais de celulose utilizando a hidrólise ácida a partir do caroço de manga, com o objetivo de empregá-los como material de reforço de nanocompósitos.

2.2.2.2 Pré-tratamento alcalino

O pré-tratamento alcalino tem como objetivo remover a lignina para a liberação da celulose e das hemiceluloses. A deslignificação ocorre com o rompimento da ligação éster entre a lignina e as hemiceluloses, aumentando consequentemente a porosidade do material. O mecanismo de ação da hidrólise alcalina consiste em realizar a dissolução da lignina e das hemiceluloses, e a saponificação das ligações ésteres entre os constituintes. A retirada da lignina e das hemiceluloses proporciona um aumento da cristalinidade dos resíduos (KIM; LEE; KIM, 2016).

Os principais reagentes utilizados são o hidróxido de sódio (NaOH), hidróxido de potássio (KOH), hidróxido de cálcio (CaOH_2) e amônia (RASHID et al., 2011). Entre estes, o hidróxido de sódio tem recebido uma atenção especial em virtude da sua alta capacidade de deslignificação, a qual é essencial para atingir a alta digestibilidade da biomassa (SINGH; SUHAG; DHAKA, 2015).

Um dos passos cruciais para a hidrólise alcalina é a neutralização após o processo, a qual visa remover a lignina e os compostos inibitórios, tais como, sais, ácidos fenólicos, furfural e aldeídos. A liberação lenta do hidróxido de sódio durante a lavagem é um grande problema durante a neutralização, pois demanda uma

grande quantidade de água e muito tempo. Uma neutralização eficaz garante a máxima atuação da enzima (BHUTTO et al., 2017). Rashid et al. (2011) observaram que entre os diferentes pré-tratamentos empregados (ácido nítrico, ácido sulfúrico e hidróxido de sódio a 3%), o hidróxido de sódio proporcionou condição mais eficaz para melhorar a sacarificação enzimática (KIM; LEE; KIM, 2016).

2.2.3 Métodos Físico-Químicos de Pré-tratamento dos Resíduos Lignocelulósicos

Os métodos físico-químicos de pré-tratamento dos resíduos lignocelulósicos utilizam associação de métodos físicos e químicos visando aumentar a digestibilidade da biomassa lignocelulósica. Alguns desses métodos encontram-se descritos na Tabela 3.

Tabela 3 - Descrição dos pré-tratamentos físico-químicos para os resíduos lignocelulósicos

Pré-tratamentos	Características	Vantagens	Desvantagens
Explosão a vapor	Força termo-mecânica resulta em ruptura de biomassa pela repentina liberação de pressão gerada pela saída de vapor.	Baixo custo e alto rendimento	Incompleta degradação da lignina e geração de compostos inibitórios.
Explosão com amônia	A biomassa é submetida a um reagente com amônia em um processo com alta temperatura por poucos minutos, seguido da redução da pressão em seguida	Baixa formação de compostos inibitórios.	Alto custo da amônia e recuperação do reagente. Baixa solubilização da celulose.
Fluído supercrítico	Explosão com fluido supercrítico promove a abertura dos poros da biomassa.	Baixa degradação da celulose, baixo custo e aumento da acessibilidade da celulose	Requerida alta pressão, baixa deslignificação e retirada da hemicelulose

Fonte: AKHTAR et al. (2016)

2.2.3.1 Explosão a vapor

O método de explosão a vapor tem sido empregado com sucesso para o tratamento de diversas biomassas lignocelulósicas. O processo se caracteriza por utilizar altas temperaturas e pressão durante alguns segundos ou poucos minutos. Pode ser realizado com ou sem a presença de ácidos, sendo que a utilização de 1 % do catalisador aumenta relativamente o processo de deslignificação (BHUTTO et al., 2017).

Durante o processo, a elevada pressão empregada causa a expansão da biomassa, ocasionando a ruptura das suas fibras. Esse processo é influenciado por alguns fatores, tais como, tempo de duração, tamanho da partícula e umidade do resíduo. O melhoramento da sacarificação, a qual corresponde a etapa seguinte ao pré-tratamento, está relacionado com os efeitos físicos no resíduo. Embora seja um método eficiente, essa técnica pode proporcionar uma demanda de produtos inibitórios ao processo fermentativo (AKHTAR et al., 2016). Para remoção dos compostos inibitórios, a amostra tratada é lavada com água, aproximadamente 20 a 25 % da amostra seca é removida com água, este fato diminui consideravelmente o rendimento do processo de sacarificação (BHUTTO et al., 2017).

De acordo com Akhtar et al. (2016), o método de explosão a vapor na presença de reagentes vem sendo aplicado frequentemente para a obtenção de açúcares fermentescíveis, através do uso de matérias-primas de origem agroindustrial, tais como, madeira, sabugo de milho, farelo de trigo, visando a obtenção de bioetanol, butano e metano. Ballesteros et al. (2006) empregaram diferentes condições de pré-tratamento por explosão a vapor para o farelo de trigo visando a produção de bioetanol. Os autores observaram que as melhores condições foram de 190 °C e 10 min ou 200 °C e 5 min, com ácido impregnado no resíduo. Tais condições proporcionaram maiores rendimentos na conversão em etanol e açúcares disponíveis.

Tomás-Pejó et al. (2017) observaram que o pré-tratamento por explosão a vapor para a co-produção de bioetanol e biodiesel, a partir do farelo de trigo, apresentou um efeito positivo no rendimento de ambos os biocombustíveis. Auxenfans et al. (2017) utilizaram o método de explosão a vapor associada com ácido sulfúrico diluído para o pré-tratamento do farelo de trigo, e observaram que o

pré-tratamento diminuiu significativamente o conteúdo de hemiceluloses e lignina da biomassa, proporcionando melhores condições para a sacarificação enzimática.

2.2.4 Métodos Biológicos de Pré-tratamento dos Resíduos Lignocelulósicos

Os pré-tratamentos biológicos se caracterizam por utilizar microrganismos e/ou enzimas capazes de degradar a lignina e as hemiceluloses para o pré-tratamento da biomassa. Esses métodos são de grande interesse, por serem sustentáveis e economicamente viáveis. Além disso, não são utilizados reagentes químicos, assim não há necessidade de processo de recuperação do solvente e não há liberação de compostos tóxicos ao ambiente, e em devido as condições amenas empregadas durante o processo, as etapas seguintes de sacarificação não serão inibidas (SINDHU; BINOD; PANDEY, 2016).

Quando são empregados microrganismos, para a degradação da lignina é necessária a produção de enzimas lignolíticas microbianas, tais como, lacase, manganês peroxidase e lignina peroxidase. Essas enzimas geralmente são produzidas pelos basidiomicetos, dentre os quais os fungos de podridão branca, fungos de podridão marrom e fungos da madeira maciça são os microrganismos mais utilizados (SINDHU; BINOD; PANDEY, 2016).

Os fungos de podridão marrom e de madeira maciça degradam de forma incompleta a lignina, sendo efetivos para a degradação da celulose e hemicelulose. *Serpula lacrymans*, *Coniophora puteana*, *Meruliporia incrassata*, *Laetoporus sulphureus*, *Gleophyllum trabeum*; e *Paecilomyces sp.*, *Cadophora spp.* são os representantes desses grupos, respectivamente (AKHTAR et al., 2016).

Os fungos de podridão branca se caracterizam por apresentarem uma alta taxa de deslignificação, a qual influencia diretamente na produção de açúcares fermentescíveis. Segundo Akhtar et al. (2016) os fungos *Hanerochaete chrysosporium*, *Pycnoporus cinnabarinus*, *Phlebiaspp.* *Echinodontium taxodii*, *Irpex lacteus* e *Pycnoporus sanguineus* degradam especificamente a lignina. Enquanto, que os fungos *Ceriporiopsis subvermispora*, *Phlebia brevispora*, *P. Floridensis*, *P. radiata*, *Echinodontium taxodii*, *Euc-1*, *Gonodermasp.*, *Oxysporussp.*, *Trametes versicolor*, *Pleurotus sajor-caju* e *Trichoderma reesei* degradam níveis de carboidratos e apenas 40 a 60 % da lignina.

Os fungos promovem a degradação da lignina por via anaeróbica, através de enzimas extracelulares (lacase, manganês peroxidase e lignina peroxidase), as quais são reguladas por fontes de carbono e nitrogênio, sendo produzidas como metabólitos secundários desses microrganismos (KUMAR; WYMAN, 2009). A eficiência da degradação biológica pode ser influenciada por diversos fatores, desde parâmetros vinculados ao processo (taxa de aeração, pH, tempo e temperatura de incubação), a biomassa (natureza, composição da biomassa e umidade) e ao microrganismo de escolha (fungos, bactérias e concentração do inoculo) (BHUTTO et al., 2017).

Monrroy et al. (2011) analisaram o efeito do pré-tratamento biológico sobre *Pinus radiata* e *Eucalyptus globulu*, pelos fungos *Gloephyllum trabeum* e *Laetoporeus sulphureus*. Os autores observaram mudanças estruturais em ambas as biomassas, sendo que *G. trabeum* degradou maior taxa de hemiceluloses e apresentou maior rendimento na hidrólise enzimática que *Laetoporeus sulphureus*.

Apesar das inúmeras vantagens do processo biológico, o mesmo ainda apresenta baixa taxa de rendimento de açúcares e requer um longo período. Por isso, várias pesquisas visam o melhoramento do processo, como a associação de microrganismos (fungos e bactérias), modificação genética de microrganismos e até mesmo a associação com outros métodos de pré-tratamentos (KUMAR; WYMAN, 2009).

2.3 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DA CELULOSE E NANOCELULOSE DE RESÍDUOS LIGNOCELULÓSICOS

Os resíduos agroindustriais podem ser usados para a extração da celulose, importante componente da parede celular destes materiais. A celulose obtida a partir de resíduos agroindustriais apresenta várias propriedades de interesse, tais como alta rigidez, resistência, bem como elevada estabilidade térmica, química e física, o que consequentemente permite a sua aplicação em diferentes processos sob diferentes condições operacionais (UMMARTYOTIN; MANUSPIYA, 2015). Além disso, há o interesse na atualidade na obtenção da nanocelulose a partir da celulose. O termo nanocelulose refere-se à materiais celulósicos, oriundos de

diferentes fontes lignocelulósicas, que apresentam dimensões em escala nanométricas (SLAVUTSKY; BERTUZZI, 2014).

Entre as características das nanoceluloses evidenciam-se a sua baixa densidade, elevada cristalinidade, biodegradabilidade, biocompatibilidade, alta resistência mecânica e térmica. Além disso, em virtude dos seus grupamentos hidroxilas na superfície podem ser quimicamente modificadas, fato que aumenta ainda mais as suas possibilidades de aplicação (MOON et al., 2011; BRINCHI et al., 2013). Estes materiais podem ser produzidos por diferentes métodos, a partir de diversas fontes lignocelulósicas. São relatados dois tipos de nanocelulose na literatura, as nanofibras de celulose e os nanocristais. Na tabela 4, encontram-se as diversas denominações dessas matérias e as suas principais diferenças.

Tabela 4 - Tipos de nanoceluloses

Nomenclatura	Abreviações	Distribuição de tamanho
Nanocristais de celulose, nanocristalito de celulose, <i>nanowhiskers</i> de celulose	CNC, NCC, CNXL, XNL, CNW	Diâmetro: 5 – 100 nm Comprimento: 50 a 500 nm (vegetal) e 100 nm a vários micrômetros (algas, tunicados)
Nanofibras de Celulose, Celulose nanofibrilada, Celulose microfibrilada	CNF, NFC	Diâmetro: 5 – 100nm Comprimento: vários micrômetros

Fonte: ABDUL-KHALIL; BHAT; YUSRA (2012); KAUSHIK; MOORES (2016)

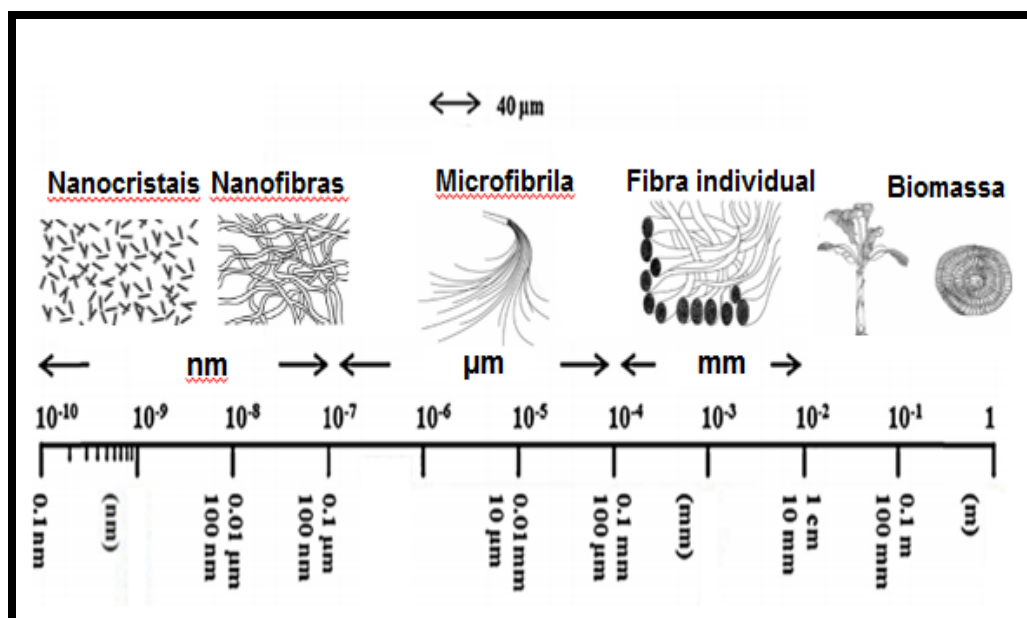
Os nanocristais de celulose (NCC) caracterizam-se por apresentarem forma cilíndrica e cristalina, com flexibilidade reduzida. Possuem um diâmetro típico de 5 a 100 nm e comprimentos que variam entre 50 a 500 nm. São constituídos por 100 % de celulose e possuem alta cristalinidade (54 a 88 %). Obtidos principalmente a partir da hidrólise ácida das fibras de celulose. Os nanocristais podem ser extraídos de diversas fontes vegetais. Nascimento et al. (2014) otimizaram a extração de nanocristais de celulose a partir de fibras extraída do coco verde, os materiais obtidos apresentaram cerca de 172 nm de comprimento e 8 nm de diâmetro.

As nanofibras de celulose (NFC) apresentam diâmetros menores que 100 nm e comprimentos de vários micrômetros, apresentam regiões amorfas e cristalinas e flexibilidade estrutural devido à sua elevada razão de aspecto (razão L/D), que é

definida pela relação entre o comprimento (L) da fibra e o seu diâmetro (D). A razão de aspecto para a celulose nanofibrilada varia de 100 a 150, enquanto que os nanocristais apresentam razões de aspecto entre 10 e 100 (ABDUL-KHALIL; BHAT; YUSRA, 2012).

Na Figura 10 encontra-se um esquema hierárquico a partir da biomassa lignocelulósica da madeira até a nanocelulose, e as suas respectivas escalas (ABDUL KHALIL et al., 2014; FERNANDES et al., 2013).

Figura 10 - Esquema hierárquico a partir da biomassa da madeira até a nanocelulose



Fonte: ABDUL KHALIL et al. (2014); FERNANDES et al. (2013).

Quando são empregados resíduos lignocelulósicos para a obtenção de nanocelulose, a primeira etapa consiste da extração da celulose do complexo celulose-hemicelulose-lignina, isto é, o desmembramento deste complexo por meio de técnicas de deslignificação e pré-tratamentos, sem a destruição das fibras celulósicas. Desta forma, é possível separar seletivamente a lignina e as hemiceluloses, removendo-as da fibra por métodos químicos, térmicos, físicos, biológicos, ou por combinações destes. O emprego dos métodos depende da qualidade de separação que se deseja obter (SILVA et al., 2009).

Como pode ser observado na Tabela 5, muitas técnicas podem ser empregadas para a extração da fase amorfa, constituída de lignina e hemiceluloses.

Segundo Ng et al. (2016), dentre as técnicas de purificação, o tratamento alcalino é o mais empregado, e o mecanismo se baseia na despolimerização de parte da lignina e a hidrólise das ligações de hidrogênio entre os grupos -OH das hemiceluloses. Além disso, ocorre a ruptura das ligações de hidrogênio da fibra, por ionizar os grupos -OH. É um método eficaz para a remoção de lignina e hemiceluloses, e conseqüentemente aumenta a exposição da celulose. Entretanto, remove parcialmente as impurezas presentes na superfície das fibras, tais como, pectinas, ceras, óleos, entre outras. O tratamento alcalino muitas vezes pode ser associado a um digestor e ou autoclave, visando uma maior eficácia do processo (NG et al., 2016).

Tabela 5 - Técnicas de extração da celulose da parede celular.

Métodos	Parâmetros
Tratamento alcalino	- Solução alcalina de hidróxido de sódio - Digestor (autoclave) - Solução de antraquinona
Branqueamento	- Solução de clorito de sódio - Hipoclorito de sódio - Peróxido de hidrogênio
Explosão a vapor	- Uso de autoclave ou digestor.
Irradiação de feixes de elétrons	- Irradiação acima de 300 kGy
Tratamento enzimático	- Endoglucanases - Celobiohidrolases
Hidrólise Ácida	- Ácido Sulfúrico - Ácido hipoclorídrico - Ácido peracético

Fonte: Adaptado de NG et al. (2016).

O processo de branqueamento com peróxido de hidrogênio, também é um método de grande interesse para a degradação da lignina e hemiceluloses. Apresenta baixo custo e provoca a oxidação da lignina e conseqüentemente a descoloração da mesma de forma eficiente. Além disso, outras reações acontecem

nesse processo, como a ruptura dos anéis aromáticos e hidrólise da lignina, ou até mesmo a conversão dos grupos fenólicos da lignina em aldeídos, quinonas e carbonila (MANCERA et al., 2010).

Após degradação da região amorfa, a fibra purificada pode ser processada para ser obtida em escala nanométrica, por vários métodos biotecnológicos e nanotecnológicos, tais como, hidrólise ácida, homogeneização, fluidização, esmirelhamento, ultrassonicação, tratamento enzimático entre outros. Segundo Ng et al. (2016) os métodos mais utilizados são a hidrólise ácida e a desfibrilação mecânica. Na hidrólise ácida a região amorfa da celulose é degradada, originando a nanocelulose.

Fahma et al. (2016) produziram nanocristais de celulose a partir de fibras de cana de açúcar utilizando hidrólise ácida. Os autores observaram que os nanocristais submetidos ao processo de neutralização dos íons de sulfato com NaOH, proporcionaram melhorias significativas nas propriedades mecânicas dos filmes. Nepomuceno et al. (2017) extraíram nanowhiskers de celulose de *Cereus jamacaru*, conhecido como cacto nativo da caatinga de nordeste do Brasil. Os autores empregaram tratamento alcalino e branqueamento, seguidos de hidrólise ácida para a produção de nanowhiskers de celulose. Os autores observaram que as três etapas foram necessárias para a remoção da matrix amorfa e a produção de nanocristais de celulose com tamanhos de 260 a 400 nm.

Vários métodos têm sido relatados na literatura para a obtenção da celulose nanofibrilada, como homogeneização de alta pressão (JONOOBI et al., 2009), moagem (HASSAN et al., 2011), microfluidização (FERRER et al., 2012), ultrassonicação (QUA et al., 2011). Os tratamentos químicos ou enzimáticos podem ser combinados aos mecânicos. Zimmermann, Pohler e Geiger (2004) obtiveram celulose nanofibrilada pela combinação da hidrólise ácida associada à homogeneização. Paschoal et al. (2015) produziram celulose nanofibrilada a partir da casca da aveia empregando hidrólise ácida e ultrassonicação e obtiveram nanofibras de celulose com 70 a 100 nm de diâmetro e comprimentos de vários micrômetros.

Entretanto, para a obtenção destes nanomateriais emprega-se uma quantidade elevada de soluções básicas ou ácidas no branqueamento (dos resíduos lignocelulósicos) e a hidrólise ácida propriamente dita da celulose envolve longos tempos de reação e baixos rendimentos de produção, assim como são geradas

grandes quantidades de efluentes nas etapas de lavagem ao final da sua produção (CARDOSO et al., 2013). Portanto, a busca por processos menos poluentes para a obtenção destes materiais é um desafio nesta área, podendo resultar em tecnologias sustentáveis para a sua obtenção a partir de diferentes matérias-primas.

Segundo Cardoso et al. (2013) o método de extrusão reativa para a produção de nanocelulose apresenta uma redução do tempo de reação e gera uma menor quantidade de efluentes. O processo de extrusão reativa foi empregado de forma efetiva por Merci et al. (2015) para a produção de celulose microcristalina a partir da casca de soja. Os autores concluíram que o processo de extrusão é um método efetivo para a produção de celulose microcristalina, além de gerar uma menor quantidade de efluentes e com menor custo que os métodos tradicionais.

2.3.1 Extrusão Reativa Para Extração De Celulose e Nanocelulose

A extrusão reativa tem sido relatada como um processo viável para a modificação química de polímeros. A modificação das fibras pode ser realizada por extrusão, através da combinação de ácidos, calor, pressão, temperatura e cisalhamento. Dessa forma, há um ganho significativo em eficiência, combinando-se os processos de mistura e modificação química em uma etapa única, sem a geração de efluentes, o que favorece a viabilidade comercial do produto, a um preço competitivo (LIU et al., 2009).

Basicamente, neste método, rapidamente o vapor e a alta pressão proporcionam o aquecimento e a redução de tamanho da biomassa. Em seguida, a pressão é reduzida o que proporciona a descompressão do material (TALEBNIA; KARAKASHEV; ANGELIDAKI, 2010). A adição de um catalisador (ácido ou base) visa aumentar a disponibilidade da celulose da biomassa, diminuir o tempo e a temperatura de processo e facilitar a ação das enzimas utilizadas durante a fermentação (SINGH; SUHAG; DHAKA, 2015).

O processo de extrusão reativa para a extração de celulose e nanocelulose é inovador, atraente e recente, onde a biomassa lignocelulósica é submetida alterações físico-químicas durante a passagem pela extrusora. Acredita-se que a velocidade do parafuso e a temperatura acarretam desfibrilação, e encurtamento das fibras de lignina, perturbando a estrutura e proporcionando maior acesso a celulose

(CHEN et al., 2011). Este tratamento foi investigado pela primeira vez nos anos 80 para resíduos de culturas, serragem e resíduos sólidos urbanos em presença de ácido sulfúrico diluído. Lamsal et al., (2010) e Yoo et al., (2011) descreveram um processo semelhante utilizando uma extrusora duplo parafuso e ácido sulfúrico concentrado.

O processo de extrusão reativa vem sendo explorado por vários pesquisadores para o pré-tratamento da biomassa com resultados satisfatórios. Fan et al. (2014) compararam dois métodos para o pré-tratamento (extrusão reativa com ácido diluído e hidrólise ácida) do sabugo de milho. Os autores verificaram que o processo de extrusão reativa proporcionou uma maior recuperação da xilose e conversão da celulose. Além disso, a extrusão reativa aumentou a eficiência da hidrólise enzimática.

De acordo Moon et al. (2011) e Brinchi et al. (2013) as nanoceluloses apresentam várias aplicações, tais como reforços em materiais poliméricos, implantes biomédicos, excipientes farmacêuticos e veículos de fármacos, fibras têxteis, moldes para componentes eletrônicos, separação membranas, baterias, supercapacitores, blocos de construção, polímeros eletroativos, entre outros. Além disso, devido a sua alta capacidade de interação, as nanoceluloses podem ser modificadas com a inserção de grupamentos químicos com atividade antimicrobiana, como por exemplo, as nanopartículas de prata. As fibras e nanofibras de celulose com propriedades antimicrobianas podem ser empregadas para a produção de embalagens ativas, que têm como objetivo prolongar o tempo de vida útil dos alimentos e diminuir a transmissão de microrganismos patogênicos (SEYDIM; SARIKUS, 2006).

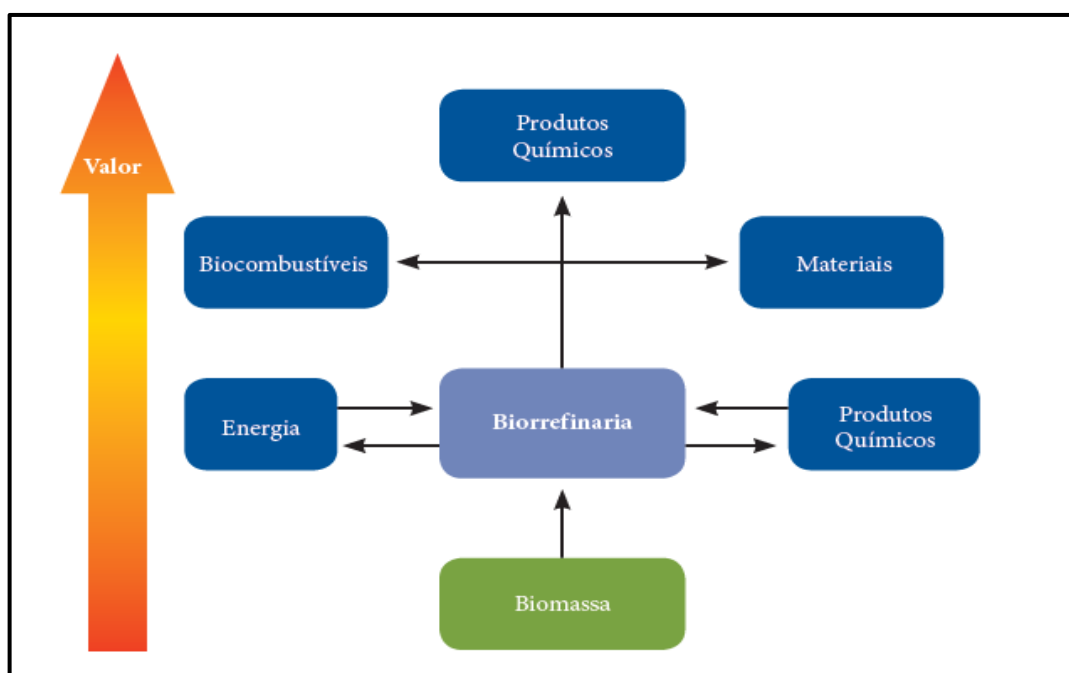
2.4 CONCEITO DE BIORREFINARIAS E O APROVEITAMENTO DOS RESÍDUOS LIGNOCELULÓSICOS

De acordo com Vaz Jr. (2013; 2014), o conceito de biorrefinarias ainda é recente, e está relacionado ao aproveitamento integral da biomassa vegetal, seguindo a mesma ideia de uma refinaria de petróleo, porém muito mais sustentável do que a segunda, e tem como objetivo substituir produtos e processos baseados em fontes de matérias-primas não renováveis por produtos e processos que utilizem

a biomassa como matéria-prima, e o desenvolvimento e pesquisa de novas tecnologias que levem ao aproveitamento de todo o potencial econômico e energético da biomassa devem ser consideradas.

O Brasil é um importante exportador de *commodities* agrícolas e um dos principais produtores mundiais de biomassa, principalmente a agroindustrial. Porém, mesmo sendo estratégica a produção e exportação de tais *commodities*, a possibilidade de agregar valor à biomassa deve ser considerada como uma oportunidade de geração de conhecimentos técnicos científicos nacionais e de minimização dos impactos ambientais (VAZ Jr., 2011). Na Figura 11 encontra-se um diagrama do conceito de biorrefinaria ilustrando o potencial aumento do valor agregado dos produtos obtidos a partir da biomassa.

Figura 11 - Diagrama do conceito de biorrefinaria apresentando o potencial de valor agregado dos produtos



Fonte: adaptado da Sociedade Ibero-Americana para o Desenvolvimento das Biorrefinarias *apud* Vaz Jr. (2011).

As biorrefinarias vem ganhando destaque no setor econômico, estas apresentam grande potencial para alcançar a mesma importância dos produtos fósseis. A biorrefinaria se caracteriza por produzir diversas formas de biocombustíveis e bioprodutos, utilizando a biomassa ou materiais orgânicos como

matéria-prima. Além disso, as biorrefinarias são capazes de produzir uma gama de produtos em um único processo de maneira sustentável. Por exemplo, em um sistema de biorrefinaria, em uma única etapa, podem ser produzidos combustíveis, lubrificantes, polímeros, ração animal, fertilizantes orgânicos e energia. Assim sendo, além de contribuir para vários setores econômicos, utiliza uma tecnologia limpa e sustentável (BUDZIANOWSKI; POSTAWA, 2016).

O conceito de biorrefinaria é bastante amplo e abrangente em seu potencial de aplicação industrial e econômico, podendo incluir a pesquisa e desenvolvimento de produtos químicos e processos a partir da desconstrução do material lignocelulósico constituinte das plantas, além de seu processamento térmico. Na desconstrução, a biomassa, após passar por diversos tipos de pré-tratamentos físicos e químicos, disponibiliza os polímeros lignina, celulose e hemiceluloses (VAZ Jr., 2011).

Segundo Abdul khani et al. (2017) muitos resíduos agroindustriais podem ser utilizados em processos de biorrefinaria. Entre eles, a soja possui um alto potencial para ser empregada em sistema de biorrefinaria, pois pode ser utilizada como um todo para a produção dos mais variados produtos. O óleo extraído, através da transesterificação pode originar o biodiesel. A casca residual da soja é um resíduo promissor que pode ser utilizado para a produção de celulose e nanofibras de celulose. O resíduo gerado para o pré-tratamento (líquor escuro) pode ser incinerado na caldeira de recuperação, e o vapor gerado poderá ser utilizado para a produção de energia.

García et al. (2016) relataram que a celulose e a nanocelulose, assim como o bioetanol, atualmente se tornaram produtos promissores a serem obtido nos sistemas de biorrefinarias, entre as suas características estão a fonte renovável, possibilidade de produção a partir de diferentes resíduos, grande aplicabilidade, entre outros.

Sendo assim, este trabalho propõe o aproveitamento de alguns resíduos lignocelulósicos provenientes da agroindústria, tais como a casca de soja, a casca de aveia e o farelo de trigo, para diferentes aplicações (obtenção de substratos para fermentação, celulose e nanocelulose), através da combinação de métodos físicos e químicos, tendo em vista a menor geração de efluentes quando comparados aos métodos convencionais empregados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDUL KHALIL, H. P. S. et al. Production and modification of nanofibrillated cellulose using various mechanical processes: A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 99, p. 649–665, jan. 2014.
- ABDUL KHANI, A. et al. Potential of Soya as a raw material for a whole crop biorefinery. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 75, p. 1269–1280, ago. 2017.
- AKHTAR, N. et al. Recent advances in pretreatment technologies for efficient hydrolysis of lignocellulosic biomass. **Environmental Progress & Sustainable Energy**, v. 35, n. 2, p. 489–511, 4 mar. 2016.
- ANWAR, Z.; GULFRAZ, M.; IRSHAD, M. Agro-industrial lignocellulosic biomass a key to unlock the future bio-energy: A brief review. **Journal of Radiation Research and Applied Sciences**, v. 7, n. 2, p. 163–173, abr. 2014.
- APPRICH, S. et al. Wheat bran-based biorefinery 2: Valorization of products. **LWT - Food Science and Technology**, v. 56, n. 2, p. 222–231, maio 2014a.
- AUXENFANS, T. et al. Understanding the structural and chemical changes of plant biomass following steam explosion pretreatment. **Biotechnology for Biofuels**, v. 10, n. 1, dez. 2017.
- BALLESTEROS, I. et al. **Ethanol production from steam-explosion pretreated wheat straw**. Twenty-seventh symposium on biotechnology for fuels and chemicals. **Anais...** Springer, 2006; Disponível em: <<http://www.springerlink.com/index/R614LKPW00876327.pdf>>. Acesso em: 3 jul. 2017
- BEHERA, S. et al. Importance of chemical pretreatment for bioconversion of lignocellulosic biomass. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 36, p. 91–106, ago. 2014.
- BHUTTO, A. W. et al. Insight into progress in pre-treatment of lignocellulosic biomass. **Energy**, v. 122, p. 724–745, mar. 2017.
- BRINCHI, L. et al. Production of nanocrystalline cellulose from lignocellulosic biomass: Technology and applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 94, n. 1, p. 154–169, abr. 2013.
- BUDZIANOWSKI, W. M.; POSTAWA, K. Total Chain Integration of sustainable biorefinery systems. **Applied Energy**, v. 184, p. 1432–1446, dez. 2016.
- CANILHA L.; CARVALHO, W.; GIULIETTI, M.; SILVA J.B.A. Xylitol bioproduction from wheat straw: *Process engineering and technical feasibility*. **Journal of Biotechnology**, v. 136s, p. s22–s71, 2008.

- CARDOSO, C. R. et al. Physical characterization of sweet sorghum bagasse, tobacco residue, soy hull and fiber sorghum bagasse particles: Density, particle size and shape distributions. **Powder Technology**, v. 245, p. 105–114, set. 2013.
- CHEN, W.-H. et al. Pretreatment efficiency and structural characterization of rice straw by an integrated process of dilute-acid and steam explosion for bioethanol production. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 3, p. 2916–2924, fev. 2011.
- CHENG, G. et al. Transition of Cellulose Crystalline Structure and Surface Morphology of Biomass as a Function of Ionic Liquid Pretreatment and Its Relation to Enzymatic Hydrolysis. **Biomacromolecules**, v. 12, n. 4, p. 933–941, 11 abr. 2011.
- CONAB, Nacional Supply Company. Harvesting Safra 216/2017 of Brazil. <http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=1253/>(accessed 5 Outubro 2017).
- COTANA, F. et al. Production of Bioethanol in a Second Generation Prototype from Pine Wood Chips. **Energy Procedia**, v. 45, p. 42–51, 2014.
- CUEVAS, M. et al. Enhanced ethanol production by simultaneous saccharification and fermentation of pretreated olive stones. **Renewable Energy**, v. 74, p. 839–847, fev. 2015.
- D'ALMEIDA, M. L. O. Celulose e papel: tecnologia de fabricação de pasta celulósica. 2. ed. v. 1. São Paulo: IPT-SENAI, 1981.
- DUQUE, A. et al. Sugar production from barley straw biomass pretreated by combined alkali and enzymatic extrusion. **Bioresource Technology**, v. 158, p. 262–268, abr. 2014.
- ESPINO, E. et al. Isolation and characterization of cellulose nanocrystals from industrial by-products of Agave tequilana and barley. **Industrial Crops and Products**, v. 62, p. 552–559, dez. 2014.
- FAHMA, F. et al. Cellulose Nanowhiskers from Sugar Palm Fibers. **Emirates Journal of Food and Agriculture**, v. 28, n. 8, p. 566, 2016.
- FAN, X. et al. Effects of acid impregnated steam explosion process on xylose recovery and enzymatic conversion of cellulose in corncob. **Carbohydrate Polymers**, v. 114, p. 21–26, Dezembro 2014.
- FARHAT, W. et al. Hemicellulose extraction and characterization for applications in paper coatings and adhesives. **Industrial Crops and Products**, v. 107, p. 370–377, nov. 2017.
- FAVARO, L.; BASAGLIA, M.; CASELLA, S. Processing wheat bran into ethanol using mild treatments and highly fermentative yeasts. **Biomass and Bioenergy**, International Conference on Lignocellulosic ethanol. v. 46, p. 605–617, nov. 2012.
- FENGEL D.; WEGENER G. Wood Chemistry, Ultrastructure, Reactions. Berlin New York; 1984.

FERNANDES, E. M. et al. Bionanocomposites from lignocellulosic resources: Properties, applications and future trends for their use in the biomedical field. **Progress in Polymer Science**, v. 38, n. 10–11, p. 1415–1441, out. 2013.

FERRER, A. et al. Valorization of residual Empty Palm Fruit Bunch Fibers (EPFBF) by microfluidization: Production of nanofibrillated cellulose and EPFBF nanopaper. **Bioresource Technology**, v. 125, p. 249–255, dez. 2012.

FIGUEIRÓ, G. G.; GRACIOLLI, L. A. Influência da composição química do substrato no cultivo de *Pleurotus florida*. **Ciência e Agrotecnologia**, p. 924–930, 2011.

FLAUZINO NETO, W. P. et al. Extraction and characterization of cellulose nanocrystals from agro-industrial residue – Soy hulls. **Industrial Crops and Products**, v. 42, p. 480–488, mar. 2013.

FORD, E. N. J. et al. X-ray Diffraction of Cotton Treated with Neutralized Vegetable Oil-based Macromolecular Crosslinkers. **Journal of Engineered Fabrics & Fibers (JEFF)**, v. 5, n. 1, 2010.

FORSTER-CARNEIRO, T. et al. Biorefinery study of availability of agriculture residues and wastes for integrated biorefineries in Brazil. **Resources, Conservation and Recycling**, v. 77, p. 78–88, ago. 2013.

FURLAN, L. G.; DUARTE, U. L.; MAULER, R. S. Avaliação das propriedades de compósitos de polipropileno reforçados com casca de aveia. **Quim. Nova**, v. 35, n. 8, p. 1499–1501, 2012.

GALDEANO, M. C.; GROSSMANN, M. V. E. Effect of treatment with alkaline hydrogen peroxide associated with extrusion on color and hydration properties of oat hulls. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 48, n. 1, p. 63–72, 2005.

GARCÍA, A. et al. Industrial and crop wastes: A new source for nanocellulose biorefinery. **Industrial Crops and Products**, v. 93, p. 26–38, dez. 2016a.

GIRI, G. F. et al. Soybean hulls, an alternative source of bioactive compounds: Combining pyrolysis with bioguided fractionation. **Industrial Crops and Products**, v. 105, p. 113–123, out. 2017.

GUPTA, A.; VERMA, J. P. Sustainable bio-ethanol production from agro-residues: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 41, p. 550–567, jan. 2015.

HAAJ, B. S. et al. Starch nanoparticles formation via high power ultrasonication. **Carbohydrate Polymers**, v. 92, n. 2, p. 1625–1632, fev. 2013

HENDRIKS, A. T. W. M.; ZEEMAN, G. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 1, p. 10–18, jan. 2009.

HENRIQUE, M. A. et al. Valorization of an agro-industrial waste, mango seed, by the extraction and characterization of its cellulose nanocrystals. **Journal of Environmental Management**, v. 121, p. 202–209, maio 2013.

HICKERT, L. R. et al. Fermentation kinetics of acid–enzymatic soybean hull hydrolysate in immobilized-cell bioreactors of *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida shehatae*, *Spathaspora arborariae*, and their co-cultivations. **Biochemical Engineering Journal**, v. 88, p. 61–67, jul. 2014.

IBRAHIM, H. M. M. Green synthesis and characterization of silver nanoparticles using banana peel extract and their antimicrobial activity against representative microorganisms. **Journal of Radiation Research and Applied Sciences**, v. 8, n. 3, p. 265–275, jul. 2015.

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, 4 abr. 2009.

KAUSHIK, M.; MOORES, A. Review: nanocelluloses as versatile supports for metal nanoparticles and their applications in catalysis. **Green Chem.**, v. 18, n. 3, p. 622–637, 2016.

KIM, J. S.; LEE, Y. Y.; KIM, T. H. A review on alkaline pretreatment technology for bioconversion of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 199, p. 42–48, jan. 2016.

KLEMM, D. et al. Cellulose: Fascinating Biopolymer and Sustainable Raw Material. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 44, n. 22, p. 3358–3393, 30 maio 2005.

KLEMM, D. et al. Nanocelluloses: A New Family of Nature-Based Materials. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 50, n. 24, p. 5438–5466, 6 jun. 2011.

KROON-BATENBURG, L. M. J.; BOUMA, B.; KROON, J. Stability of cellulose structures studied by MD simulations. Could mercerized cellulose II be parallel? **Macromolecules**, v. 29, n. 17, p. 5695–5699, 1996.

KUMAR, R.; WYMAN, C. E. Effect of additives on the digestibility of corn stover solids following pretreatment by leading technologies. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 102, n. 6, p. 1544–1557, 15 abr. 2009.

LAMSAL, B. et al. Extrusion as a thermo-mechanical pre-treatment for lignocellulosic ethanol. **Biomass and Bioenergy**, v. 34, n. 12, p. 1703–1710, dez. 2010.

LAURICHESSE, S.; AVÉROUS, L. Chemical modification of lignins: Towards biobased polymers. **Progress in Polymer Science**, v. 39, n. 7, p. 1266–1290, 2014.

LIU, X. et al. Optimization of sampling technique conditions for intercellular metabolites analysis in *Mortierella alpina*. **Journal of Biotechnology**, v. 136, p. S50–S51, 2008.

LIMA, M.M.S.; BORSALI, R. Rodlike Cellulose Microcrystals: Structure, Properties, and Applications. **Macromolecular Rapid Commun**, v. 25, n. 7, p. 771 - 787, 2004.

LIYAKATHALI, M.N. A. et al. Effect of frequency and reaction time in focused ultrasonic pretreatment of energy cane bagasse for bioethanol production.

Bioresource Technology, v. 200, p. 262–271, 2016.

MAKELA, M. R. et al. Cultivation of *Podospora anserina* on soybean hulls results in an efficient enzyme cocktail for plant biomass hydrolysis. **New Biotechnology**, v. 37, p. 162–171, jul. 2017.

MANCERA, A. et al. Physicochemical characterisation of sugar cane bagasse lignin oxidized by hydrogen peroxide. **Polymer Degradation and Stability**, v. 95, n. 4, p. 470–476, abr. 2010.

MARAMBIO-JONES, C.; HOEK, E. M. V. A review of the antibacterial effects of silver nanomaterials and potential implications for human health and the environment.

Journal of Nanoparticle Research, v. 12, n. 5, p. 1531–1551, jun. 2010.

MENON, V.; RAO, M. Trends in bioconversion of lignocellulose: Biofuels, platform chemicals & biorefinery concept. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 38, n. 4, p. 522–550, ago. 2012.

MERCI, A. et al. Properties of microcrystalline cellulose extracted from soybean hulls by reactive extrusion. **Food Research International**, v. 73, p. 38–43, jul. 2015.

MINISTERIO DO MEIO AMBIENTE. Disponível em: www.mma.gov.br/, acesso em outubro 2015.

MONRROY, M. et al. Structural change in wood by brown rot fungi and effect on enzymatic hydrolysis. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 49, n. 5, p. 472–477, out. 2011.

MOOD, H. S. et al. Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with a focus on pretreatment. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 27, p. 77–93, nov. 2013.

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

MUSTAFA, A. M. et al. Combinations of fungal and milling pretreatments for enhancing rice straw biogas production during solid-state anaerobic digestion.

Bioresource technology, v. 224, p. 174–182, 2017.

NAGARAJAN, S. et al. Cellulose II as bioethanol feedstock and its advantages over native cellulose. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 77, p. 182–192, set. 2017.

NASCIMENTO, D. M. et al. A novel green approach for the preparation of cellulose nanowhiskers from white coir. **Carbohydrate Polymers**, v. 110, p. 456–463, set. 2014.

NEL, A. E. et al. Understanding biophysicochemical interactions at the nano–bio interface. **Nature Materials**, v. 8, n. 7, p. 543–557, jul. 2009.

NEPOMUCENO, N. C. et al. Extraction and characterization of cellulose nanowhiskers from Mandacaru (*Cereus jamacaru* DC.) spines. **Cellulose**, v. 24, n. 1, p. 119–129, jan. 2017.

NG, H.-M. et al. Review of Nanocellulose Polymer Composite Characteristics and Challenges. **Polymer-Plastics Technology and Engineering**, v. 56, n. 7, p. 687–731, 3 maio 2017.

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

O'SULLIVAN, A. C. Cellulose: the structure slowly unravels. **Cellulose**, v. 4, n. 3, p. 173–207, 1997.

ONAL, E.; UZUN, B. B.; PUTUN, A. E. The effect of pyrolysis atmosphere on bio-oil yields and structure. **International Journal of Green Energy**, v. 14, n. 1, p. 1–8, 2 jan. 2017.

PASCHOAL, G. B. et al. Isolation and characterization of nanofibrillated cellulose from oat hulls. **Química Nova**, v. 38, n. 4, p. 487–482, 2015.

PAULI, E. D. et al. Detection of ground roasted coffee adulteration with roasted soybean and wheat. **Food Research International**, v. 61, p. 112–119, jul. 2014.

PENG, P.; SHE, D. Isolation, structural characterization, and potential applications of hemicelluloses from bamboo: A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 112, p. 701–720, nov. 2014.

PRÜCKLER, M. et al. Wheat bran-based biorefinery 1: Composition of wheat bran and strategies of functionalization. **LWT - Food Science and Technology**, v. 56, n. 2, p. 211–221, maio 2014.

QU, X.; ALVAREZ, P. J. J.; LI, Q. Applications of nanotechnology in water and wastewater treatment. **Water Research**, v. 47, n. 12, p. 3931–3946, ago. 2013.

QUA, E. H. et al. Preparation and characterisation of cellulose nanofibres. **Journal of Materials Science**, v. 46, n. 18, p. 6029–6045, set. 2011.

RAMOS, L. P. The chemistry involved in the steam treatment of lignocellulosic materials. **Química Nova**, v. 26, n. 6, p. 863–871, dez. 2003.

RASHID et al. Development of pretreatment of empty fruit bunches for enhanced enzymatic saccharification. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 81, 16 dez. 2011.

REISINGER, M. et al. Investigations on a wheat bran biorefinery involving organosolv fractionation and enzymatic treatment. **Bioresource Technology**, v. 170, p. 53–61, out. 2014.

ROJAS, M. J. et al. Sequential proteolysis and cellulolytic hydrolysis of soybean hulls for oligopeptides and ethanol production. **Industrial Crops and Products**, v. 61, p. 202–210, nov. 2014.

- SANTOS, R. M. DOS et al. Cellulose nanocrystals from pineapple leaf, a new approach for the reuse of this agro-waste. **Industrial Crops and Products**, v. 50, p. 707–714, out. 2013.
- SEYDIM, A. C.; SARIKUS, G. Antimicrobial activity of whey protein based edible films incorporated with oregano, rosemary and garlic essential oils. **Food Research International**, v. 39, n. 5, p. 639–644, jun. 2006.
- SINDHU, R.; BINOD, P.; PANDEY, A. Biological pretreatment of lignocellulosic biomass ? An overview. **Bioresource Technology**, v. 199, p. 76–82, jan. 2016.
- SINGH, J.; SUHAG, M.; DHAKA, A. Augmented digestion of lignocellulose by steam explosion, acid and alkaline pretreatment methods: A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 117, p. 624–631, mar. 2015.
- SLAVUTSKY, A. M.; BERTUZZI, M. A. Water barrier properties of starch films reinforced with cellulose nanocrystals obtained from sugarcane bagasse. **Carbohydrate Polymers**, v. 110, p. 53–61, set. 2014.
- SOUSA-AGUIAR, E. F. et al. Some important catalytic challenges in the bioethanol integrated biorefinery. **Catalysis Today**, v. 234, p. 13–23, out. 2014.
- SUBHEDAR, P. B.; RAY, P.; GOGATE, P. R. Intensification of delignification and subsequent hydrolysis for the fermentable sugar production from lignocellulosic biomass using ultrasonic irradiation. **Ultrasonics Sonochemistry**, jan. 2017.
- TALEBNIA, F.; KARAKASHEV, D.; ANGELIDAKI, I. Production of bioethanol from wheat straw: An overview on pretreatment, hydrolysis and fermentation. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4744–4753, jul. 2010.
- TAMANINI, C.; DE OLIVEIRA HAULY, M. C. Resíduos agroindustriais para produção
- TOMÁS-PEJÓ, E. et al. Valorization of steam-exploded wheat straw through a biorefinery approach: Bioethanol and bio-oil co-production. **Fuel**, v. 199, p. 403–412, jul. 2017.
- UMMARTYOTIN, S.; MANUSPIYA, H. A critical review on cellulose: From fundamental to an approach on sensor technology. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 41, p. 402–412, jan. 2015.
- XIANG, Q.; LEE, Y. Y.; PETTERSSON, P.O.; AND ROBERT W. TORGET, R.W. Heterogeneous Aspects of Acid Hydrolysis of α -Cellulose. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 1, p. 105–108, 2003.
- WOOD, I. P. et al. Ethanol from a biorefinery waste stream: Saccharification of amylase, protease and xylanase treated wheat bran. **Food Chemistry**, v. 198, p. 125–131, maio 2016.
- WU, F.C. et al. Sequential acid and enzymatic hydrolysis in situ and bioethanol production from Gracilaria biomass. **Bioresource Technology**, v. 156, p. 123–131, mar. 2014.

WU, M. et al. Application of new expansion pretreatment method on agricultural waste. Part I: Influence of pretreatment on the properties of lignin. **Industrial Crops and Products**, v. 50, p. 887–895, out. 2013.

YANG, C. et al. Effect and aftereffect of γ radiation pretreatment on enzymatic hydrolysis of wheat straw. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 14, p. 6240–6245, set. 2008.

YANG, H. et al. Characteristics of hemicellulose, cellulose and lignin pyrolysis. **Fuel**, v. 86, n. 12–13, p. 1781–1788, ago. 2007.

YOO, J. et al. Thermo-mechanical extrusion pretreatment for conversion of soybean hulls to fermentable sugars. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 16, p. 7583–7590, ago. 2011.

ZIMMERMANN, T.; BORDEANU, N.; STRUB, E. Properties of nanofibrillated cellulose from different raw materials and its reinforcement potential. **Carbohydrate Polymers**, v. 79, n. 4, p. 1086–1093, 17 mar. 2010.

3 CAPÍTULO II : NANOFIBRILATED CELLULOSE OBTAINED FROM OAT HULLS BY REACTIVE EXTRUSION

Abstract

The objectives of this study were to produce nanofibrillated cellulose (NFC) from oat hulls (OH) employing a simple method based on reactive extrusion combined or not with previous bleaching with peracetic acid, and to characterize the obtained materials according to their microstructure, morphology, crystallinity and thermal stability. OH extruded in three sequential steps with NaOH and H₂SO₄ (twice) resulted in nanofibers with diameters around 100 ± 25 nm, with a yield of 60 % considering the initial cellulose content. OH bleached with peracetic acid followed by acid hydrolysis performed by reactive extrusion resulted in thinner fibers, with diameter of 12 ± 2 nm, with a yield of 65 % considering the initial cellulose content. NFC produced in this work presented diameters of nanometric scale and lengths of several micrometers, higher crystallinity indexes and thermal stability than the raw material. Reactive extrusion and the combination of peracetic bleaching were effective in production of NFC from OH, and it has the advantages of simplicity and was less polluting than the conventional methods

Key-words: agroindustrial residue; nanocellulose; peracetic acid.

3.1 INTRODUCTION

Agriculture sector generates approximately 140 billion of lignocellulosic biomass every year in all world, and Brazil is known to have high diversity of its renewable natural resources, being the agribusiness one of its main business activities (Forster-Carneiro et al., 2013; Gupta and Verma, 2015).

Oat hulls (OH) are the main by product of oat groat milling and Brazil produced 706 million ton of oat in the 2016/2017 harvest (Conab, 2016). OH presents in its composition about 90 % fiber (Paschoal et al., 2015), and also could be an attractive source of cellulose, containing about 38 – 48 % cellulose, 25 – 35% hemicelluloses and 10 – 15 % lignin (Paschoal et al., 2015; Valdebenito et al., 2017).

Cellulose can be obtained from several wastes, using different extraction processes (Klemm et al., 2011), and in the last few years that are an increased interest in nanocellulose. Nanocellulose is defined as a material smaller than 100 nm in at least one dimension (Qu et al., 2013). According to García et al. (2016) and Kaushik and Moores (2016), nanocellulose (NC) materials are classified in two main families: (i) cellulose nanocrystals (CNC), which are crystalline materials with 3 – 15 nm in diameter and 50 – 500 nm in length, being obtained by acid hydrolysis treatment of cellulose; and (ii) cellulose nanofibers or nanofibrillated cellulose (NFC), which are composed by interconnected webs of tiny fibers with diameters in the nanometric scale (< 100 nm) and lengths of several micrometers.

Several methods have been reported in the literature for obtaining NFC, such as high-pressure homogenization (Jonoobi et al., 2009), milling (Hassan et al., 2012), microfluidization (Ferrer et al., 2012) and ultrasonication (Qua et al., 2011). Chemical or enzymatic treatments can be combined with mechanical treatments. Zimmermann et al. (2010) obtained nanofibrillated cellulose by the combination of acid hydrolysis associated with homogenization. Paschoal et al. (2015) produced NFC from oat hulls employing acid hydrolysis and ultrasonication. Valdebenito et al. (2017) employed oxidation combined to high-pressure homogenization to obtain NFC.

The obtainment of CNC or NFC from lignocellulosic residues, hemicelluloses and lignin have to be removed. The resulting cellulose has to be hydrolysed, and higher amounts of reagents are required in the usual processes, including several steps of bleaching and acid hydrolysis of the residue, resulting in long process and higher amounts of effluents. Merci et al. (2015) reported the production of

microcrystalline cellulose from soybean hulls employing reactive extrusion, they reported that reactive extrusion is an efficient method because provides a combination of thermo-mechanical and chemical treatment for the extraction of cellulose from lignocellulosic residues, resulting in lower amounts of effluents and higher yields.

The production of CNC or NFC cellulose employing reactive extrusion was not reported in literature, and the objectives of this study were to produce nanofibrillated cellulose from oat hulls employing a simple method based on reactive extrusion, and to characterize the obtained material according to its microstructure, morphology, crystallinity and thermal stability.

3.2 MATERIAL AND METHODS

3.2.1 Material

Oat hulls were kindly provided by SL Alimentos (Mauá da Serra, Paraná, Brazil), dried (45 °C), and milled to yield particles < 0.30 mm.

3.2.2 Reactive extrusion for production of NFC

Single screw extruder (AX Plastics, Diadema, SP, Brazil) with a screw diameter of 1.6 cm and a screw length/diameter ratio (L/D) of 40, with four heating zones and a matrix of 0.8 cm in diameter was employed to obtain NFC. The temperature in all extruder zones was fixed at 110 °C and the screw speed was 100 rpm.

The oat hulls were extruded based on previous work (Merci et al., 2015) with some modifications, and in all cases the samples were prepared and allowed to stand for 1 h in sealed plastic bags before extrusion (Table 1). A control sample called EOH (Table 1) was extruded without any reagent other than water, resulting in a final moisture content of 32 %.

Table 1 - Processing conditions to obtain nanofibrillated cellulose from oat hulls

Sample	Bleaching with Peracetic acid	NaOH (%)	H ₂ SO ₄ (%)	Moisture(%)
EOH	-	-	-	32
EOH1	-	10	2	32
EOH2	-	10	2(2X)	32
BOH	1X	-	-	-
BEOH	1X	-	2	32

The EOH1 sample (Table 1) was obtained from the OH after a two-step extrusion process, in the first step, the OH was extruded with NaOH, followed by extrusion with H₂SO₄ in the second step. The EOH2 sample (Table 1) was obtained from the OH after a three step extrusion process, in the first step, the OH was extruded with NaOH, followed by two sequential extrusions steps with H₂SO₄. For EOH1 and EOH2, the reagents were dissolved in distilled water and mixed with the OH, resulting in a final moisture content of 32 %.

The BOH sample (Table 1) was bleached with peracetic acid and BEOH sample was bleached and then extruded by one-step extrusion process when the BOH was extruded with H₂SO₄. The bleaching of BOH and BEOH samples was performed according to Nascimento et al. (2016) with modifications. OH (120 g) were immersed in 2 L of a peracetic acid solution prepared by mixing 50 % acetic acid (Synth – Brazil), 38 % hydrogen peroxide (Synth – Brazil) and 12 % distilled water. The sample was maintained at 60°C under vigorously stirring for 48 h. Then, the bleached sample was neutralized until pH 5-6. The sample was dried at 60°C in an air-circulating oven (Tecnal – São Paulo-Brazil) for 24 h and and milled to yield particles < 0.30 mm.

After each extrusion step, all samples were washed with distilled and neutralized until pH 5-6. Then, the samples were dried in a ventilated oven at 40 °C (035 Marconi MA — São Paulo, SP, Brazil) and milled to yield particles < 0.30 mm.

3.2.3 Centesimal composition of oat hulls

The centesimal composition of the oat hulls (proteins, lipids, moisture and ash) was determined by following Association of Official Analytical Chemists (AOAC) methods (2003), and the total carbohydrates were calculated by taking the difference. The total dietary fiber and soluble and insoluble fractions were determined according to AACC methods (AACC method 32-07, 1990). All determinations were run in triplicate.

3.2.4 Characterization of OH and OH submitted to reactive extrusion.

3.2.4.1 Cellulose, hemicellulose and lignin contents

The cell wall constituents (cellulose and hemicelluloses) were determined employing the Van Soest (1965) method. The lignin content was determined according to a standard method of Technical Association of Pulp and Paper Industry TAPPIT222 om-88.

3.2.4.2 Scanning electron microscopy (SEM)

SEM analyses were carried out with a FEI Quanta 200 microscope (Oregon, USA). Firstly, the dried samples were mounted for visualization on bronze stubs using double-sided tape. The surfaces were then coated with a thin gold layer (40–50 nm), and it was utilized an accelerating voltage of 30 kV for all samples.

3.2.4.3 Atomic force microscopy (AFM)

AFM micrographs were recorded with a NanoSurf FlexAFM instrument (AG, Switzerland), using silicon AFM probes. Topography was analyzed in air. The average of nanofibers size was estimated from line scans performed on about 20 fibers using ImageJ™ software.

3.2.4.4 Fourier Transform-Infrared Spectroscopy (FT-IR)

The samples were pulverized and dried, then mixed with potassium bromide and compressed into tablets. The FT-IR analysis was performed using a Shimadzu FT-IR — 8300 (Japan), with a spectral resolution of 4 cm^{-1} and a spectral range of $4000\text{--}500\text{ cm}^{-1}$.

3.2.4.5 X-ray diffraction (XRD)

The crystallinity of each sample was investigated using XRD. The samples were finely powdered (particles $< 0.149\text{ mm}$) and the analysis was performed using a PANalytical X'Pert PRO MPD diffractometer (Netherlands) with copper $K\alpha$ radiation ($\lambda = 1.5418\text{ \AA}$) under the operational conditions of 40 kV and 30 mA. All of the assays were performed with a ramp rate of $1^\circ/\text{min}$. The relative crystallinity index (CI) was calculated using the Segal, Creely, Martin, and Conrad (1959) method, as follows: $\text{CI} (\%) = [(I_{002} - I_{\text{am}})/I_{002}] * 100$, where I_{002} is the intensity of the 002 peak (at approximately $2\theta = 20^\circ\text{--}22^\circ$) and I_{am} is the intensity corresponding to the peak at $2\theta = 18^\circ$.

3.2.4.6 Thermogravimetric analysis (TGA)

For the thermogravimetric analysis (TGA 50 - Shimadzu, Japan) the samples (approximately 10 mg) were heated from 0 to $600\text{ }^\circ\text{C}$ at a heating rate of $10\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$. The assays were performed under a nitrogen atmosphere (50 mL min^{-1}).

3.2.5 Statistical analysis

The data were performed with Statistica software version 7.0 using analyses of variance (ANOVA) and Tukey's mean comparison test ($p \leq 0.05$) (Statsoft, OK, USA).

3.3 RESULTS AND DISCUSSION

The OH employed in this work presented 6.08 ± 0.61 % moisture, 0.83 ± 0.02 % ash, 5.53 ± 0.25 % proteins, 0.67 ± 0.01 lipids and 86.09 ± 2.01 % carbohydrates. The total dietary fiber content of OH was 85.06 ± 1.05 %, with 78.00 ± 1.82 % of insoluble fibers and 0.18 ± 0.01 % of soluble fibers; the most important components of the OH were the carbohydrates, specifically the insoluble dietary fiber fraction.

Our result of insoluble dietary fiber, which comprises cellulose, hemicelluloses and lignin, was similar to the observed by Tamanini et al. (2004). Jacometti et al. (2015) observed a higher dietary fiber content (89 %) for oat hulls, and these variations could be attributed to the climate, geographic localization or age of the crop. According to Haque et al. (2017), the lignocellulosic residues are made up mainly of insoluble fibers, comprising cellulose (25 – 50 %), hemicelluloses (8 – 47 %) and lignin (7 – 40 %).

As seen in Table 2, all extruded and bleached samples (EOH1, EOH2, BOH and BEOH) presented cellulose, hemicelluloses and lignin values significantly different ($p \leq 0.05$) from raw oat hulls (OH) values. The hemicelluloses and lignin contents reduced in all samples. Cellulose increased when compared to raw OH, showing that the processes employed in this work were effective in removing lignin and hemicelluloses. According to Ng et al. (2016), the most critical stage of cellulose extraction from lignocellulosic residues corresponds to the pre-treatment, and many techniques have been studied to remove the amorphous matrix consisting of lignin and hemicelluloses.

Table 2 - Cellulose, hemicelluloses and lignin contents and crystallinity index (CI) of oat hulls samples submitted to reactive extrusion and/or to bleaching

Samples	Cellulose (%)	Hemicelluloses (%)	Lignin (%)	CI (%)
OH	31.16 ± 1.15 e	28.72 ± 0.25 a	18.12 ± 0.63 a	32.09 c
EOH	34.32 ± 2.06 e	26.40 ± 0.53 a	15.00 ± 1.30 b	39.00 c
EOH1	53.14 ± 1.95 d	18.38 ± 0.35 b	12.76 ± 0.98 c	66.00 b
EOH2	61.21 ± 0.92 c	16.64 ± 0.42 b	9.62 ± 0.75 d	68.00 b
BOH	81.97 ± 0.81 b	9.84 ± 0.30 c	5.50 ± 1.24 e	75.05 a
BEOH	87.10 ± 0.32 a	7.74 ± 0.47 c	3.01 ± 0.42 f	79.71 a

* Different letters in the same column indicate significant differences ($p \leq 0.05$) between means (Tukey test).

It is important to observe (Table 2) that the sum of the percentage of cellulose, hemicelluloses and lignin in the raw OH corresponded to 78.00 % of the total dry matter, while in the samples submitted to reactive extrusion and/or bleaching presented 84.28 % (EOH1), 87.47 % (EOH2), 97.31 % (BOH) and 97.85 % (BEOH), confirming that other components (e.g. proteins, extractives and ashes) of OH were removed.

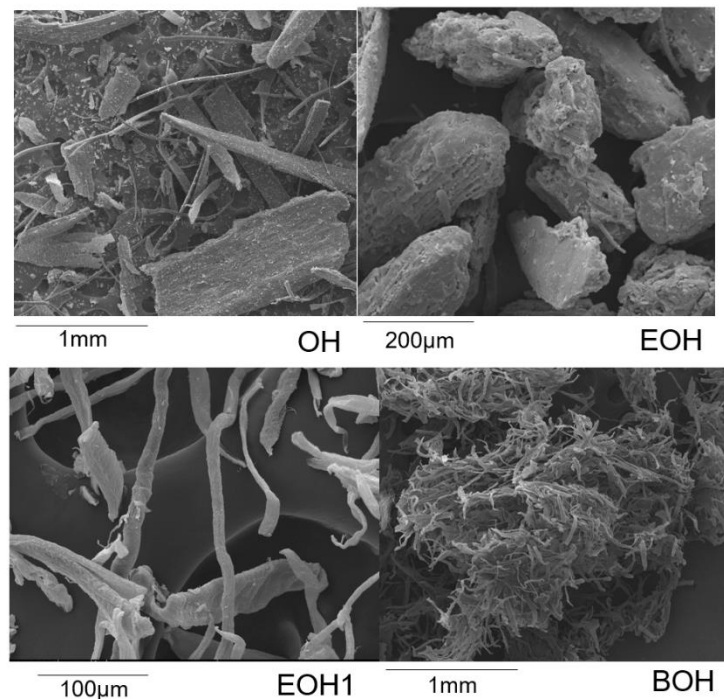
BEOH sample (bleached and extruded with H_2SO_4) had the higher cellulose content (87.10 %) and the lower hemicelluloses (7.74 %) and lignin contents (3.01 %), and this treatment was the more effective in obtainment of cellulose from OH. EOH2 sample, which was extruded with NaOH followed by two extrusion steps with H_2SO_4 presented 61.21% of cellulose, 16.64 % of hemicelluloses and 9.62 % of lignin, however this sample was prepared exclusively by extrusion in a shorter time when compared to BEOH, generating lower amounts of effluents. Merci et al. (2017) reported that soybean hulls extruded with NaOH followed by an extrusion step with H_2SO_4 resulted in microcrystalline cellulose with 83.97 % of cellulose, however the initial lignin content of soybean hulls was 1.54 %, much lower than the initial lignin content of OH employed in this work, and this higher lignin content to be removed could affect the process efficiency.

Considering the initial cellulose content of raw OH employed to obtain EOH2 and BEOH samples, the yield of them were 60 % and 65 %, respectively. These values were higher than that obtained by Paschoal et al. (2015), which produced nanocellulose from oat hulls employing bleaching with peracetic acid followed by conventional acid hydrolysis with H_2SO_4 resulting in a yield of 32 %. Flauzino-Neto et al. (2013) obtained yields ranging from 8 and 20 % when they produced cellulose nanocrystals from soybean hulls employing acid hydrolysis with H_2SO_4 . These authors reported that the mass loss of cellulose during the extraction processes could be attributed to the breakdown of cellulose chains during bleaching and the loss of material in washing and filtering processes.

3.3.1 Scanning electron microscopy (SEM)

Figure 1 presents SEM images of OH, EOH, EOH1 and BOH surfaces. OH and EOH presented a well-organized and compact structure composed by cellulose embedded in a noncellulosic matrix composed mainly of hemicelluloses and lignin, which is characteristic of lignocellulosic materials. In EOH1 sample, the extrusion with NaOH followed by H₂SO₄ resulted in the removal of most hemicellulose and lignin present in raw OH, which permits the defibrillation of cellulose resulting in individualized cellulose microfibrils. In BOH sample, the bleaching with peracetic acid also resulted in individualized cellulose microfibrils (Figure 1), however with a high cellulose purity than EOH1 (Table 2).

Figure 1 - Micrographs obtained using SEM: OH, EOH, EOH1 and BOH



Cellulose is the core of lignocellulosic complex, and according to Ng (2016), during the bleaching the amorphous matrix of hemicellulose and lignina will be removed. Despite the increase of cellulose content, it was impossible to obtain SEM images from EOH2 and BEOH samples with good resolution, probably because these samples resulted in NFC - nanofibrillated cellulose (as observed by AFM

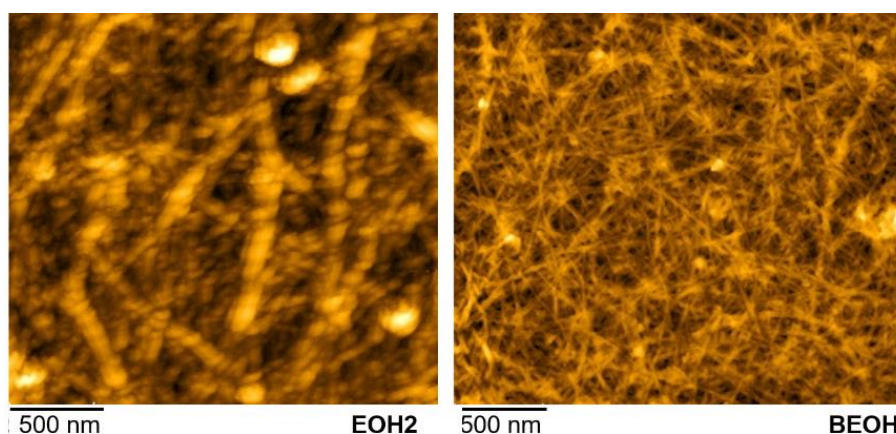
images), which presents a trend of agglomeration, thus the morphology of these two samples was observed by AFM.

More information about these both materials (EOH2 and BEOH) were obtained preparing a suspension (10 % m/v) of each sample was prepared in water which was submitted to ultrasonication for 15 min at 40% power output using a Fisher Scientific Sonicator model 505 (Pittsburgh, PA - USA), coupled with a probe with tip diameter of 1.27 cm. After this procedure, the suspensions were allowed to stand for 1 h for decantation of the larger particles, and the liquid phase were observed by AFM (results discussed below).

3.3.2 Atomic force microscopy (AFM)

It can be observed by AFM images of EOH2 and BEOH (Figure 2) that these samples can be classified as NFC, with an aspect of interconnected webs of tiny nanofibers with diameters of 100 ± 25 nm and 12 ± 2 nm respectively, and lengths of several micrometers. In addition, the aqueous suspensions of these samples (EOH2 and BEOH) were stable, and there was no sedimentation when they were stored at room temperature during 24 h. Valdebenito et al. (2017) also reported the production of NFC with comparable characteristics of our materials (diameters around 20 nm and lengths of several micrometers) using a combination of chemical (2,2,6,6-tetramethylpiperidinyl-1-oxyl (TEMPO) mediated oxidation) and mechanical treatment (high-pressure homogenization).

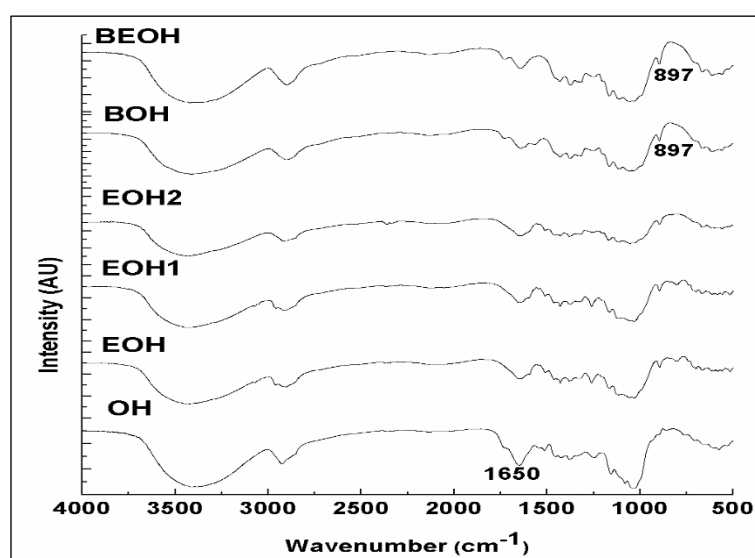
Figure 2 - AFM pictures for cellulose nanocrystals: EOH2 and BEOH



3.3.3 Fourier Transform-Infrared Spectroscopy (FT-IR)

The FT-IR spectra of oat hulls samples are demonstrated in Figure 3. Some differences observed in FT-IR spectra can be associated with bleaching and reactive extrusion process that modified the composition of the samples. In addition, the FT-IR spectra also revealed that the samples had similar chemical groups due to some similarities.

Figure 3 - FT-IR spectra of OH, EOH, EOH1, EOH2, BOH, and BEOH



All spectra showed a wide absorption band corresponding to O-H stretching between 3400 and 3200 cm^{-1} , which indicates hydrogen bonding interactions in these materials.

The band observed around 2900 cm^{-1} for all samples was assigned to the -CH_2 stretching vibrational modes. For all samples there was a band at 1650 cm^{-1} , which was associated with the angular O-H bending of water molecules. This band at 1650 cm^{-1} can also be associated with the C=C stretch of the aromatic ring in the lignin (Sun et al., 2004), and this can explain why this band appeared with a slightly higher intensity in OH sample. The contribution from the absorbed water predominates in the case of BEOH, BOH, EOH2 and EOH1, but in the raw oat hull (OH) this band could be attributed to the lignin.

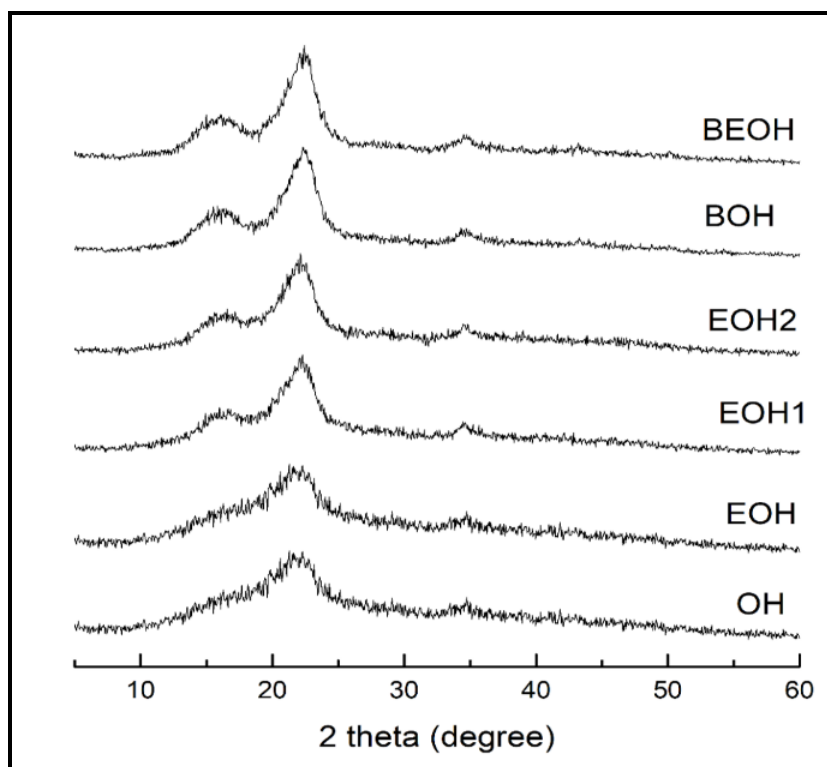
The bands at 897 cm^{-1} were observed in BEOH and BOH. According to Flauzino Neto et al. (2013) the band 897 cm^{-1} is an indicative of the presence of

cellulose and attributed to the C-O-C stretching vibrations of the characteristic β (1 \rightarrow 4)-glycosidic linkage.

3.3.4 X-ray diffraction

The X-ray diffraction patterns of samples are shown in Figure 4 and crystallinity indexes (CI) in the Table 2. In general, the DRX patterns of agro-industrial lignocellulosic residues are constituted of an amorphous broad hump and crystalline peaks, which are characteristic of semicrystalline materials (Flauzino-Neto et al., 2013; Paschoal et al., 2015), as observed for all samples in this work. Cellulose is responsible for the crystalline fraction, hemicelluloses and lignin for the amorphous fraction (Johar et al., 2012), thus on samples with the higher cellulose contents the contribution of the crystalline fraction increased on its DRX patterns, which can be observed by the increase in CI (Table 2).

Figure 4 - X-ray diffractograms of OH, EOH, EOH1, EOH2, BOH, and BEOH



All samples presented peaks $2\theta = 22.5^\circ$ and this is the only peak that was present in raw OH and EOH patterns (Figure 4), this peak became more defined after

extrusion and/ or bleaching of OH. Other two peaks appeared in all the other samples, at $2\theta = 16.0^\circ$ and 34.0° , and these peaks are characteristic of type I cellulose (Ford et al., 2010; Johar et al., 2012; Morán et al., 2008; Nascimento et al., 2016; Paschoal et al., 2015). Bleached and hydrolyzed samples did not exhibit any variation in their polymorph type compared with the original fibers, demonstrating that these process don't change the crystal organization of the material.

OH and EOH had crystallinity indexes (CI) of 32.09 and 39.00 %, respectively, (Table 2), and the higher CI values were observed for bleached samples (BOH and BEOH), which presented also the higher cellulose contents. The bleachig and reactive extrusion resulted in the removal of the amorphous non-cellulosic compounds of OH, which resulted in more crystalline materials.

3.3.5 Thermogravimetric analysis (TGA).

The thermogravimetric analysis was employed to investigate the influence of reactive extrusion processes on thermal stability of samples (Figure 5). A decrease in percentage weight was observed in range from 50 to 100 °C for all samples, representing the loss of water or other low molecular weight compounds evaporated from these materials.

Figure 5 - TGA curves of OH, EOH, EOH1, EOH2 BOH and BEOH

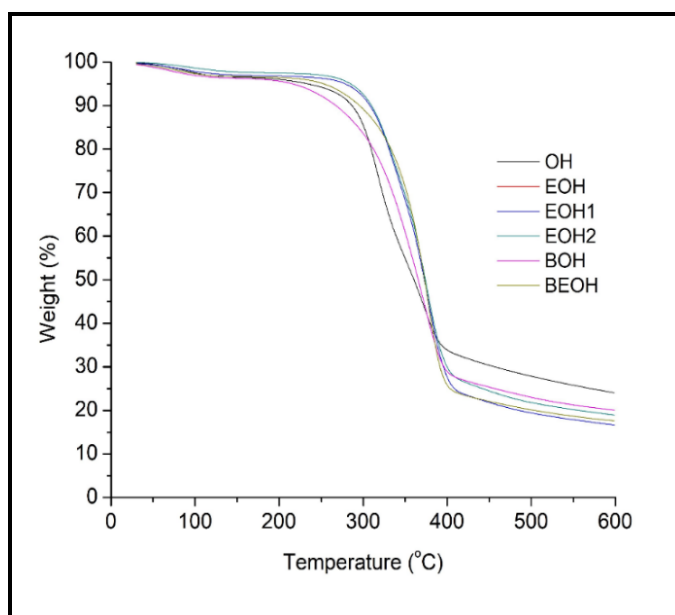


Table 3 presents the TGA parameters of samples, raw oat hulls presented two T_{max} (temperature of maximum degradation) peaks (317°C and 370°C), probably because is a more complex material considering its composition than the other samples, which presented single T_{max} . The higher T_{max} values were obtained for BEOH (370°C) and EOH2 (365°C).

Table 3 - TGA parameters of oat hulls samples submitted to reactive extrusion and/or to bleaching

Sample	T_{max} (°C)	$T_{10\%}$ (°C)
OH	317	282
	370	
EOH	362	300
EOH1	363	304
EOH2	365	306
BOH	360	288
BEOH	374	290

T_{max} = temperature of maximum degradation and $T_{10\%}$ = is the onset temperature at which 10 % of the material degradation occurs.

The $T_{10\%}$ (temperature at which 10 % of the material degradation occurs) was higher for EOH2 sample, and all samples that were extruded or bleached presented higher values than the raw OH (Table 3), indicating that these samples had higher thermal stability than OH. According to Cardoso et al. (2016) and Yang et al. (2007), in range from 250 to 350 °C and 315 to 400 °C occurs the degradation of hemicelluloses and cellulose, respectively. However, lignin presented large temperature range, from room temperature to 900 °C.

The decrease in hemicelluloses and lignin contents of samples probably made materials more resistant to thermal degradation. Mandal and Chakrabarty (2011) observed the same behavior in nanocellulose obtained by acid hydrolysis of sugarcane bagasse, and related that the remotion of the amorphous constituents (hemicelluloses, lignin and other non-cellulosic compounds) through pretreatments resulted in an increase of the tmperature thermal degradation.

3.4 CONCLUSIONS

In this work, NFC were produced from oat hulls employing two different protocols based on reactive extrusion. NFC produced in this work presented diameters of nanometric scale and lengths of several micrometers, higher crystallinity indexes and thermal stability than the raw material. The NFC suspensions were stable, and there was no sedimentation when they were stored at room temperature during 24 h.

Reactive extrusion and the combination of peracetic bleaching and reactive extrusion were effective in the production of NFC from oat hulls. These processes were simple with the advantage of reducing the process times and low generation of effluents when compared to the conventional processes employed to the obtaining of NFC.

REFERENCES

- AACC – American Association of Cereal Chemists, 1990. Approved Methods of the American Association of Cereal Chemists. AACC, St. Paul, MN.
- AOAC– Official Methods of Analysis, 14th ed. Ass. Off. Analytical. Chem. Washington, USA, 2003.
- Cardoso, M.A.P., Carvalho, G.M., Yamashita, F., Mali, S., Eiras, D., Demiate, I.M., Grossmann, M.V.E., 2016. Oat hull fibers bleached by reactive extrusion with alkaline hydrogen peroxide in thermoplastic starch/poly(butylene adipate-co-terephthalate) composites. *Polym. Compos.* 245, 105-114.
- Conab, Nacional Supply Company. Harvesting Safra 216/2017 of Brazil. <http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=1253/>(accessed 5 Outubro 2017).
- Ferrer, A., Salas, C., Rojas, O.J., 2016. Physical, thermal, chemical and rheological characterization of cellulosic microfibrils and microparticles produced from soybean hulls. *Ind. Crops Prod.* 84, 337–343.
- Flauzino Neto, W.P., Silvério, H.A., Dantas, N.O., Pasquini, D., 2013. Extraction and characterization of cellulose nanocrystals from agro-industrial residue – Soy hulls. *Ind. Crops Prod.* 42, 480–488.
- Ford, E.N.J., Mendon, S.K., Thames, S.F., Rawlins, J.W., 2010. X-ray Diffraction of Cotton Treated with Neutralized Vegetable Oil-based Macromolecular Crosslinkers. *J. Eng. Fabr. Fibers* 5, 10-20.
- Forster-Carneiro, T., Berni, M.D., Dorileo, I.L., Rostagno, M.A., 2013. Biorefinery study of availability of agriculture residues and wastes for integrated biorefineries in Brazil. *Resour. Conserv. Recycl.* 77, 78–88.
- García, A., Gandini, A., Labidi, J., Belgacem, N., Bras, J., 2016. Industrial and crop wastes: A new source for nanocellulose biorefinery. *Ind. Crops Prod.* 93, 26–38.
- Gupta, A., Verma, J.P., 2015. Sustainable bio-ethanol production from agro-residues: A review. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 41, 550–567.
- Haque, A., Mondal, D., Khan, I., M.A. Usmani, M.A., Bhat, A.H., Gazal, U. 2017. Fabrication of composites reinforced with lignocellulosic materials from agricultural biomass. In: Jawaid, M. Tahir, P. M.D., Saba, N. 179 - 191. *Lignocellulosic Fibre and Biomass-Based Composite Materials. Processing, properties and applications.* pp 179-191, 504.
- Hassan, M. L., Mathew, A. P., Hassan, E. A., El-Wakil, N. A., Oksman, K., 2012. Nanofibers from bagasse and rice straw: Process optimization and properties. *Wood Science Technology*, 46, 193–205.

- Ibrahim, H.M.M., 2015. Green synthesis and characterization of silver nanoparticles using banana peel extract and their antimicrobial activity against representative microorganisms. *J. Radiat. Res. Appl. Sci.* 8, 265–275.
- Jacometti, G.A., Mello, L.R.P.F., Nascimento, P.H.A., Sueiro, A.C., Yamashita, F., Mali, S., 2015. The physicochemical properties of fibrous residues from the agro industry. *LWT - Food Sci. Technol.* 62, 138–143.
- Johar, N., Ahmad, I., & Dufresne, A., 2012. Extraction, preparation and characterization of cellulose fibres and nanocrystals from rice husk. *Ind. Crops Prod.*, 37, 93-99.
- Jonoobi, M., Niska, K.O., Harun, J., Misra, M., 2009. Chemical composition, crystallinity, and thermal degradation of bleached and unbleached kenaf bast (*Hibiscus cannabinus*) pulp and nanofibers. *BioResources* 4, 626–639.
- Kaushik, M., Moores, A., 2016. Review: nanocelluloses as versatile supports for metal nanoparticles and their applications in catalysis. *Green Chem* 18, 622–637.
- Klemm, D., Kramer, F., Moritz, S., Lindström, T., Ankerfors, M., Gray, D., Dorris, A., 2011. Nanocelluloses: A new family of nature-based materials. *Angew. Chem. Int. Ed.* 50, 5438–5466.
- Mandal, A., Chakrabarty, D., 2011. Isolation of nanocellulose from waste sugarcane bagasse (SCB) and its characterization. *Carbohydr. Polym.* 86, 1291–1299.
- Merci, A., Urbano, A., Grossmann, M.V.E., Tischer, C.A., Mali, S., 2015. Properties of microcrystalline cellulose extracted from soybean hulls by reactive extrusion. *Food Res. Int.* 73, 38–43.
- Morán, J., Alvarez, V., Cyras, V., Vázquez, A., 2008. Extraction of cellulose and preparation of nanocellulose from sisal fibers. *Cellulose*.15, 149-159.
- Nascimento, P., Marim, R., Carvalho, G., Mali, S., 2016. Nanocellulose Produced from Rice Hulls and its Effect on the Properties of Biodegradable Starch Films. *Mater. Res.* 19, 167–174.
- Ng, H-M., Sin, L. T., Bee, S. T., Tee, T-T, Rahmat, A. R. A review of nanocellulose Polymer Composites Characteristics and Challenges. *Polym Plast Technol Eng.* 56, 687-731
- Paschoal, G.B., Muller, C.M.O., Carvalho, G.M., Tischer, C.A., Mali, S., 2015. Isolation and characterization of nanofibrillated cellulose from oat hulls. *Quím. Nova.* 38, 478-482
- Qu, X., Alvarez, P.J.J., Li, Q., 2013. Applications of nanotechnology in water and waste water treatment. *Water Res.* 47, 3931–3946.
- Qua, E.H., Hornsby, P.R., Sharma, H.S.S., Lyons, G., 2011. Preparation and characterisation of cellulose nanofibres. *J. Mater. Sci.* 46, 6029–6045.

- Sun, J., 2004. Isolation and characterization of cellulose from sugarcane bagasse. *Polym. Degrad. Stab.* 84, 331–339.
- TAPPI TEST METHOD T222 om-88, 1999. Acid-insoluble lignin in wood and pulp. In: *Tappi Test Methods*. Tappi Press, Atlanta
- Tamanini, C., de Oliveira, A.S., de Almeida Felipe, M. das G., Canettieri, E.V., de Jesus Cândido, E., de Oliveira Haully, M.C., 2004. Avaliação da casca de aveia para produção. v 26. 1509. *Acta Sci. Technol.* 26, 117–125.
- Valdebenito, F., Pereira, M., Ciudad, G., Azocar, L., Briones, R., Chinga-Carrasco, G., 2017. On the nanofibrillation of corn husks and oat hulls fibres. *Ind. Crops Prod.* 95, 528–534.
- Van Soest, P.J., 1965. Symposium on factors influencing the voluntary intake of herbage by ruminants: voluntary intake in relation to chemical composition and digestibility. *J. Anim. Sci.* 24, 834–843.
- Yang, H., Yan, R., Chen, H., Lee, D.H., Zheng, C., 2007. Characteristics of hemicellulose, cellulose and lignin pyrolysis. *Fuel* 86, 1781–1788.
- Zimmermann, T., Bordeanu, N., Strub, E., 2010. Properties of nanofibrillated cellulose from different raw materials and its reinforcement potential. *Carbohydr. Polym.* 79, 1086–1093.

4 CAPÍTULO III: NANOFIBRILLATED CELLULOSE FROM SOYBEAN HULLS USING BLEACHING COMBINED TO REACTIVE EXTRUSION

Abstract

The objectives of this study were to produce nanofibrillated cellulose (NFC) from soybeans hulls (SH) employing bleaching combined to reactive extrusion and to characterize the obtained material according its microstructure, morphology, crystallinity and thermal stability. The sample prepared by bleaching followed by reactive extrusion with H₂SO₄ presented a white color with the highest cellulose content (92.03 %), and the lowest contents of hemicelluloses (0.56 %) and lignin (1.32 %). The use of reactive extrusion and the combination of bleaching with peracetic acid and reactive extrusion were effective in obtainment of NFC, resulting in nanofibers with smaller diameters than 100 nm. Simultaneously to the NFC production, a fraction of the cellulose resulted in microcrystalline cellulose. The employed processes were effective and reduced the amount of effluents and also the time and washings usually required for NFC production.

Keywords: Agroindustrial residue, Reactive Extrusion, Bleaching, Nanocellulose.

4.1 INTRODUCTION

Lignocellulosic agroindustrial residues have been studied in the last decade as attractive sources for the extraction of low-cost and high-performance cellulose and nanocellulose. Compared to wood, which is the conventional industrial source of cellulose, the lignocellulosic residues have lower contents of lignin (Valdebenito et al. 2017; Thambiraj and Ravi Shankaran 2017).

Soybean is one of the main Brazilian agricultural products, with a production of 111 million tons in the 2016/2017 harvest (CONAB, 2017). Soybeans hulls (SH) are the by-product obtained from oil extraction, with approximately 5.7 billion tons by year. In general, SH are destined to animal feed or are discarded in the environment. SH present high cellulose (29–51 %) and lignin (1 – 4 %) contents (Rojas et al. 2014; Merci et al., 2015; Flauzino- Neto et al. 2016), so this raw material can be explored and also as source of nanocellulose.

Nanocellulose is defined as a material smaller than 100 nm in at least one dimension (Qu et al. 2013), and bacterial cellulose (BC), cellulose nanocrystals (CNC) and nanofibrillated cellulose (NFC) can be classified as nanocellulosic materials (García et al. 2016). According to Lindström (2017), NFC can be produced at large industrial scales, which is an advantage when it was compared to BC or CNC. NFC consists of long, flexible and entangled cellulose nanofibers with diameters of approximately 10–100 nm and lengths in the micrometer scale, and they consist of alternating crystalline and amorphous domains (Alila et al. 2013; Abdul Khalil et al. 2014).

NFC can be obtained from lignocellulosic residues by several chemical pre-treatments and conventional mechanical disintegration processes, such as homogenization, microfluidization and grinding, however some non-conventional processes can be used, including extrusion, steam explosion or high intensity ultrasonication (Lindström, 2017; Naderi et al 2017).

In a previous work, Merci et al. (2015) employed reactive extrusion to obtain of microcrystalline cellulose (MCC) from soybean hulls, and reported that this process was effective for this purpose, and showed the advantages of simplicity and reduction of pollution than conventional methods because it reduced the amount of effluents.

The purpose of this work is to explore the reactive extrusion to obtain NFC based on the process developed by Merci et al. (2015), but associating more extrusion steps of acid hydrolysis, as well as associating bleaching with peracetic acid to the extrusion. Paschoal et al. (2015) obtained NFC from oat hulls employing peracetic acid and reported that this type of bleaching are effective in removal of hemicelluloses and lignin, but preserves the cellulosic fiber, and also it is an environmentally safe alternative for bleaching because it is a chlorine free reagent.

The objectives of this study were to produce NFC from soybeans hulls employing bleaching combined to reactive extrusion and to characterize the obtained material according to its microstructure, morphology, crystallinity and thermal stability.

4.2 MATERIAL AND METHODS

4.2.1 Material

Soybean hulls were supplied by SL Alimentos (Mauá da Serra, Paraná, Brazil). The SH was dried (45 °C), and milled to yield particles < 0.30 mm.

4.2.2 Production of NFC

The NFC was produced from SH by reactive extrusion employing five different treatments listed in Table 1, based on Merci et al. (2015) with some modifications. The extrusion process was performed in a single screw extruder (AX Plastics, Diadema, SP, Brazil) with a diameter of 1.6 cm and a screw length/diameter ratio (L/D) of 40, with four heating zones and a cilindric matrix (0.8 cm in diameter). The temperature in all zones was 110 °C and the screw speed was 100 rpm. One hour before extrusion process, the reagents were dissolved in distilled water and homogenized with the SH in sealed plastic bags.

The ESH sample (Table 1) was obtained by extrusion only with water, resulting in a moisture content of 32 % (g/g). The ESH1 sample (Table 1) was prepared from SH after two-step extrusion processes, using in the first step NaOH, followed by extrusion with H₂SO₄. ESH2 sample (Table 1) was prepared in three

steps, in the first one, SH were extruded with NaOH, followed by two sequential extrusions steps with H₂SO₄.

Table 1 - Processing conditions to obtain nanofibrillated cellulose from SH.

Sample	Bleaching with Peracetic acid	Extrusion conditions		
		NaOH (%)	H ₂ SO ₄ (%)	Moisture (%)
ESH	-	-	-	32
ESH1	-	10	2	32
ESH2	-	10	2(2X)	32
BSH	1X	-	-	-
BESH	1X		2 (1X)	32

BSH was submitted for bleaching employing a peracetic acid solution with 50 % acetic acid (Synth – Brazil), 38 % hydrogen peroxide (Synth – Brazil) and 12 % distilled water, at 60°C under vigorously stirring for 48 h. At the end of the reaction, the bleached sample was neutralized until pH 5-6. The samples were dried at 60 °C in an air-circulating oven (Tecnal – São Paulo-Brazil) for 24 h and milled to yield particles < 0.30 mm. The BESH sample was bleached and then extruded in a one-step extrusion process with H₂SO₄ (Table 1).

After each extrusion step, all samples were washed with distilled and neutralized until pH 5-6, dried in a ventilated oven at 40 °C (035 Marconi MA — São Paulo, SP, Brazil) and milled to yield particles < 0.30 mm.

4.2.3 Centesimal composition of soybean hulls

To determine the proteins, lipids, moisture and ash content of SH, Association of Official Analytical Chemists (AOAC) methods (2003), were used, and the total carbohydrates were determined by taking the difference. The total dietary fiber and soluble and insoluble fractions were analyzed as described to AACC methods (AACC method 32-07, 1990). All essays were performed in triplicate.

4.2.4 Characterization of SH and SH submitted to bleaching and/or to reactive extrusion.

4.2.4.1 Cellulose, hemicelluloses and lignin contents

The cellulose and hemicelluloses were determined employed the Van Soest (1965) method, with some modifications. The lignin content was performed according to a standard method of Technical Association of Pulp and Paper Industry TAPPIT222 om-88 (1999).

4.2.4.2 Scanning electron microscopy (SEM).

SEM analyses were performed in a FEI Quanta 200 microscope (Oregon, USA). The dried samples were mounted for visualization on bronze stubs using double-sided tape. Then, the surfaces were then coated with a thin gold layer (40–50 nm), and an accelerating voltage of 30 kV, was employed for all samples.

4.2.4.3 Atomic force microscopy (AFM)

AFM was performed to measure the surface nanoscale of samples. AFM micrographs were recorded with a NanoSurf FlexAFM instrument (AG, Switzerland), using silicon AFM probes. Topography was carried in air. The dimension of the fibers was calculated from AFM micrographs using an image analysis program (ImageJ 1.37v®), and 20 measurements were used for this determination.

4.2.4.4 Fourier Transform-Infrared Spectroscopy (FT-IR).

The samples were pulverized and dried, then mixed with potassium bromide and compressed into tablets. The FT-IR analysis was performed using a Shimadzu FT-IR — 8300 (Japan), with a spectral resolution of 4 cm^{-1} and a spectral range of $4000\text{--}500\text{ cm}^{-1}$.

4.2.4.5 X-ray diffraction (XRD)

The samples were finely powdered (particles $> 0.149\text{ mm}$) and the analyses were carried by a PANalytical X'Pert PRO MPD diffractometer (Netherlands) with copper $K\alpha$ radiation ($\lambda = 1.5418\text{ \AA}$) under the operational conditions of 40 kV and 30 mA. All of the assays employed a ramp rate of $1^\circ/\text{min}$. The relative crystallinity indexes (CI) were calculated using the Segal et al. (1959) method, as follows: $\text{CI (\%)} = [(I_{002} - I_{\text{am}})/I_{002}] * 100$, where I_{002} is the intensity of the 002 peak (at approximately $2\theta = 20^\circ\text{--}22^\circ$) and I_{am} is the intensity corresponding to the peak at $2\theta = 18^\circ$.

4.2.4.6 Thermogravimetric analysis (TGA).

The thermogravimetric analysis (TGA 50 - Shimadzu, Japan) employed approximately 10 mg each sample, which was heated from 0 to $600\text{ }^\circ\text{C}$ at a heating rate of $10\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$. All the assays were performed out under a nitrogen atmosphere (50 mL min^{-1}).

4.2.4.7 Statistical analysis

The Statistical software version 7.0 (Statsoft, OK, US) was employed to perform the analyses of variance (ANOVA) and followed by Tukey mean comparison test ($p \leq 0.05$).

4.3 RESULTS AND DISCUSSION

4.3.1 Centesimal composition of soybean hulls

Soybean hulls presented a composition of 8.12 ± 0.25 % moisture, 3.45 ± 0.35 % ash, 28.15 ± 1.27 % proteins, 12.08 ± 1.15 lipids and 48.02 ± 4.05 % carbohydrates. The total dietary fiber content of SH was 38.01 ± 3.05 %, being 32.91 ± 2.08 % cellulose, 3.05 ± 0.89 % hemicelluloses and 2.05 ± 0.28 % lignin (Table 2). Our results agree with those of Merci et al. (2015), however, the hemicellulose content was lower than reported by Flauzino-Neto et al. (2013), who reported a hemicellulose content of 24 % for SH. SH have higher amounts of cellulose than lignin, and it is very attractive for the production of cellulose and nanocellulose because pretreatment processes are less demanding (Valdebenito et al. 2017).

In all the samples (ESH, ESH1, ESH2, BSH and BESH) the cellulose content increased significantly ($p \leq 0.05$) and hemicelluloses and lignin contents significantly decreased for the ESH1, ESH2, BSH and BESH samples when compared to raw SH (Table 2). Reactive extrusion with NaOH was effective in removal of hemicelluloses and lignin from SH, resulting in samples with higher cellulose contents than SH, as observed in ESH1 and ESH2 samples (Table 2).

Table 2 - Cellulose, hemicelluloses and lignin contents and crystallinity index (CI) of SH samples submitted to reactive extrusion and/or to bleaching

Samples	Cellulose (%)	Hemicelluloses (%)	Lignin (%)	CI (%)
SH	32.91 ± 2.08 f	3.02 ± 0.89 a	2.05 ± 0.28 a	36.65 d
ESH	45.34 ± 1.98 e	2.20 ± 0.35 a	1.52 ± 0.42 a, b	38.03 d
ESH1	69.75 ± 2.20 d	2.15 ± 0.38 a	1.49 ± 0.35 b	53.94 c
ESH2	78.20 ± 1.09 c	1.50 ± 0.11 b	1.49 ± 0.05 b	61.94 b
BSH	85.03 ± 0.42 b	1.15 ± 0.25 b	1.49 ± 0.04 b	72.25 a
BESH	92.03 ± 0.32 a	0.56 ± 0.15 c	1.32 ± 0.03 c	73.32 a

*Different letters in the same column indicate significant differences ($p \leq 0.05$) between means (Tukey test).

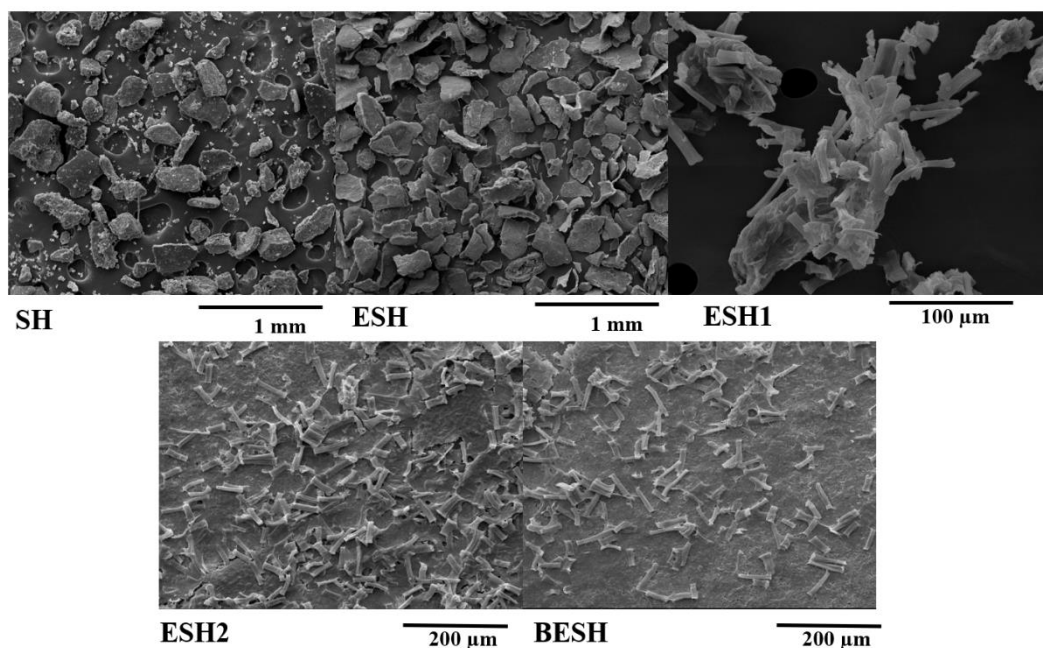
BESH sample, prepared by bleaching followed by extrusion with H_2SO_4 , presented a white color with the highest cellulose content (92.03 %), and the lowest contents of hemicelluloses (0.56 %) and lignin (1.32 %). The sum of the percentage of cellulose, hemicelluloses and lignin of BESH corresponds to 93.91 % of the total dry matter, while SH presented 38.01 %. Thus, hemicelluloses, lignin and other components (proteins, extractives and ash) were removed during bleaching and extrusion.

The bleaching with peracetic acid was very effective in removal of hemicelluloses, lignin and other components of SH (Table 2), and the reactive extrusion employed after bleaching was effective in promoting the acid hydrolysis of hemicellulose, as discussed below in the MEV and AFM images. The usual acid hydrolysis can be improved employing the extrusion technology, which employs high-temperature, short-duration process with the advantage of high versatility and absence of effluents (Lamsal et al. 2010).

4.3.2 Scanning electron microscopy (SEM)

The compact structure of the raw SH was notably affected by the treatments employed in this work, as seen in Fig. 1, except for ESH sample that was extruded only with 32 % moisture (without reagents), which presented the same compact structure than the raw residue.

Figure 1 - Micrographs obtained using SEM: SH, ESH, ESH1, ESH2 and BESH.



When the samples were processed in two-steps by reactive extrusion with NaOH followed by H_2SO_4 (ESH1) it can be observed a rupture of lignocellulosic complex, generating short and rod shaped fibers with diameters of $18 \pm 4 \mu m$ and lengths of $60 \pm 6 \mu m$ measured by SEM images, and it can be considered as MCC, and this result is similar to Merci et al. (2015), that developed the method for obtaintion of MCC by reactive extrusion. However, some fraction of ESH1 was not totally hydrolyzed during reactive extrusion, as observed in Fig. 1.

In ESH2 sample also can be observed the presence of MCC, with several short and rod shaped fibers, with diameters of $17 \pm 3 \mu m$ and lengths of $57 \pm 3 \mu m$, however this sample presented a non-uniform aspect, with a cellulosic material (like a film) deposited on the bottom of the stub with different size and appearance of the MCC-like material.

Similarly, in the BESH sample, obtained by bleaching followed by reactive extrusion the lignocellulosic complex was totally destructured, resulting in short and rod shaped fibers know as MCC, with lower diameters than ESH2 ($11 \pm 2 \mu\text{m}$) and similar lenghts, and in this sample we also observed formation of a film, with a different aspect of MCC.

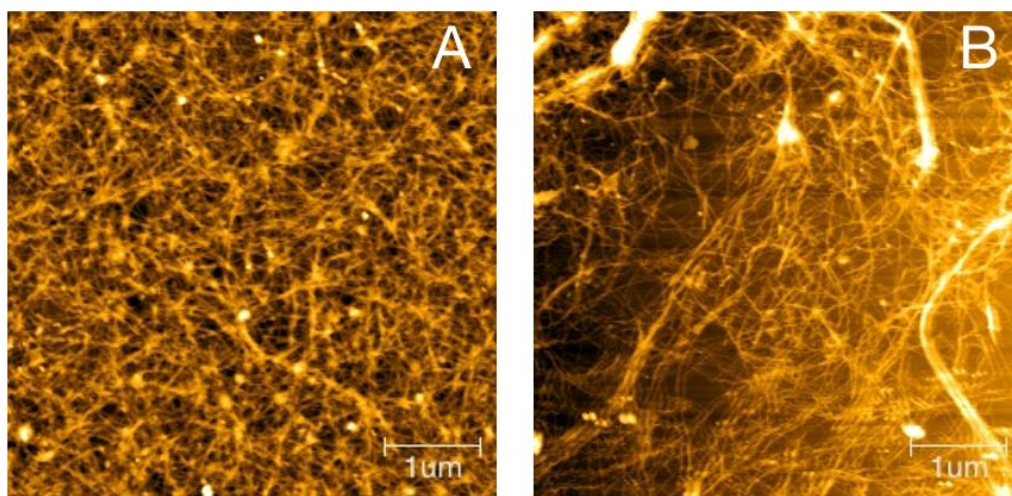
To obtain more information about these materials (ESH2 and BESH), a suspension (10 % m/v) of each sample was prepared in water and was submitted to ultrasonication for 15 min at 40% power output using a Fisher Scientific Sonicator model 505 (Pittsburgh, PA - USA), coupled with a probe with tip diameter of 1.27 cm. After this procedure, the suspensions were allowed to stand for 1 h for decantation of the larger particles, and the liquid phase were observed by AFM (results discussed bellow). In these both samples, around 50 % of ESH2 and 60 % of BESH were solubilized by ultrasonication.

During the preparation of ESH2 and BESH samples for MEV, the fibers with large diameters and appearance of MCC became more visible for MEV, and the material that was deposited in the botton required an ultrasonic solubilization step for deagglomeration and to be visible by AFM.

4.3.3 Atomic force microscopy (AFM)

Atomic force microscopy was employed to investigate the mophology of the ESH2 and BESH samples. It was observed an aspect of interconnected webs of tiny fibers with diameters in the nanometric scale ($< 100 \text{ nm}$) and lengths of several micrometers, being considered as NFC (Fig. 2). Considering the initial cellulose content of SH, the yields of ESH2 and BESH were 45 and 55 %, respectively.

Figure 2 - AFM pictures for cellulose nanocrystals: ESH2 (A) and BESH (B)

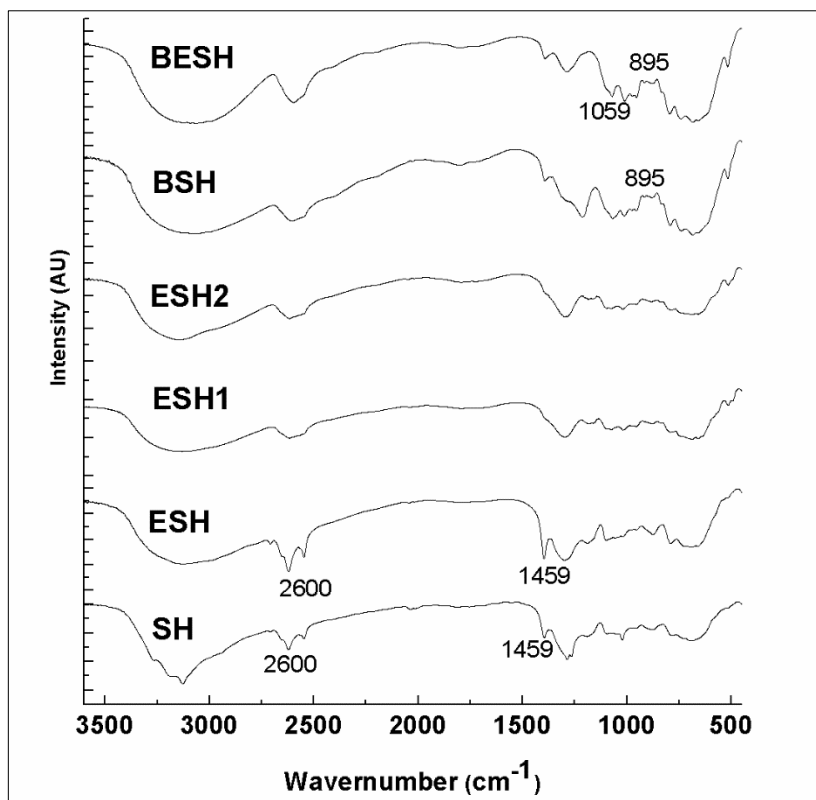


4.3.4 Fourier Transform-Infrared Spectroscopy (FT-IR)

Figure 3 presents the FT-IR spectra of SH, ESH, ESH1, ESH2, BSH and BESH samples. The samples had similar chemical groups, which are characteristic of lignocellulosic residues. However, some differences observed in FT-IR spectra can be associated with bleaching and reactive extrusion processes, which modified the composition of the samples.

The FT-IR spectra were very similar to that reported by Ferrer et al. (2016) and Flauzino Neto et al. (2016). All spectra display the characteristic band corresponding to O–H stretching between 3400 and 3200 cm^{-1} , which indicates H-bonding interactions in these materials (Merci et al. 2015).

Figure 3 - FT-IR spectra of SH, ESH, ESH1, ESH2, BSH, and BESH



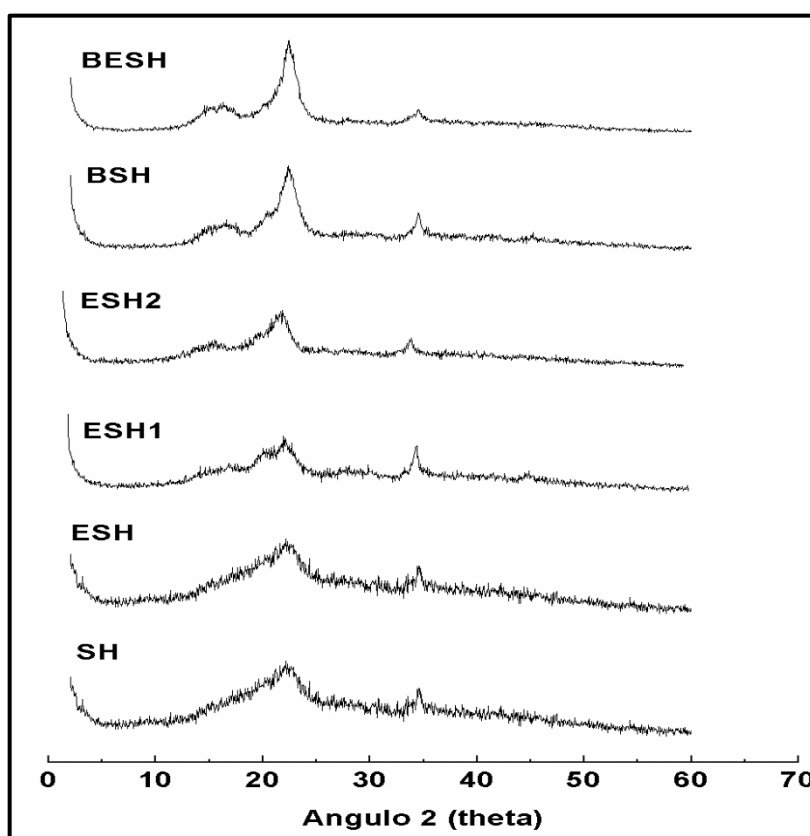
SH and ESH spectra presented the band at 1459 cm⁻¹, which is associated to the aromatic C=C stretching vibration of lignin. This band disappeared in the ESH1, ESH2, BSH and BESH2 samples, which had its lignin content significantly reduced (Table 2).

The BSH and BESH samples presented bands at 1059 and 895 cm⁻¹, which are typical of cellulosic materials. According to Ibrahim (2015), the band at 897 cm⁻¹ is associated as C-O-C stretching vibrations of the associated β (1 \rightarrow 4)-glycosidic linkage of cellulose.

4.3.5 X-ray diffraction (XRD)

Figure 4 and Table 2 presents the XRD patterns and crystallinity indexes (CI) of SH samples, respectively. In general, the samples are constituted of an amorphous broad hump and crystalline peaks, which are characteristic of semicrystalline materials, such as the lignocellulosic materials.

Figure 4 - X-ray diffractograms of SH, ESH, ESH1, BSH, and BESH samples.



Soybean hulls (SH) had a crystallinity index (CI) of 36.65 % with peaks $2\theta = 22^\circ$ and 34.7° , which are associated with cellulose type I (Ford et al. 2010). The observed results were similar with results reported by Merci et al. (2015).

The CI of samples varied from 38.03 % to 73.32 % (Table 2), and all extruded and/or bleached samples showed higher CI than raw SH. The ESH, ESH1 and ESH2 presented similar peaks to the SH, however these peaks presented higher intensities than in raw SH. In the XRD patterns of BSH and BESH the peaks observed were $2\theta = 22$ and 34.7° and also at $2\theta = 16^\circ$, with high insensitivity than SH, ESH, ESH1 and ESH2, and these peaks are also associated with cellulose type I.

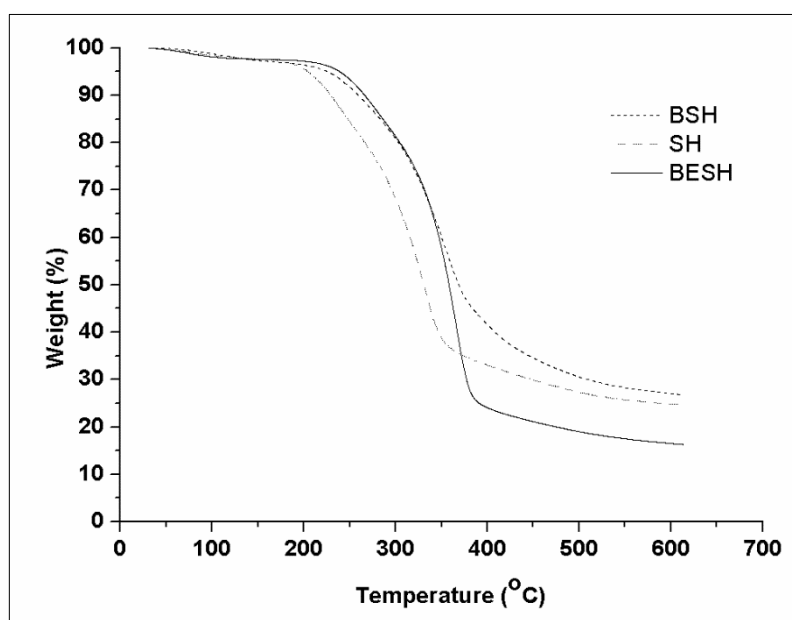
The increase of CI in all extruded and/or bleached samples resulted from removal of the amorphous fraction (lignin and hemicelluloses) from these samples, as higher the cellulose content, higher the CI (Table 2). According to Ibrahim (2015) an increase of crystallinity index in lignocellulosic material occurs due to reduction or removal of amorphous non-cellulosic compounds, which consists of lignin and hemicelluloses.

4.3.6 Thermogravimetric analysis (TGA)

The thermogravimetric analysis was employed only to characterize the bleached samples (BSH and BESH) and to compare them to SH to determine the influence of the combined bleaching and extrusion on thermal stability of samples.

As seen Figure 5, in all the samples there were decrease in percentage weight in range from 50 to 100 °C associated to water evaporation or other low molecular weight compounds from these materials.

Figure 5 - TGA curves of SH, BSH, and BESH



BSH and BESH samples had higher values for T_{max} and $T_{10\%}$ than SH (Table 3), this fact suggests the highest thermal stability of these samples.

Table 3 - TGA parameters of SH, BSH and BESH

TGA PARAMETERS	SAMPLES		
	SH	BSH	BESH
T_{\max} (°C)	330	355	368
$T_{10\%}$ (°C)	222	254	262

The beginning of SH and BESH sample degradation occurred at approximately 250 °C and 400 °C, respectively. This fact can be associated with the composition of samples. According to Cardoso et al. (2016) and Yang et al. (2007) in range from 250 to 350 °C and 315 to 400 °C the degradation of hemicelluloses and cellulose occurs, respectively. However, lignin presents larger degradation temperature range, from room temperature to 900 °C.

4.4 CONCLUSION

The use of reactive extrusion and the combination of bleaching with peracetic acid and reactive extrusion was effective in the obtainment of NFC, and both processes resulted in nanofibers with diameters < 100 nm. However, simultaneously to the NFC, a fraction of the samples resulted in microcrystalline cellulose. The employed processes reduced the amount of effluents and also reduced the time and washings employed in the obtainment of NFC.

REFERENCES

- Abdul Khalil HPS, Davoudpour Y, Islam MN, et al (2014) Production and modification of nanofibrillated cellulose using various mechanical processes: A review. *Carbohydr Polym* 99:649–665. doi: 10.1016/j.carbpol.2013.08.069
- AACC – American Association of Cereal Chemists, 1990. *Approved Methods of the American Association of Cereal Chemists*. AACC, St. Paul, MN.
- AOAC– Official Methods of Analysis, 14th ed. Ass. Off. Analytical. Chem. Washington, USA, 2003
- Alila S, Besbes I, Vilar MR, et al (2013) Non-woody plants as raw materials for production of microfibrillated cellulose (MFC): A comparative study. *Ind Crops Prod* 41:250–259. doi: 10.1016/j.indcrop.2012.04.028
- Cardoso MAP, Carvalho GM, Yamashita F, et al (2016) Oat hull fibers bleached by reactive extrusion with alkaline hydrogen peroxide in thermoplastic starch/poly(butylene adipate-co-terephthalate) composites. *Polym Compos*. doi: 10.1002/pc.24151
- Conab, Nacional Supply Company. Harvesting Safra 216/2017 of Brazil. <http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=1253/>(accessed 5 Outubro 2017).
- Ferrer A, Salas C, Rojas OJ (2016) Physical, thermal, chemical and rheological characterization of cellulosic microfibrils and microparticles produced from soybean hulls. *Ind Crops Prod* 84:337–343. doi: 10.1016/j.indcrop.2016.02.014
- Flauzino Neto WP, Mariano M, da Silva ISV, et al (2016) Mechanical properties of natural rubber nanocomposites reinforced with high aspect ratio cellulose nanocrystals isolated from soy hulls. *Carbohydr Polym* 153:143–152. doi: 10.1016/j.carbpol.2016.07.073
- Flauzino Neto WP, Silvério HA, Dantas NO, Pasquini D (2013) Extraction and characterization of cellulose nanocrystals from agro-industrial residue – Soy hulls. *Ind Crops Prod* 42:480–488. doi: 10.1016/j.indcrop.2012.06.041
- Ford ENJ, Mendon SK, Thames SF, Rawlins JW (2010) X-ray Diffraction of Cotton Treated with Neutralized Vegetable Oil-based Macromolecular Crosslinkers.
- García A, Gandini A, Labidi J, Belgacem N, Bras J (2016) Industrial and crop wastes: A new source for nanocellulose biorefinery. *Ind. Crops Prod*. 93: 26–38.
- Ibrahim HMM (2015) Green synthesis and characterization of silver nanoparticles using banana peel extract and their antimicrobial activity against representative microorganisms. *J Radiat Res Appl Sci* 8:265–275. doi: 10.1016/j.jrras.2015.01.007
- Lamsal B, Yoo J, Brijwani K, Alavi S (2010) Extrusion as a thermo-mechanical pre-treatment for lignocellulosic ethanol. *Biomass Bioenergy* 34:1703–1710. doi: 10.1016/j.biombioe.2010.06.009

- Lindström T (2017) Aspects on nanofibrillated cellulose (NFC) processing, rheology and NFC-film properties. *Curr Opin Colloid Interface Sci* 29:68–75. doi: 10.1016/j.cocis.2017.02.005
- Merci A, Urbano A, Grossmann MVE, et al (2015) Properties of microcrystalline cellulose extracted from soybean hulls by reactive extrusion. *Food Res Int* 73:38–43. doi: 10.1016/j.foodres.2015.03.020
- Naderi A, Koschella A, Heinze T, et al (2017) Sulfoethylated nanofibrillated cellulose: Production and properties. *Carbohydr Polym* 169:515–523. doi: 10.1016/j.carbpol.2017.04.026
- Paschoal GB, Muller CMO, Carvalho GM, et al (2015) Isolation and characterization of nanofibrillated cellulose from oat hulls. *Quím Nova*. doi: 10.5935/0100-4042.20150029
- Qu, X, Alvarez, PJJ, Li, Q (2013). Applications of nanotechnology in water and waste water treatment. *Water Res.* 47: 3931–3946.
- Rojas MJ, Siqueira PF, Miranda LC, et al (2014) Sequential proteolysis and cellulolytic hydrolysis of soybean hulls for oligopeptides and ethanol production. *Ind Crops Prod* 61:202–210. doi: 10.1016/j.indcrop.2014.07.002
- Subhedar PB, Ray P, Gogate PR (2017) Intensification of delignification and subsequent hydrolysis for the fermentable sugar production from lignocellulosic biomass using ultrasonic irradiation. *Ultrason Sonochem.* doi: 10.1016/j.ultsonch.2017.01.030
- Thambiraj S, Ravi Shankaran D (2017) Preparation and physicochemical characterization of cellulose nanocrystals from industrial waste cotton. *Appl Surf Sci* 412:405–416. doi: 10.1016/j.apsusc.2017.03.272
- Valdebenito F, Pereira M, Ciudad G, et al (2017) On the nanofibrillation of corn husks and oat hulls fibres. *Ind Crops Prod* 95:528–534. doi: 10.1016/j.indcrop.2016.11.006
- Van Soest PJ (1965) Symposium on factors influencing the voluntary intake of herbage by ruminants: voluntary intake in relation to chemical composition and digestibility. *J Anim Sci* 24:834–843.
- Yang H, Yan R, Chen H, et al (2007) Characteristics of hemicellulose, cellulose and lignin pyrolysis. *Fuel* 86:1781–1788. doi: 10.1016/j.fuel.2006.12.013

5 CAPÍTULO IV: PRODUÇÃO DE CASCA DE AVEIA OU CELULOSE NANOFIBRILADA IMPREGNADAS COM NANOPARTÍCULAS DE PRATA BIOLÓGICAS

Abstract

The objectives of this study were to produce oat hulls or nanofibrillated cellulose (NFC) impregnated with biological silver nanoparticles (bio-AgNP). Reactive extrusion combined bleaching with peracetic acid were employed to produced the NFC. The raw OH (oat hull) and NFC were impregnated with bio-AgNP and they were characterized according to their antibacterial activitie against *Escherihia Coli*. Raw OH impregnated with bio-AgNP showed antimicrobial activity against *E.coli*, however impregnated NFC did not show antimicrobial activity.

Keywords: Nanofibrillated Cellulose. Oat hulls. BIO-AgNP

5.1 INTRODUÇÃO

A agroindústria brasileira gera muitas fontes de biomassa que não são devidamente aproveitadas, transformando-as em resíduos industriais, dentre os quais, alguns resíduos lignocelulósicos, como a casca da aveia (resíduo do processamento da aveia), a qual é composta majoritariamente por celulose, hemicelulose e lignina. Desta forma, se torna vantajoso o aproveitamento deste resíduo com as mais diferentes propostas de utilização, no sentido de reduzir o seu acúmulo e o não aproveitamento pela indústria (Furlan et al., 2012).

O emprego de resíduos lignocelulósicos para obtenção de nanocelulose tem levantado grande interesse da comunidade científica em virtude da sua vasta aplicação. Dois tipos de nanocelulose podem ser obtidas a partir da celulose de origem vegetal, sendo classificadas como nanocristais de celulose, que possuem formato de agulha, dimensão igual ou inferior a 100 nm e natureza altamente cristalina; e celulose nanofibrilada, que se apresentam na forma de fibras alongadas com diâmetro inferior a 100 nm e comprimento de vários micrômetros, consistindo de regiões cristalinas e amorfas alternadas (Abdul Khalil et al., 2014).

Visando ampliar as aplicações da celulose e nanocelulose, estas podem ser modificadas com a inserção de grupamentos químicos com atividade antimicrobiana, como por exemplo, as nanopartículas de prata. As nanopartículas de pratas (NPAg), tem se destacado em virtude do seu excelente efeito microbiano. NPAg são compostos que apresentam baixa volatilidade, alta estabilidade térmica, elevada área de superfície em relação ao seu volume, proporcionando maior contato com o microrganismo e efeito antimicrobiano duradouro. Conseqüentemente, são utilizadas em diversos setores, tais como, roupas cirúrgicas, tratamentos de feridas e em filtros de água para piscina (Hassabo et al., 2014; Ramos et al., 2014). A produção de nanopartícula de prata pode ser realizada por métodos químicos ou biológicos, e os biológicos se caracterizam por empregar fungos, bactérias, plantas e outras biomoléculas para a produção de nanopartículas de prata biológicas (bio-NPAg), sem a presença de reagentes químicos, e conseqüentemente sem a geração de efluentes (Scandorieiro et al., 2016),.

Assim sendo, o objetivo desse trabalho foi produzir casca de aveia ou celulose nanofibrilada com propriedade antimicrobiana através da impregnação com nanopartículas de prata biológicas (bio-NPAg).

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1 Material

A casca de aveia foi fornecida pela empresa SL Alimentos (Mauá da Serra, Paraná, Brasil), seca (45 °C) e moída (< 0,30 mm).

5.2.2 Métodos

5.2.2.1 Produção de celulose nanofibrilada

Em uma primeira etapa, a casca de aveia *in natura* (OH) foi branqueada para obtenção de celulose pelo emprego do ácido peracético de acordo com método

descrito por Nascimento et al. (2016). Pesou-se 120 g do resíduo seco em Erlenmeyer de vidro de 2 L, adicionou-se 2 L de uma solução de ácido acético glacial, peróxido de hidrogênio e água (50 % de ácido acético glacial (Synth – Brasil), 38 % de peróxido de hidrogênio (Synth – Brasil) 120 volumes e 12 % de água), por 48 h, com agitação contínua a 60°C. O volume de solução foi suficiente para que toda a amostra ficasse imersa.

Após este processo a amostra foi neutralizada com uma solução de NaOH 10 % (m/v). Em seguida, a amostra foi lavada com 1 L de água e colocada em mesa agitadora orbital tipo shaker (BUNKER modelo NI 1715) a 60 °C por 24 h. Em seguida, as amostras foram secas em estufa a 60 °C 24 h e moídas em moinho de bancada (IKA A11 – São Paulo – Brasil).

Por fim, parte do resíduo branqueado foi extrusado na presença de ácido sulfúrico (2 % m/m) em extrusora monorosca (BGM modelo EL-25) contento parafuso com diâmetro de 250 mm e velocidade de 100 rpm. O material obtido foi neutralizado com uma solução de NaOH 10 % (m/v), e seco a 60 °C em estufa com circulação e renovação de ar (MARCONI – Piracicaba - Brasil). A amostra branqueada e extrusada foi denominada de BEOH.

5.2.2.2 Impregnação com nanopartículas de prata biológicas (bio-NP_{Ag})

As bio-NP_{Ag} foram produzidas de acordo com a metodologia proposta por Durán et al. (2005). Para o processo de impregnação utilizou-se 5 g de cada amostra (OH e BEOH) em 100 mL de solução de água destilada contendo bio-NP_{Ag} a 1 mM, a mistura foi sonicada por 30 min em ultrassonicador Fisher Scientific modelo 505 (Pittsburgh, PA - USA), com potência de 500 W, empregando-se ponteira Fisher Scientific modelo FB 4219 com 1,27 cm de diâmetro. Após a sonicação, o material foi incubado por 24 h, a 25 °C, sob agitação de 300 rpm em mesa agitadora tipo shaker (BUNKER modelo NI 1715). Em seguida, o sistema foi submetido à centrifugação por 30 min a 9000 rpm, as amostras foram secas a 60 °C por 24 h. A impregnação de Bio-NP_{Ag} foi realizada em cada amostra separadamente, sendo posteriormente denominadas de OH_{Ag} e BEOH_{Ag}.

5.2.2.3 Microscopia de força atômica (AFM)

As análises foram realizadas em um microscópio de força atômica (NanoSurf FlexAFM,) utilizando um cantilever de silício. A topografia foi realizada no ar. Para o cálculo do tamanho médio da celulose nanofirilada foi empregado 20 amostras aleatórias empregado o o software ImageJ™.

5.2.2.4 Análise da atividade antimicrobiana contra *E.coli*

Antes de avaliar a atividade antimicrobiana, cada amostra foi esterilizada por calor úmido. Após a esterilização, ressuspendeu-se cerca de 0,25 g de cada amostra (OH, OH_{Ag}, BEOH e BEOH_{Ag}) em 4 mL de meio de cultura caldo Mueller-Hinton (MH) (Synth – Brasil) contendo bactéria *Escherichia coli* ATCC 25922 a 5×10^5 UFC/mL. De acordo com a turbidez da escala 0,5 de McFarland, preparou-se uma suspensão bacteriana em solução salina (NaCl 0,85 %) contendo 1×10^8 UFC/mL de bactéria, sendo que 20 µL dessa suspensão juntamente com 3.980 µL de MH caldo foram adicionados a cada amostra (0,25 g). Amostras não impregnadas

com bio bio-NP_{Ag} foram utilizadas como controle negativo de atividade antibacteriana.

Foram utilizados como controles de esterilidade 0,25 g de cada amostra, que foram ressuspensos em 4 mL de caldo MH. O cultivo da bactéria em MH caldo puro foi utilizado como controle de viabilidade microbiana. Todas as amostras (OH, OH_{Ag}, BEOH e BEOH_{Ag}, controle de esterilidade e controle de viabilidade) foram incubadas a 37 °C, sob agitação de 150 rpm por 24 h.

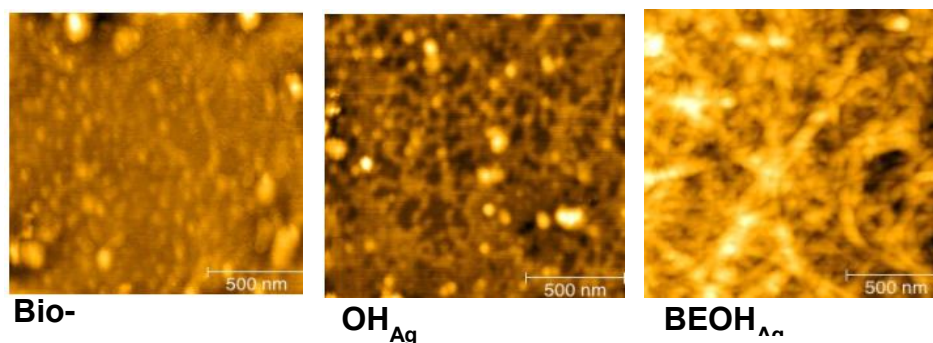
A análise da atividade antimicrobiana foi realizada quantitativamente. Sabendo-se que o inóculo bacteriano inicial exposto às amostras OH e BEOH foi de 5×10^5 UFC/mL, foi realizada uma quantificação do número de células bacterianas viáveis após as 24 h de tratamento. Para mensurar o número de células, 10 µL de cada amostra diluída ($1:10^2$ e $1:10^4$) e não diluída, foram transferidos para placas de Petri contendo ágar nutriente. As diluições foram realizadas em solução salina (NaCl 0,85%). As placas foram incubadas a 37°C por 24 h. A contagem de colônias foi realizada visualmente e o resultado final foi expresso em UFC/mL. O experimento foi realizado em triplicata.

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.3.1 Microscopia de Força Atômica (AFM)

Pode-se observar através das imagens de AFM (Figura 1) o aspecto das nanopartículas de prata empregadas neste trabalho, que apresentavam formato arredondado e diâmetros na escala nanométrica.

Figura 1 - Microscopia de força atômica (AFM) da bio-NP_{Ag} e das amostras OH_{Ag}, e BEOH_{Ag}.



A amostra BEOH (Figura 1) pode ser classificada como celulose nanofibrilada, pois apresentou-se como uma rede de fibras finas com diâmetros na escala nanométrica (de 100 ± 25 nm), e comprimentos de vários micrômetros. Pode-se observar que as nanopartículas de prata encontram-se depositadas sobre a casca *in natura* (OH_{Ag}) e sobre a celulose nanofibrilada (BEOH_{Ag}), sugerindo portanto uma possível interação entre as amostras e a bio-NP_{Ag}.

5.3.2 Atividade Antimicrobiana Frente à Bactéria *E.coli*

De acordo com a Tabela 1, todas as amostras foram eficientemente esterilizadas antes de realizar o tratamento da cultura de *Escherichia coli*. Após 24 h de incubação das amostras juntamente com meio de cultura desprovido do microrganismo, não se observou crescimento bacteriano, mostrando que as amostras estavam livres de contaminação. Portanto, o método de esterilização das amostras por calor úmido utilizando autoclave foi adequado, pois eliminou as possíveis contaminações e não eliminou a atividade antimicrobiana da bio-NP_{Ag}.

Tabela 1 - Controle de esterilidade das amostras

Diluição	Controle de esterilidade (UFC/mL)			
	OH	BEO	OH _A	BEOH _A
		H	g	g
0	0	0	0	0
-2	0	0	0	0
-4	0	0	0	0

O teste antimicrobiano frente à bactéria *E. coli* encontra-se apresentado na Tabela 2. Apenas a amostra OH_{Ag} inibiu o crescimento da bactéria *E.coli*, provavelmente por mecanismo de ação bactericida. Segundo Ibrahim (2015), as nanopartículas de prata são agentes bactericidas de amplo espectro, que possuem larga área de superfície, resultando em excelente contato com o microrganismo. Esses autores ainda relatam que as bactérias Gram-negativas são mais susceptíveis

à ação antimicrobiana das nanopartículas de prata devido à composição da sua parede celular, que possui a camada peptidoglicana mais delgada, facilitando a entrada da nanopartícula na célula bacteriana.

Tabela 2 - Teste antimicrobiano das amostras frente à bactéria *E.coli*.

DILUIÇÃO	Contagem bacteriana (UFC/mL)			
	OH	BEOH	OH _{Ag}	BEOH _{Ag}
0	5×10^8	5×10^8	0	5×10^5
-2	5×10^8	5×10^8	0	5×10^5
-4	5×10^8	5×10^8	0	4

De acordo com Nel et al. (2009) e Marambio-Jones e Hoek (2010), alguns mecanismos podem elucidar o efeito das nanopartículas de prata frente as bactérias Gram-negativas. Pode ocorrer a ligação da nanopartícula com a membrana celular, provocando modificações físicas e químicas, resultando em alterações nas funções básicas tais como, permeabilidade, osmorregulação, transporte de elétrons e respiração celular. Além disso, as nanopartículas podem interagir com o DNA e proteínas do microrganismo, proporcionando maiores danos a célula. Por fim, pode ocorrer o aumento do efeito bactericida, oriundo da liberação de íons de prata das nanopartículas.

A ação antimicrobiana do produto é exclusivamente da bio-NP_{Ag}, justificando a necessidade de sua incorporação na casca de aveia *in natura* ou celulose nanofibrilada. A casca de aveia *in natura* (OH), a amostra BEOH e BEOH_{Ag} não apresentaram atividade antimicrobiana contra *E. coli*. A contagem microbiana aumentou de 5×10^5 UFC/mL (inóculo bacteriano inicial) para aproximadamente 10^8 UFC/mL nas amostras OH e BEOH, comprovando a ausência de atividade antimicrobiana dessas amostras (Tabela 2). Já na amostra BEOH_{Ag}, provavelmente, algum resíduo químico proveniente do tratamento de branqueamento e da extrusão reativa diminuiu essa propriedade do material, evidenciando, portanto que a lavagem final do material precisa ser mais efetiva.

5.4 CONCLUSÃO

Foi possível produzir casca de aveia *in natura* e celulose nanofibrilada obtida a partir da casca de aveia impregnadas com nanopartículas de prata biológicas, no entanto, apenas a casca de aveia *in natura* impregnada apresentou atividade antimicrobiana frente a bactéria *E.coli*. A ausência de atividade antimicrobiana da celulose nanofibrilada pode estar vinculada a resíduos químicos presentes na amostra em virtude dos processos empregados para a sua obtenção. Portanto, conclui-se que a lavagem final do material precisa ser mais efetiva.

REFERÊNCIAS

- Abdul Khalil, H.P.S., Davoudpour, Y., Islam, M.N., Mustapha, A., Sudesh, K., Dungani, R., Jawaid, M., 2014. Production and modification of nanofibrillated cellulose using various mechanical processes: A review. *Carbohydr. Polym.* 99, 649–665.
- Durán, N., Marcato, P.D., Alves, O.L., Souza, G.I.H., Esposito, E. 2005. Mechanistic aspects of biosynthesis of silver nanoparticles by several *Fusarium oxysporum* strains. *J. Nanobiotechnology* 1, 3-8.
- Flauzino Neto, W.P., Silvério, H.A., Dantas, N.O., Pasquini, D., 2013. Extraction and characterization of cellulose nanocrystals from agro-industrial residue – Soy hulls. *Ind. Crops Prod.* 42, 480–488. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.06.041>
- Furlan, L.G., Duarte, U.L., Mauler, R.S., 2012. Avaliação das propriedades de compósitos de polipropileno reforçados com casca de aveia. *Quim Nova* 35, 1499–1501.
- Hassabo, A.G., Nada, A.A., Ibrahim, H.M., Abou-Zeid, N.Y., 2015. Impregnation of silver nanoparticles into polysaccharide substrates and their properties. *Carbohydr. Polym.* 122, 343–350.
- Ibrahim, H.M.M., 2015. Green synthesis and characterization of silver nanoparticles using banana peel extract and their antimicrobial activity against representative microorganisms. *J. Radiat. Res. Appl. Sci.* 8, 265–275.
- Marambio-Jones, C., Hoek, E.M.V., 2010. A review of the antibacterial effects of silver nanomaterials and potential implications for human health and the environment. *J. Nanoparticle Res.* 12, 1531–1551. <https://doi.org/10.1007/s11051-010-9900-y>
- Nel, A.E., Mädler, L., Velegol, D., Xia, T., Hoek, E.M.V., Somasundaran, P., Klaessig, F., Castranova, V., Thompson, M., 2009. Understanding biophysicochemical interactions at the nano–bio interface. *Nat. Mater.* 8, 543–557. <https://doi.org/10.1038/nmat2442>
- Ramos, M., Fortunati, E., Peltzer, M., Dominici, F., Jiménez, A., Garrigós, M. del C., Kenny, J.M., 2014. Influence of thymol and silver nanoparticles on the degradation of poly(lactic acid) based nanocomposites: Thermal and morphological properties. *Polym. Degrad. Stab.* 108, 158–165.
- Scandorieiro, S., de Camargo, L.C., Lancheros, C.A.C., Yamada-Ogatta, S.F., Nakamura, C.V., de Oliveira, A.G., Andrade, C.G.T.J., Duran, N., Nakazato, G., Kobayashi, R.K.T., 2016. Synergistic and Additive Effect of Oregano Essential Oil and Biological Silver Nanoparticles against Multidrug-Resistant Bacterial Strains. *Front. Microbiol.* 7.

6 CAPÍTULO V: COMBINACIÓN DE FÍSICOS Y QUÍMICOS PRETRATAMIENTOS EN LAS PROPIEDADES DE LA CASCARA DE TRIGO Y LA CASCARA DE AVEENA

Abstract

The objective of this present study was to evaluate the combination of physical and chemical pretreatments on properties of wheat bran (WB) and oat hull (OH). Steam explosion and ultrasonication were employed as pretreatments, and in the both process WB and OH were dispersed in different conditions employing H₂SO₄, NaOH or distilled water. Among the two methods, steam explosion in presence of H₂SO₄ was more effective on the release of sugars (total and reducing sugars, xylose and glucose) and also on the increase of cellulose and decrease lignin and hemicelluloses contents of both residues.

Keywords: steam explosion; ultrasonication; lignocellulosic residues.

6.1 INTRODUCTION

Brazil is widely known to have a high diversity of renewable natural resources, being the agriculture one of its main business activities, generating several types of lignocellulosic biomass as agricultural or agroindustrial residues, such as sugarcane bagasse, oat hull, soybean hull, corn hull, wheat bran and cassava bagasse (Forster-Carneiro et al., 2013).

Wheat bran (WB) and oat hull (OH) are the main byproduct of the oat and wheat processing industry, respectively. WB have significant importance in the agricultural scenery, with a production of approximately 5.534 thousand ton in the Brazilian harvest of 2015/2016 (Conab, 2016). OH presents in its composition 90 % of insoluble fibers (Paschoal et al., 2015), and 706 million ton of this cereal was produced in the 2016/2017 harvest in Brazil (Conab, 2016).

These lignocellulosic residues can be employed as feedstock for the production of bioethanol and others products, such as xylitol, due its composition with high concentration of cellulose and hemicelluloses, which can be converted to glucose, xylose, and other monosscharides (Rehman et al., 2014).

However, the application of these residues as substrate for fermentation processes requires the use of pretreatments in which the cellulose are made accessible for further conversion, and in this step the hydrolysis of hemicellulose may occur, as well as separation of the lignin fraction (Harmsen et al., 2010). Several physical, physico-chemical, chemical and biological pretreatments were described in literature, and also the association between them (Talebnia et al., 2010).

Steam explosion has been used for the treatment of several lignocellulosic biomass, and it involves heating of the lignocellulosic material at high temperatures and pressures, followed by mechanical disruption. The high-pressure steam modifies the plant cell wall structure, generating a dark brown material from which partially hydrolysed hemicelluloses are easily recovered by water-washing, leaving a water-insoluble fraction composed of cellulose, residual hemicelluloses and a chemically modified lignin. It can also be carried out with the presence of acids or basis (Ramos, 2013).

The ultrasonic method also been employed as pretreatment of agro-industrial lignocellulosic biomass. This technique uses the association of mechanical vibration and sonochemical effects in biomass, which aim at the alteration in its

surface structure and the production of antioxidant radicals that promote chemical changes in the fiber components (Bhutto et al., 2017).

Thus, the objective of the present study was to evaluate the effects of steam explosion and ultrasonication, both combined to sulfuric acid (H_2SO_4) or sodium hydroxide (NaOH), as pretreatments of WB and OH.

6.2 MATERIAL AND METHODS

6.2.1 Material

Wheat bran (WB) was purchased in a local market (Jasmine, Curitiba-PR, Brazil) and oat hull (OH) were kindly provided by SL Alimentos (Mauá da Serra-PR, Brazil) and both residues were dried (60 °C) and milled to yield particles ≤ 0.30 mm.

6.2.2 Methods

6.2.2.1 Steam explosion

The steam explosion pretreatment was performed in an autoclave with a pressure of 1 atm, at a temperature of 121 °C, during 30 min. WB or OH (22 g) were dispersed in 200 mL of 3 different solutions: (a) 1 % (m/v) H_2SO_4 (Synth – Brazil), b) 10 % (m/v) NaOH (Synth – Brazil) and c) pure distilled water. Then, the samples were vacuum filtered and the liquid hydrolysate was recovered and neutralized until a pH range of 5.5 – 6.5 and its sugar contents were quantified.

The residual solid fraction of each sample was washed until a neutral pH and it was dried at 35 °C for 12 – 24 h in an air-circulating oven (Tecnal – São Paulo-Brazil). The samples were labeled as $WS_{H_2SO_4}$, WS_{NaOH} , WS_{water} and $OS_{H_2SO_4}$, OS_{NaOH} , OS_{water} for WB and OH submitted to steam explosion, respectively.

6.2.2.2 Ultrasonication

WB and OH were submitted to the ultrasonication treatment for 30 min at 40% power output using a Fisher Scientific Sonicator model 505 (Pittsburgh, PA - USA) coupled with a probe with tip diameter of 1.27 cm (Fisher Scientific model FB 4219, Pittsburgh, PA – USA), at a temperature of 80°C. WB or OH (22 g) were dispersed in 200 mL of 3 different solutions: (a) 1 % (m/v) H₂SO₄ (Synth – Brazil), b) 10 % (m/v) NaOH (Synth – Brazil) and c) pure distilled water. Then, the samples were vacuum filtered and the liquid hydrolysate was recovered and neutralized until a pH range of 5.5 – 6.5 and its sugar contents were quantified.

The residual solid fractions were washed until a neutral pH and they were dried at 35 °C for 12 – 24 h in an air-circulating oven (Tecnal – São Paulo-Brazil). The WB and OH samples submitted to ultrasonication were labeled as WU_{H₂SO₄}, WU_{NaOH}, WU_{water} and OU_{H₂SO₄}, OU_{NaOH}, OU_{water}, respectively.

6.2.2.3 Quantification of sugars on liquid hydrolysates

6.2.2.3.1 Total sugars

Total sugar present in the liquid hydrolysates were determined by the phenol-sulfuric acid method of Dubois et al. (1956), and glucose was employed to obtain the calibration curve.

6.2.2.3.2 Reducing sugars

Reducing sugars were determined employing 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) method according to Miller (1959) method, and glucose was employed to obtain the calibration curve.

6.2.2.3.3 Xylose

Xylose concentration was determined according to Pham et al. (2011), in which it was used 0.5 mL of each hydrolysate sample and 1 mL Bial's reagent. The tubes were incubated in a boiling water bath until the color changed and the absorbance was determined in a UV-Vis spectrophotometer at 671 nm. Xylose concentrations were obtained from the xylose calibration curve.

6.2.2.3.4 Content of monosaccharides determined by HPLC (high-performance liquid chromatography)

The manitol, arabinosis, galactose, glucose, manose and fructose concentration were determined by HPLC. HPLC assays were realized according to Pauli et al. (2014) employing a chromatographic system consisted of: inert pump of highpressure LC-10Ai (Shimadzu, Kyoto, Japan); 3-way low-pressure NResearch-1367-72 solenoid valve; autosampler SIL-Prominence 20A (Shimadzu); guard column and column CarboPac PA1 (4.0 x 250 mm, 10 μ m; Dionex, Sunnyvale, USA); column oven (Waters) coupled with 650 CHX controller (Pickering); source of ± 12 V RS570 (Stanford); electrochemical cell ED-50 (Dionex); potentiostat Autolab PGSTAT 30 and interface (Eco-Chemie, Utrecht, Netherlands); software GPES for data acquisition and processing, and software INTEGRA for areas integrations. The HPLC system ran at isocratic mode with NaOH 1.4 mmol L⁻¹ (as eluent: 0 - 45 min and for re-equilibrate: 57.6 - 72.6 min) and NaOH 300.0 mmol L⁻¹ (for regeneration: 45.1 - 57.5 min). The flow rate was 1.0 mL min⁻¹; injection volumen was 20.0 μ L. The employed pre-column and column was CarboPac PA-1 at 28 °C; amperometric pulse waveform in ED-50-Au: +0.20 V (400 ms); +0.65 V (200 ms) and -0.20 V (400 ms). The monosaccharides standard solution were obtained from the calibration curve.

6.2.2.4 Characterization of the residual solid fraction

6.2.2.4.1 Cellulose, hemicelluloses and lignin contents

The cell wall constituents (cellulose and hemicelluloses) were determined employing the Van Soest (1965) method, with some modifications. The lignin content was determined according to a standard method of Technical Association of Pulp and Paper Industry TAPPIT222 om-88.

6.2.2.4.2 Scanning electron microscopy (SEM)

SEM analyses were carried out with a FEI Quanta 200 microscope (Oregon, USA). Firstly, the dried samples were mounted for visualization on bronze stubs using double-sided tape. The surfaces were then coated with a thin gold layer (40–50 nm), and it was utilized an accelerating voltage of 30 kV for all samples.

6.2.2.4.3 Fourier transform-infrared spectroscopy (FT-IR)

The samples were pulverized and dried, then mixed with potassium bromide and compressed into tablets. The FT-IR analysis was performed using a Shimadzu FT-IR- 8300 (Japan), with a spectral resolution of 4 cm⁻¹ and a spectral range of 4000–500 cm⁻¹.

6.2.2.4.4 X-ray diffraction

The crystallinity of each sample was investigated using X-ray diffraction (XRD). The samples were finely powdered (particles < 0.149 mm), and the analysis was performed using a PANalytical X'Pert PRO MPD diffractometer (Netherlands) with copper K α radiation ($\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$) under the operational conditions of 40 kV and 30 mA. All of the assays were performed with a ramp rate of 1°/min. The relative crystallinity index (CI) was calculated using the Segal, Creely, Martin, and Conrad (1959), as follows: $CI (\%) = [(I_{002} - I_{am})/I_{002}] * 100$, where I_{002} is the intensity of the 002

peak (at approximately $2\theta = 20^\circ - 22^\circ$) and I_{am} is the intensity corresponding to the peak at $2\theta = 18^\circ$.

6.2.2.5 Statistical analysis

The Statistical software version 7.0 (Statsoft, OK, US) was employed to perform the analyses of variance (ANOVA) and followed by Tukey mean comparison test ($p \leq 0.05$).

6.3 RESULTS AND DISCUSSION

6.3.1 Quantification of Sugars in The Hydrolysates Samples

Steam explosion and ultrasonic pretreatments associated with reagents (H_2SO_4 and NaOH) resulted in an increase of total and reducing sugars and also in xylose contents (Tables 1 and 2) of WB and OH. In general, steam explosion was more efficient than ultrasonication, and the samples submitted to steam explosion in presence of sulfuric acid ($\text{WS}_{\text{H}_2\text{SO}_4}$ and $\text{OS}_{\text{H}_2\text{SO}_4}$) presented the higher sugars contents (Tables 1 and 2). The $\text{WS}_{\text{H}_2\text{SO}_4}$ presented the higher xylose contents in all employed conditions (Tables 1 and 2). According to Chen et al. (2011) and Apprich et al. (2014) xylose can be used as substrate for the production of several products such as furans, acetic acid and xylitol.

Table 1 - Total and reducing sugars and xylose contents of WB samples submitted to steam explosion and ultrasonication.

Sample	Total Sugars (mg/mL)	Reducing Sugars (mg/mL)	Xylose (mg/mL)	The data are the means of replicates determined
WS_{water}	99.29 ± 1.05 e	1.10 ± 0.011 c	5.04 ± 0.02 b	
$\text{WS}_{\text{H}_2\text{SO}_4}$	327.02 ± 0.81 a	57.96 ± 1.96 a	24.00 ± 0.01 a	
WS_{NaOH}	221.24 ± 1.07 b	1.99 ± 0.05 c	0.44 ± 0.01 c	
WU_{water}	88.33 ± 0.25 f	1.38 ± 0.06 c	7.87 ± 0.09 b	
$\text{WU}_{\text{H}_2\text{SO}_4}$	136.24 ± 0.30 c	10.79 ± 0.47 b	5.86 ± 0.01 b	
WU_{NaOH}	124.73 ± 0.51 d	2.38 ± 0.05 c	0.23 ± 0.22 c	

minations \pm standard deviation. Different letters indicate significant differences between means in same column. (Teste Tukey $p \leq 0.05$).

Table 2 - Total and reducing sugars and xylose contents of OH samples submitted to steam explosion and ultrasonication

Sample	Total Sugars (mg/mL)	Reducing sugars (mg/mL)	Xylose (mg/mL)
OS _{water}	125.93 ± 0.39 e	1.86 ± 0.01 c	0.12 ± 0.03d
OS _{H₂SO₄}	347.77 ± 0.21 a	44.74 ± 0.15 a	2.74 ± 0.01 a
OS _{NaOH}	184.16 ± 1.58 b	3.03 ± 0.26 c	0.99 ± 0.06 b
OU _{water}	96.30 ± 1.74 f	1.39 ± 0.10 c	0.11 ± 0.01d
OU _{H₂SO₄}	174.14 ± 0.19 c	5.24 ± 0.34 b	0.92 ± 0.07b
OU _{NaOH}	148.07 ± 0.76 d	2.91 ± 0.04 c	0.71 ± 0.05 c

The data are the means of replicate determinations ± standard deviation. Different letters indicate significant differences between means in same column. (Teste Tukey $p \leq 0.05$).

Considering the monosaccharides determined by HPLC, the both pretreatment methods resulted in release of higher amounts of glucose from the WS and OH samples (Table 3 and Table 4). The glucose is the main substrate used as source of microbial carbon during biorefinery process (Reisinger et al., 2014). The glucose content ranged from 2.79 % (WS_{NaOH}) to 34.73 % (WU_{H₂SO₄}) for WB samples, and from 3.70 % (OS_{NaOH}) to 58.59 % (OS_{H₂SO₄}) for OH samples. These results are higher than related others authors. Ranjan and Moholkar (2013) obtained 38 % of glucose content from rice straw by enzyme assisted acid hydrolysis. Jiang and Guo (2016) evaluated saccharification of wheat bran by steam explosion and enzymatic hydrolysis and extracted 12 % of glucose. Arabinosis was the monosaccharide obtained in smaller proportions in this study (Tables 3 and 4).

Table 3 - Monosaccharides contents of WB submitted to steam explosion and ultrasonication.

Sample	Monosaccharides (%)			
	Arabinosis	Galactose	Glucose	Fructose
WS _{water}	0.29 ± 0.02 b	0.05 ± 0.02 d	27.97 ± 2.93 b	6.87 ± 0.08 a
WS _{H₂SO₄}	10.03 ± 0.02 a	7.58 ± 0.07 a	34.73 ± 0.03 a	7.08 ± 0.02 a
WS _{NaOH}	-	0.07 ± 0 c	2.79 ± 0 c	0.38 ± 0.01 b
WU _{water}	0.03 ± 0 c	0.16 ± 0 c	24.14 ± 0 b	-
WU _{H₂SO₄}	0.08 ± 0 c	3.33 ± 0 b	27.94 ± 0.03 b	-
WU _{NaOH}	-	-	-	-

The data are the means of replicate determinations ± standard deviation. Different letters indicate significant differences between means in same column. (Teste Tukey $p \leq 0.05$).

Table 4 - Monosaccharides contents of OH submitted to steam explosion and ultrasonication.

Sample	Monosaccharides (%)			
	Arabinosis	Galactose	Glucose	Fructose
OS _{water}	0.45 ± 0,10 b	0.16 ± 0.05 d	11.38 ± 1.19 c	-
OS _{H₂SO₄}	0.98 ± 0.03 a	9.68 ± 0 a	58.59 ± 0 a	-
OS _{NaOH}	0.11 ± 0.16 d	0.01 ± 0.02 e	3.70 ± 0.02 d	-
OU _{water}	0.27 ± 0.04 c	0.50 ± 0.12 c	4.06 ± 0.01 d	-
OU _{H₂SO₄}	0.99 ± 0.02 a	8.71 ± 0 b	47.75 ± 0 b	0.22 ± 0.03
OU _{NaOH}	-	-	-	-

The data are the means of replicate determinations ± standard deviation. Different letters indicate significant differences between means in same column. (Teste Tukey $p \leq 0.05$).

Steam explosion in presence of H₂SO₄ was the more effective method considering the release of sugars from the lignocellulosic residues used in this work, and has the advantages of simplicity, low investment and can be employed on several raw materials (Menon and Rao, 2012).

6.3.2 Cellulose, hemicelluloses and lignin contents of residual solid fraction

As seen in Table 5 and Table 6, the cellulose contents were 7.19 % and 31.16 %, hemicelluloses were 28.18 and 28.72 %, and lignin were 6.40 and 18.12 % for WB and OH, respectively. These results were similar with those reported by Tamanini and Hauli (2004) and Tirpanalan et al. (2014).

Steam explosion and ultrasonication carried out with water (WS_{water} , WU_{water} , OS_{water} and OU_{water}) resulted in samples with significant higher cellulose and lower lignin contents when compared with their respective raw residues (Tables 5 and 6).

Table 5 - Cellulose, hemicelluloses and lignin of WB and residual solid fractions obtained from WB submitted to steam explosion and ultrasonication

Sample	Cellulose (%)	Hemicelluloses (%)	Lignin (%)
WB	7.19 ± 0.33 d	28.18 ± 0.65 a	6.40 ± 0.30 a
WS_{water}	19.75 ± 0.42 c	24.44 ± 0.75 b	4.47 ± 0.47 b
$WS_{\text{H}_2\text{SO}_4}$	39.17 ± 1.06 a	13.24 ± 1.23 c	3.21 ± 0.21 c
WS_{NaOH}	24.59 ± 1.04 b	18.69 ± 0.79 b	4.50 ± 0.01 b
WU_{water}	17.00 ± 0.42 c	27.12 ± 0.04 a	5.06 ± 0.06 b
$WU_{\text{H}_2\text{SO}_4}$	29.63 ± 0.62 b	21.84 ± 0.94 b	3.48 ± 0.02 c
WU_{NaOH}	19.20 ± 1,02 c	25.05 ± 0.69 a,b	4.85 ± 0.04 b

The data are the means of replicate determinations ± standard deviation. Different letters indicate significant differences between means in same column (Teste Tukey $p \leq 0.05$).

Table 6 - Cellulose, hemicelluloses and lignin of OH and residual solid fractions obtained from WB submitted to steam explosion and ultrasonication

Samples	Cellulose (%)	Hemicelluloses (%)	Lignin (%)
OH	31.16 ± 1.15 d	28.72 ± 0.25 a	18.12 ± 0.63 a
OS _{water}	50.73 ± 1.99 b	26.52 ± 2.84 a	8.47 ± 1.84 c
OS _{H₂SO₄}	61.53 ± 1.06 a	13.69 ± 1.55 c	7.24 ± 0.26 c
OS _{NaOH}	55.89 ± 1.20 a,b	21.45 ± 1.09 b	7.70 ± 0.14 c
OU _{water}	37.15 ± 1.05 c	27.92 ± 1.04 a	12.57 ± 0.21 b
OU _{H₂SO₄}	48.19 ± 2.18 b	21.83 ± 0.86 b	9.55 ± 1.48 c
OU _{NaOH}	40.42 ± 2.31 c	25.72 ± 0.66 a	11.14 ± 0.99 b

The data are the means of replicate determinations ± standard deviation. Different letters indicate significant differences between means in same column. (Teste Tukey $p \leq 0.05$).

Samples submitted to steam explosion in presence of H₂SO₄ (WS_{H₂SO₄} and OS_{H₂SO₄}) presented the lower lignin (3.21 and 7.24 %) and hemicelluloses (13.24 and 13.69 %) and the higher cellulose (39.17 and 61.53 %) contents between all samples (Tables 5 and 6). These results were consistent with the higher sugars contents (Tables 1, 2, 3 and 4) released when both WB and OH were submitted to steam explosion in presence of H₂SO₄.

6.3.3 Fourier transform-infrared spectroscopy (FT-IR)

Figures 1 and 2 showed the FT-IR spectra of WB and OH samples, respectively. It can be observed several similarities between FT-IR patterns of these residues, which was associated to the similar chemical groups present in their structure.

Figure 1 - FTIR of WB submitted to steam explosion and ultrasonication.

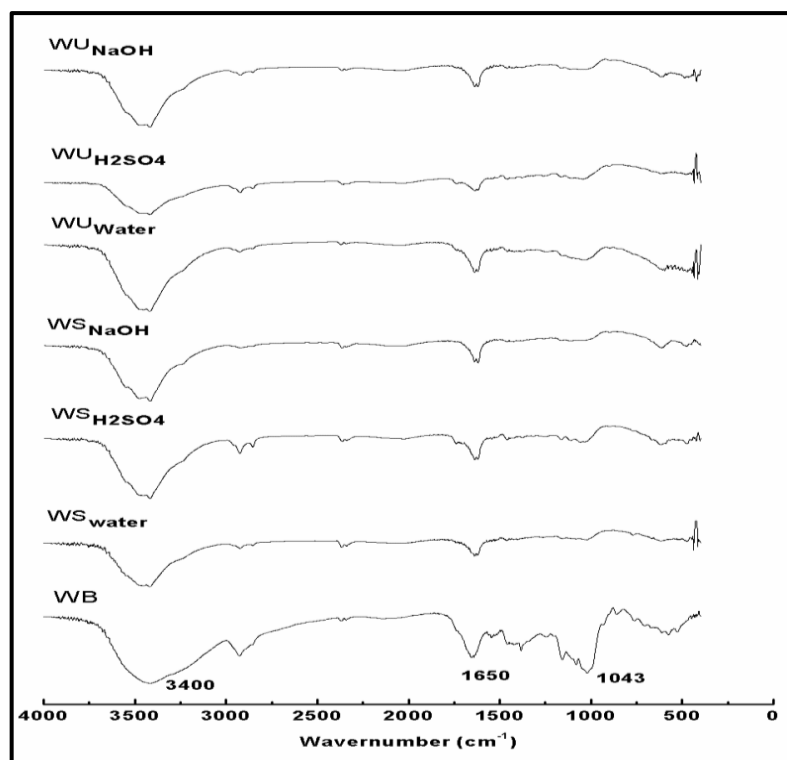
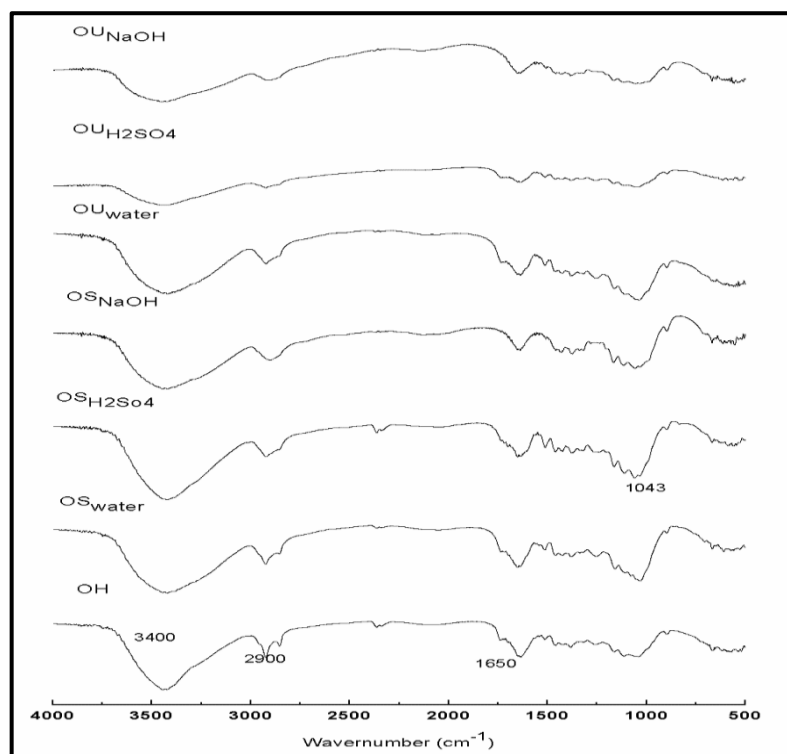


Figure 2 - FTIR of OH submitted to steam explosion and ultrasonication.



All of the spectra showed a wide absorption band corresponding to O-H stretching between 3400 and 3200 cm⁻¹, which indicates H-bonding interactions in

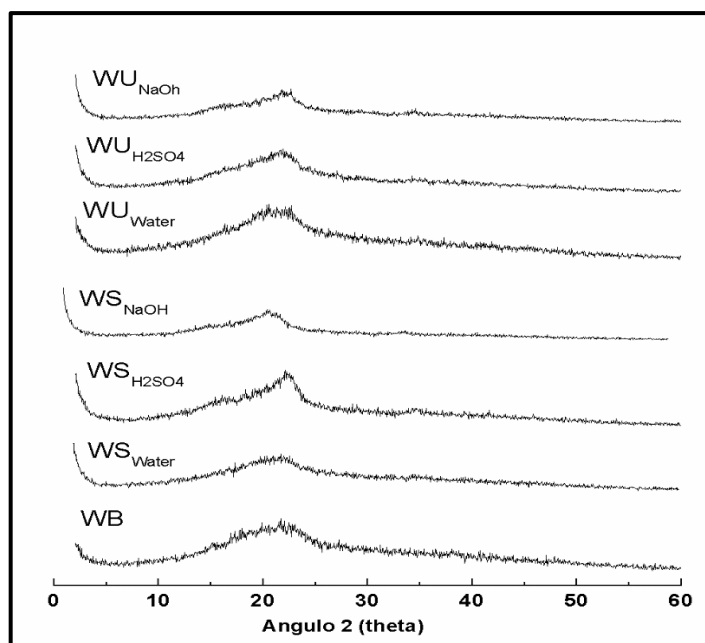
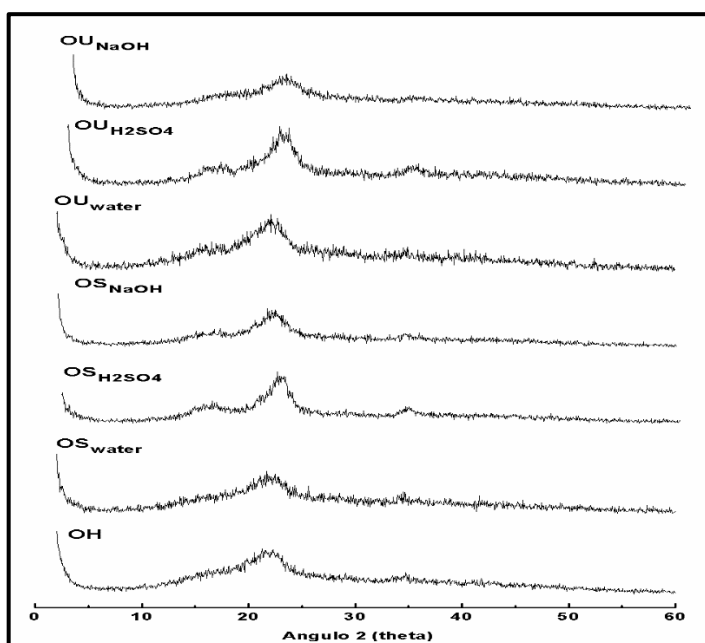
these materials. The band observed at 2900 cm^{-1} correspond to -C-H stretching. The shoulder observed at approximately 1650 cm^{-1} was associated with the angular O-H bending of water molecules.

According to Paschoal et al. (2015), the bands observed at 1043 cm^{-1} are associated with linear and branched (1 \rightarrow 4) β -xylans, which are constituents of hemicelluloses. In this study, it was observed that this band was more intense in the raw residues than in materials submitted to steam explosion or ultrasoincation, confirming that these pretreatments provided a partial removal of hemicelluloses, which are consistent with the hemicelluloses determination (Tables 5 and 6).

The FT-IR spectra obtained in this work were similar to those reported by Jiang and Guo (2016) and Paschoal et al. (2015), who analysed FT-IR spectra of wheat bran and oat hull, respectively.

6.3.4 X-ray diffraction (XRD)

Figure 3 and 4 shows the XRD patterns of WB and OH samples, respectively. In general, both agro-industrial lignocellulosic residues diffractograms are constituted of an amorphous broad hump and crystalline peaks, which are characteristic of semicrystalline materials. It was possible to observe that the main peak for all samples was located in $2\theta = 22^\circ$, which are associated cellulose type I (Ford et al., 2010). However, in $\text{OS}_{\text{H}_2\text{SO}_4}$, OS_{NaOH} , $\text{OU}_{\text{H}_2\text{SO}_4}$ and OU_{NaOH} samples two new peaks appeared at $2\theta = 15^\circ$ and 34° (Figure 4).

Figure 3 - DRX of WB submitted to steam explosion and ultrasonication**Figure 4 - DRX of OH submitted to steam explosion and ultrasonication**

Crystallinity index (CI) was 35.97 % for raw WB and 32.09 % for raw OH (Table 7), and for all pretreated samples in presence of H₂SO₄ or NaOH the CI increased significantly when compared to the raw residues. The higher CI values for both residues were obtained to the samples obtained by steam explosion, possible because in these samples the removal or the amorphous hemicelluloses and lignin

was more effective, resulting in materials with higher cellulose contents, which contributed to the higher CI of these samples.

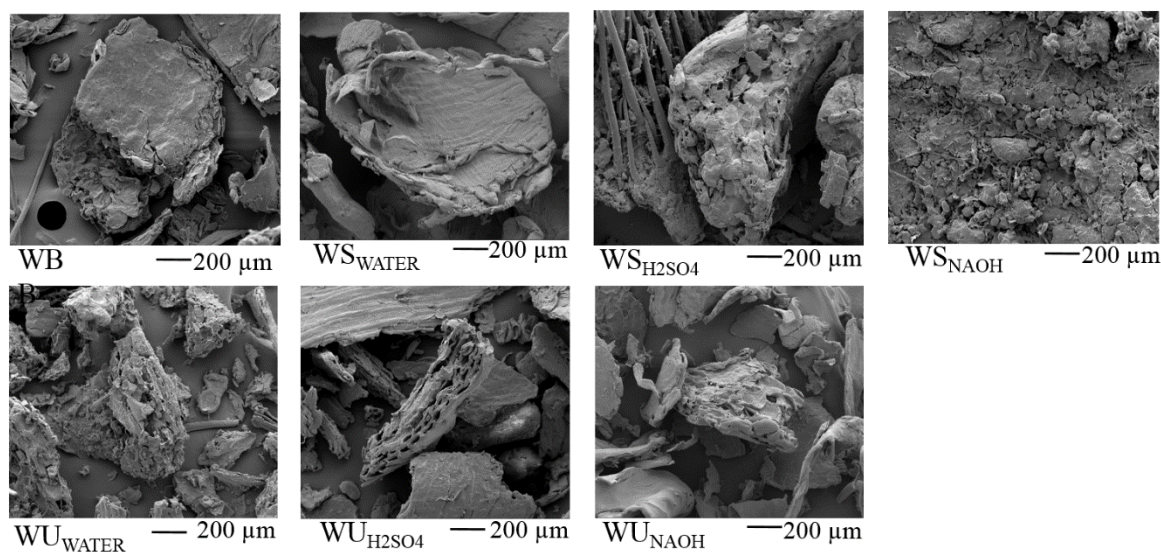
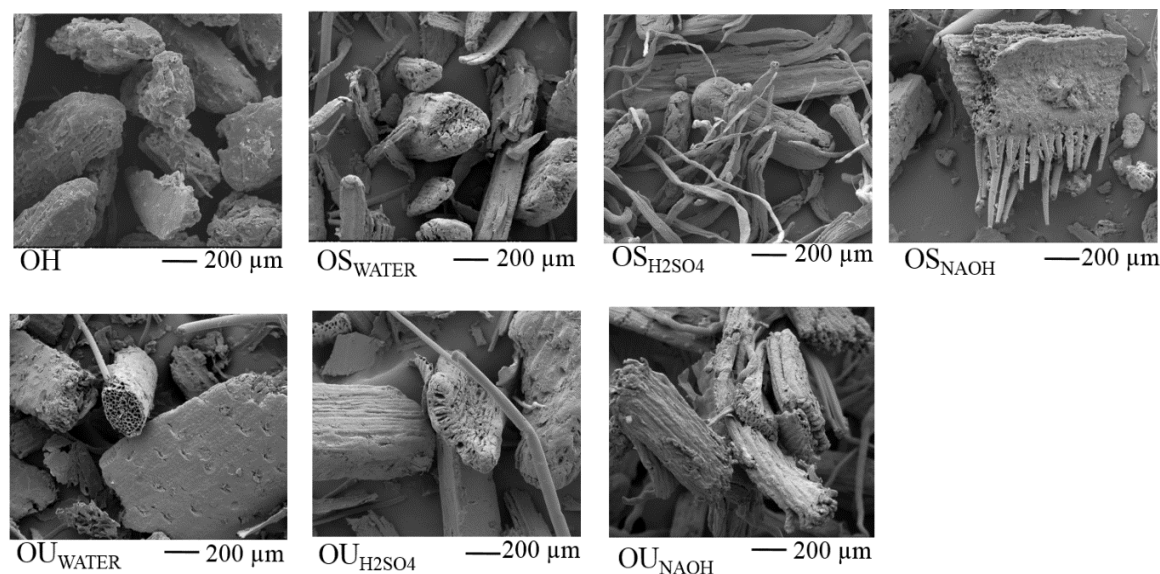
Table 7 - Crystallinity indexes (CI) of WB and OH submitted to steam explosion and ultrasonication

Wheat Bran	(CI%)	Oat Hulls	CI (%)
WB	35.97 d	OH	32.09 e
WS _{Water}	44.53 c	OS _{Water}	52.53 c
WS _{H₂SO₄}	63.59 a	OS _{H₂SO₄}	77.47 a
WS _{NaOH}	52.45 b	OS _{NaOH}	62.30 b
WU _{Water}	43.47 c	OU _{Water}	48.18 d
WU _{H₂SO₄}	46.25 c	OU _{H₂SO₄}	57.59 c
WU _{NaOH}	43.57 c	OU _{NaOH}	56.79 c

Different letters in the same column indicate significant differences ($p \leq 0.05$) between means (Tukey test).

6.3.5 Scanning electron microscopy (SEM)

Figure 5 and 6 showed some SEM micrographs of the WB and OH samples. The raw WB (Figure 5) and OH (Figure 6) presented a compact structure, which is typical of lignocellulosic materials, with lignin and hemicelluloses deposited between the cellulosic microfibrils forming an interrupted lamellar structure.

Figure 5 - SEM of WB submitted to steam explosion and ultrasonication**Figure 6 - SEM of OH submitted to steam explosion and ultrasonication**

It was possible to observe a less compact structure after the samples were submitted to all of the pretreatments, indicating a partial removal of the outer non-cellulosic layer composed of hemicelluloses and lignin. In the samples submitted to the steam explosion in the presence of H_2SO_4 (Figures 5 and 6) the lignocellulosic complex became more unstructured, with cellulosic fibers appearing as individualized bundles.

6. 4 CONCLUSION

In this work, WB and OH were submitted to steam explosion and ultrasonic pretreatments, and between these two methods, steam explosion in presence of sulfuric acid was more efficient on the release of sugars and also in increase cellulose and decrease lignin and hemicelluloses contents of both residues.

REFERENCES

- Apprich, S., Tirpanalan, Ö., Hell, J., Reisinger, M., Böhmendorfer, S., Siebenhandl-Ehn, S., Novalin, S., Kneifel, W., 2014. Wheat bran-based biorefinery 2: Valorization of products. *LWT - Food Sci. Technol.* 56, 222–231. doi:10.1016/j.lwt.2013.12.003
- Bhutto, A.W., Qureshi, K., Harijan, K., Abro, R., Abbas, T., Bazmi, A.A., Karim, S., Yu, G., 2017. Insight into progress in pre-treatment of lignocellulosic biomass. *Energy* 122, 724–745. doi:10.1016/j.energy.2017.01.005
- Chawla, R., Patil, G.R., 2010. Soluble dietary fiber. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 9, 178–196.
- Chen, W.-H., Pen, B.-L., Yu, C.-T., Hwang, W.-S., 2011. Pretreatment efficiency and structural characterization of rice straw by an integrated process of dilute-acid and steam explosion for bioethanol production. *Bioresour. Technol.* 102, 2916–2924. doi:10.1016/j.biortech.2010.11.052
- Dubois M, Gilles K, Hamilton J.K., Rebers P.A., Smith F., 1956. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances Colorimetric Method Determination of Sugars and Substances. *Anal. Chem.* 23, 350-356. doi: 10.1021/ac60111a017.
- Ford, E.N.J., Mendon, S.K., Thames, S.F., Rawlins, J.W., 2010. X-ray Diffraction of Cotton Treated with Neutralized Vegetable Oil-based Macromolecular Crosslinkers. *J. Eng. Fabr. Fibers JEFF* 5.
- Forster-Carneiro, T., Berni, M.D., Dorileo, I.L., Rostagno, M.A., 2013. Biorefinery study of availability of agriculture residues and wastes for integrated biorefineries in Brazil. *Resour. Conserv. Recycl.* 77, 78–88. doi:10.1016/j.resconrec.2013.05.007
- Ibrahim, H.M.M., 2015. Green synthesis and characterization of silver nanoparticles using banana peel extract and their antimicrobial activity against representative microorganisms. *J. Radiat. Res. Appl. Sci.* 8, 265–275. doi:10.1016/j.jrras.2015.01.007
- Jiang, S.-T., Guo, N., 2016. The steam explosion pretreatment and enzymatic hydrolysis of wheat bran. *Energy Sources Part Recovery Util. Environ. Eff.* 38, 295–299. doi:10.1080/15567036.2012.744118
- Menon, V., Rao, M., 2012. Trends in bioconversion of lignocellulose: Biofuels, platform chemicals & biorefinery concept. *Prog. Energy Combust. Sci.* 38, 522–550. doi:10.1016/j.pecs.2012.02.002
- Merci, A., Urbano, A., Grossmann, M.V.E., Tischer, C.A., Mali, S., 2015. Properties of microcrystalline cellulose extracted from soybean hulls by reactive extrusion. *Food Res. Int.* 73, 38–43. doi:10.1016/j.foodres.2015.03.020

- Nascimento, P., Marim, R., Carvalho, G., Mali, S., 2016. Nanocellulose Produced from Rice Hulls and its Effect on the Properties of Biodegradable Starch Films. *Mater. Res.* 19, 167–174. doi:10.1590/1980-5373-MR-2015-0423
- Paschoal, G.B., Muller, C.M.O., Carvalho, G.M., Tischer, C.A., Mali, S., 2015. Isolation and characterization of nanofibrillated cellulose from oat hulls. *Quím. Nova.* doi:10.5935/0100-4042.20150029
- Pauli, E.D., Barbieri, F., Garcia, P.S., Madeira, T.B., Acquaro, V.R., Scarminio, I.S., da Camara, C.A.P., Nixdorf, S.L., 2014. Detection of ground roasted coffee adulteration with roasted soybean and wheat. *Food Res. Int.* 61, 112–119. doi:10.1016/j.foodres.2014.02.032
- Pham, P.J., Hernandez, R., French, W.T., Estill, B.G., Mondala, A.H., 2011. A spectrophotometric method for quantitative determination of xylose in fermentation medium. *Biomass Bioenergy* 35, 2814–2821. doi:10.1016/j.biombioe.2011.03.006
- Ranjan, A., Moholkar, V.S., 2013. Comparative study of various pretreatment techniques for rice straw saccharification for the production of alcoholic biofuels. *Fuel* 112, 567–571. doi:10.1016/j.fuel.2011.03.030
- Rehman, M.S.U., Kim, I., Kim, K.H., Han, J.-I., 2014. Optimization of sono-assisted dilute sulfuric acid process for simultaneous pretreatment and saccharification of rice straw. *Int. J. Environ. Sci. Technol.* 11, 543–550. doi:10.1007/s13762-013-0294-0
- Reisinger, M., Tirpanalan, Ö., Huber, F., Kneifel, W., Novalin, S., 2014. Investigations on a wheat bran biorefinery involving organosolv fractionation and enzymatic treatment. *Bioresour. Technol.* 170, 53–61. doi:10.1016/j.biortech.2014.07.068
- Soares, M.L., Gouveia, E.R., 2013. Influence of the alkaline delignification on the simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of sugar cane bagasse. *Bioresour. Technol.* 147, 645–648. doi:10.1016/j.biortech.2013.08.103
- Stafollo, M., E., A., Susana, M., Albertengo, L., 2012. Dietary Fiber and Availability of Nutrients: A Case Study on Yoghurt as a Food Model, in: Karunaratne, D.N. (Ed.), *The Complex World of Polysaccharides*. InTech. doi:10.5772/54031
- Talebna, F., Karakashev, D., Angelidaki, I., 2010. Production of bioethanol from wheat straw: An overview on pretreatment, hydrolysis and fermentation. *Bioresour. Technol.* 101, 4744–4753. doi:10.1016/j.biortech.2009.11.080
- Tamanini, C., de Oliveira Hauly, M.C., 2004. Resíduos agroindustriais para produção biotecnológica de xilitol. *Semina Ciênc. Agrár.* 25, 315–330.
- Tirpanalan, Ö., Reisinger, M., Huber, F., Kneifel, W., Novalin, S., 2014. Wheat bran biorefinery: An investigation on the starch derived glucose extraction accompanied by pre- and post-treatment steps. *Bioresour. Technol.* 163, 295–299. doi:10.1016/j.biortech.2014.04.058

Xie, X. (Sherry), Cui, S.W., Li, W., Tsao, R., 2008. Isolation and characterization of wheat bran starch. *Food Res. Int.* 41, 882–887. doi:10.1016/j.foodres.2008.07.016

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Foi possível obter celulose nanofibrilada a partir da casca de aveia e da casca de soja empregando-se a extrusão reativa combinada ou não ao branqueamento com ácido peracético.

A celulose nanofibrilada obtida através da associação do método de branqueamento e extrusão reativa resultou em materiais com menores diâmetros, e independente do resíduo e do processo empregado, as amostras de celulose nanofibrilada produzidas apresentaram elevados teores de celulose (> 87 %), maior cristalinidade e estabilidade térmica que os resíduos *in natura*. Quando foi empregada a casca de aveia pode-se obter um material mais homogêneo, composto majoritariamente de celulose nanofibrilada, enquanto que a casca de soja gerou uma mistura de celulose nanofibrilada e celulose microcristalina.

A casca de aveia *in natura* impregnada com bio-NPAG apresentou atividade antimicrobiana frente a bactéria *E.coli*. A ausência de atividade antimicrobiana da celulose nanofibrilada pode estar vinculada a resíduos químicos presentes na amostra, em virtude dos processos empregados na sua produção.

O processo de pré-tratamento mais efetivo foi o que empregou o sistema de explosão a vapor com ácido sulfúrico, tanto para o farelo de trigo quanto para a casca de aveia. Além disso, pode-se observar um aumento da proporção de celulose e diminuição da proporção de lignina e hemicelulose para ambos os resíduos.

Os métodos empregados nesse trabalho para o aproveitamento dos resíduos agroindustriais mostraram-se efetivos, tanto para a produção de celulose nanofibrilada, quanto para o pré-tratamento dos resíduos. Esses processos são atrativos por apresentarem baixo custo, redução do tempo de reação e por gerar uma menor quantidade de efluentes durante as etapas de lavagem, quando comparados aos processos convencionais de obtenção de celulose nanofibrilada e pré-tratamentos químicos.