



EFEITO DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA NAS PROPRIEDADES DE NANOFIBRILAS DE CELULOSE

Débora D. Ribes¹; Darci A. Gatto¹; Evandro Piva¹; Cristiane W. Raubach¹; Rafael Beltrame¹

1 Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brasil.

Palavras-Chave: polpa kraft, celulose II, estabilidade térmica

Introdução

As nanofibrilas de celulose (NFC) constituem uma classe de nanomateriais renováveis com elevada área superficial, baixa densidade, resistência mecânica, biodegradabilidade e capacidade de formar redes percoladas estáveis em meio aquoso. Essa combinação sustenta aplicações em embalagens, revestimentos, membranas, compósitos, sistemas de liberação e biomateriais. Apesar do potencial, a produção de NFC requer a desagregação da estrutura hierárquica da parede celular e a ruptura das interações que mantêm as microfibrilas associadas. Processos exclusivamente mecânicos são eficazes, mas podem exigir sucessivas passagens em equipamentos de alta energia, além de provocar desgaste e heterogeneidade dimensional. Por isso, pré-tratamentos capazes de aumentar a acessibilidade da celulose são decisivos para tornar a fibrilação mais eficiente e controlar as propriedades finais (COPENHAVER et al., 2022; TONG et al., 2023). Entre as alternativas, a hidrólise enzimática se destaca pela seletividade, pelas condições brandas de operação e pela menor geração de resíduos. Endoglucanases atuam preferencialmente em regiões amorfas e acessíveis, criando novas extremidades de cadeia, enquanto exoglucanases podem aprofundar a despolimerização; o equilíbrio entre essas atividades favorece a individualização sem perda excessiva da fração celulósica (RAMÍREZ BRENES et al., 2023). Preparações comerciais contendo celulasas e enzimas auxiliares podem ainda atuar sobre hemiceluloses, reduzindo a coesão da matriz antes do cisalhamento. Estudos recentes confirmam que a composição do coquetel, a dosagem e a intensidade mecânica alteram rendimento, dimensões, cristalinidade e desempenho térmico das nanoceluloses (BALEA et al., 2021; BONDANCIA et al., 2022). A resposta também depende da matéria-prima. Polpas branqueadas possuem maior proporção de celulose e menor teor de lignina, ao passo que polpas não branqueadas preservam lignina e hemiceluloses que podem limitar a adsorção enzimática, mas também proteger regiões cristalinas e contribuir para a estabilidade térmica. Em polpa kraft de eucalipto, combinações enzimáticas associadas ao tratamento mecânico já produziram elevados rendimentos de nanofibrilação (CEBREIROS et al., 2021), e rotas sequenciais recentes reforçam a possibilidade de modular o produto pelo pré-tratamento (CEBREIROS et al., 2024). Entretanto, ainda é necessário relacionar concentração enzimática e composição da polpa às mudanças morfológicas, estruturais e térmicas no mesmo sistema experimental. Assim, este trabalho teve como objetivo produzir hidrogéis de NFC a partir de polpas kraft branqueada e não branqueada de eucalipto por hidrólise enzimática seguida de fibrilação mecânica, avaliando o efeito da concentração de Cellic CTec2 sobre diâmetro, cristalinidade, estabilidade térmica e estrutura química, bem como identificar as condições mais promissoras para obtenção de materiais finos, cristalinos e termicamente estáveis.



Material e Métodos

Foram utilizadas polpas kraft branqueada e não branqueada de eucalipto. A polpa branqueada apresentava aproximadamente 88% de celulose e 12% de glucuronoxilana. Para cada tipo de polpa, foram preparadas suspensões com 3% de sólidos e adicionada a preparação enzimática comercial Cellic CTec2 nas concentrações de 0,01; 0,02; 0,05 e 0,10%. Uma suspensão sem enzima foi mantida como testemunha, permitindo distinguir o efeito da hidrólise daquele provocado apenas pela etapa mecânica. As suspensões foram homogeneizadas à temperatura ambiente durante 60 min. Em seguida, o material foi desintegrado com baixo teor de água e submetido a 40 passagens, a 1.500 rpm, em moinho Super Masscolloider Masuko Sangyo, equipado com discos rotatório e estacionário. Após a fibrilação, os hidrogéis foram aquecidos a 85 °C para inativação enzimática e armazenados a 5 °C até as análises. A morfologia foi avaliada por microscopia eletrônica de transmissão (MET) em equipamento JEM-1400, operado a 120 kV. Filmes finos de hidrogel foram vitrificados em etano líquido a -175 °C, buscando preservar a organização das estruturas dispersas. Os diâmetros observados nas micrografias foram comparados por análise de variância e teste de Fisher, com nível de significância de 5%. A estrutura cristalina foi examinada por difração de raios X em equipamento Bruker D8 Advance, com radiação $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$), tensão de 40 kV e corrente de 40 mA. O índice de cristalinidade foi determinado pela razão entre a área atribuída aos picos cristalinos e a área total do difratograma no intervalo de 5° a 30° (2 θ), após subtração do fundo amorfo. A estabilidade térmica foi investigada por termogravimetria em equipamento Shimadzu TG-60, entre 50 e 600 °C e sob atmosfera inerte, observando-se as regiões de perda de umidade e degradação dos constituintes lignocelulósicos. A estrutura química foi avaliada por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier, utilizando 32 varreduras entre 400 e 4.000 cm^{-1} e resolução de 4 cm^{-1} . Os resultados das quatro técnicas foram interpretados de forma integrada para relacionar a redução dimensional às alterações de cristalinidade, composição química aparente e resistência à degradação térmica.

Resultados e Discussão

O pré-tratamento enzimático modificou de forma consistente a morfologia das suspensões conforme pode ser observada na Figura 1. As testemunhas das polpas branqueada e não branqueada apresentaram estruturas com diâmetros médios próximos de 100 μm , evidenciando que a moagem, nas condições empregadas, não foi suficiente para promover o mesmo grau de individualização obtido após a hidrólise. Na polpa branqueada, os tratamentos enzimáticos produziram valores, em geral, entre 30 e 42 μm , correspondendo a uma redução média de aproximadamente 65% em relação à testemunha. A condição com 0,01% apresentou estruturas próximas de 30 μm , enquanto 0,02; 0,05 e 0,10% permaneceram aproximadamente entre 35 e 42 μm . Portanto, para essa polpa, o aumento da dose não resultou em redução linear do diâmetro. Esse comportamento pode decorrer da heterogeneidade das estruturas, da reagregação durante o preparo das amostras ou do fato de que doses baixas já tornam acessíveis os pontos mais suscetíveis ao cisalhamento. Na polpa não branqueada, os tratamentos ficaram aproximadamente entre 20 e 43 μm , com a menor dimensão na concentração de 0,05%. A redução em relação à testemunha aproximou-se de 75%, revelando resposta morfológica mais pronunciada. A lignina residual pode dificultar o acesso da enzima ao atuar como barreira física ou adsorvente não produtivo, mas a hidrólise de regiões acessíveis e de hemiceluloses também pode romper pontos de coesão suficientes para



potencializar a ação do moinho. Assim, a resposta da polpa não branqueada indica que a presença de lignina não impediu a fibrilação e que a condição de 0,05% estabeleceu um equilíbrio favorável entre abertura da matriz e preservação das cadeias. A tendência concorda com estudos que associam o pré-tratamento enzimático à redução da energia de nanofibrilação e ao controle morfológico (BALEA et al., 2021; CEBREIROS et al., 2024). Ressalta-se que os valores medidos nas micrografias representam feixes e estruturas fibriladas observáveis no campo analisado; portanto, a interpretação deve considerar a distribuição dimensional e não apenas o valor médio.

Os difratogramas apresentaram reflexões em aproximadamente $15,1^\circ$, $20,1^\circ$, $21,0^\circ$ e $34,7^\circ$, atribuídas aos planos 101, 021, 002 e 040, respectivamente. O perfil foi associado predominantemente à celulose II, polimorfo de estrutura monoclinica e cadeias antiparalelas. A manutenção das posições dos picos entre as condições indica que o tratamento não introduziu uma nova fase cristalina detectável; a principal alteração ocorreu na proporção entre domínios ordenados e desordenados. A concentração de 0,01% não aumentou a cristalinidade: na polpa branqueada, o índice ficou abaixo da testemunha, próximo de 72%, enquanto o controle apresentou cerca de 77%; na polpa não branqueada, ambos permaneceram próximos de 68%. A partir de 0,02%, houve aumento expressivo. Na polpa branqueada, os índices foram aproximadamente 78% em 0,02% e 88–89% em 0,05 e 0,10%. Na polpa não branqueada, os tratamentos de 0,02 e 0,05% alcançaram cerca de 86–87%, e 0,10% atingiu aproximadamente 90–91%. O incremento é compatível com a remoção preferencial de segmentos amorfos de celulose e hemiceluloses, que eleva a participação relativa dos domínios cristalinos sem necessariamente formar novos cristais. A resposta mais intensa da polpa não branqueada sugere que a lignina remanescente pode ter protegido cadeias organizadas contra despolimerização excessiva, enquanto a fração amorfa mais acessível foi removida. Os maiores valores superaram a faixa de 70–85% relatada para diversas rotas combinadas, demonstrando a eficiência das doses de 0,05 e 0,10%. Resultados recentes também mostram que composição do coquetel e severidade mecânica governam a cristalinidade das NFC (BONDANCIA et al., 2022; WANG et al., 2024).

As curvas termogravimétricas exibiram três regiões principais, conforme pode ser observado na Figura 2. A primeira, até aproximadamente 150°C , correspondeu à eliminação de água livre e ligada à rede hidrofílica. Entre 200 e 300°C ocorreu a degradação preferencial de hemiceluloses e segmentos amorfos da celulose. A maior perda de massa concentrou-se entre 310 e 390°C , faixa relacionada à decomposição da celulose mais organizada e, nas amostras não branqueadas, de estruturas aromáticas da lignina. Acima de 350°C , as amostras hidrolisadas conservaram mais massa que as testemunhas, com destaque para 0,10%. A melhoria térmica acompanha o aumento de cristalinidade, pois domínios mais ordenados apresentam maior coesão intermolecular e exigem mais energia para degradação. A remoção parcial de componentes menos estáveis também contribui para deslocar a resposta do conjunto. Na polpa não branqueada, a lignina pode favorecer a formação de resíduo carbonáceo e ampliar a retenção de massa em altas temperaturas. Desse modo, a termogravimetria não apenas confirma o enriquecimento da fração cristalina observado por DRX, mas indica que a hidrólise controlada pode ampliar a janela de processamento das NFC em aplicações que envolvam aquecimento.



Os espectros de FTIR não apresentaram novas bandas proeminentes após a hidrólise, demonstrando que a estrutura química fundamental da celulose foi preservada e que o processo não introduziu grupos funcionais estranhos detectáveis. As bandas largas entre 3.100 e 3.600 cm^{-1} foram associadas ao estiramento O–H e à rede de ligações de hidrogênio; a banda próxima de 2.900 cm^{-1} correspondeu ao estiramento C–H. A região entre 1.000 e 1.300 cm^{-1} reuniu vibrações C–O e C–O–C características do esqueleto polissacarídico, enquanto sinais entre 900 e 1.450 cm^{-1} foram relacionados a deformações C–H/COH e à celulose. A banda próxima de 1.742 cm^{-1} pode ser atribuída a grupos acetila e urônicos de hemiceluloses ou a ligações éster da matriz lignina–carboidrato. A maior intensidade relativa das regiões de O–H, C–H e C–O nas amostras de 0,05 e 0,10% é coerente com o enriquecimento da fração celulósica e cristalina. A ausência de bandas lignínicas muito proeminentes não significa remoção completa da lignina, pois sua identificação pode exigir análise de derivadas ou métodos complementares. Em conjunto, MET, DRX, TGA e FTIR mostram que as doses mais elevadas removeram preferencialmente domínios amorfos, facilitaram a desagregação e melhoraram a resistência térmica, sem evidência de modificação química indesejada, conforme mostra Tabela 1. Entre elas, 0,05% se destacou pela menor dimensão na polpa não branqueada, enquanto 0,10% apresentou os maiores índices de cristalinidade e melhor comportamento térmico. A escolha da condição ótima, portanto, depende da propriedade prioritária: máxima fibrilação ou maior ordenamento e estabilidade.

Caracterização	Efeito da enzima	Destaque	Interpretação
MET	Redução do diâmetro	0,05% na polpa não branqueada	Maior individualização das estruturas
DRX	Aumento do índice acima de 0,02%	0,05-0,10%: cerca de 89-90%	Remoção de regiões amorfas
TGA	Maior estabilidade após a hidrólise	0,10% apresentou melhor resposta	Enriquecimento da fração cristalina
FTIR	Maior intensidade de bandas da celulose	0,05 e 0,10%	Estrutura fundamental preservada

Tabela 1. Síntese dos efeitos do pré-tratamento enzimático sobre as propriedades das NFC.

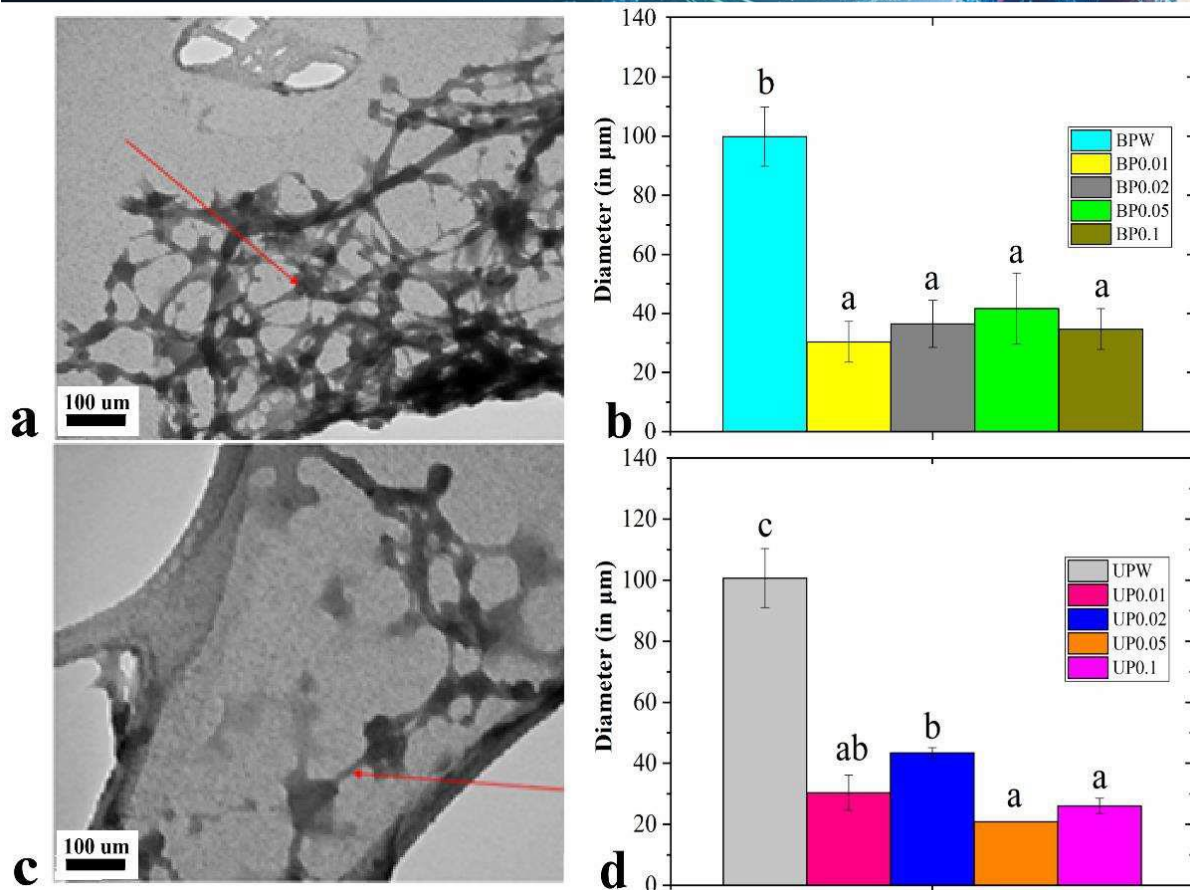


Figura 1. Micrografias de MET e diâmetros médios das estruturas obtidas de polpas branqueada (a-b) e não branqueada (c-d).

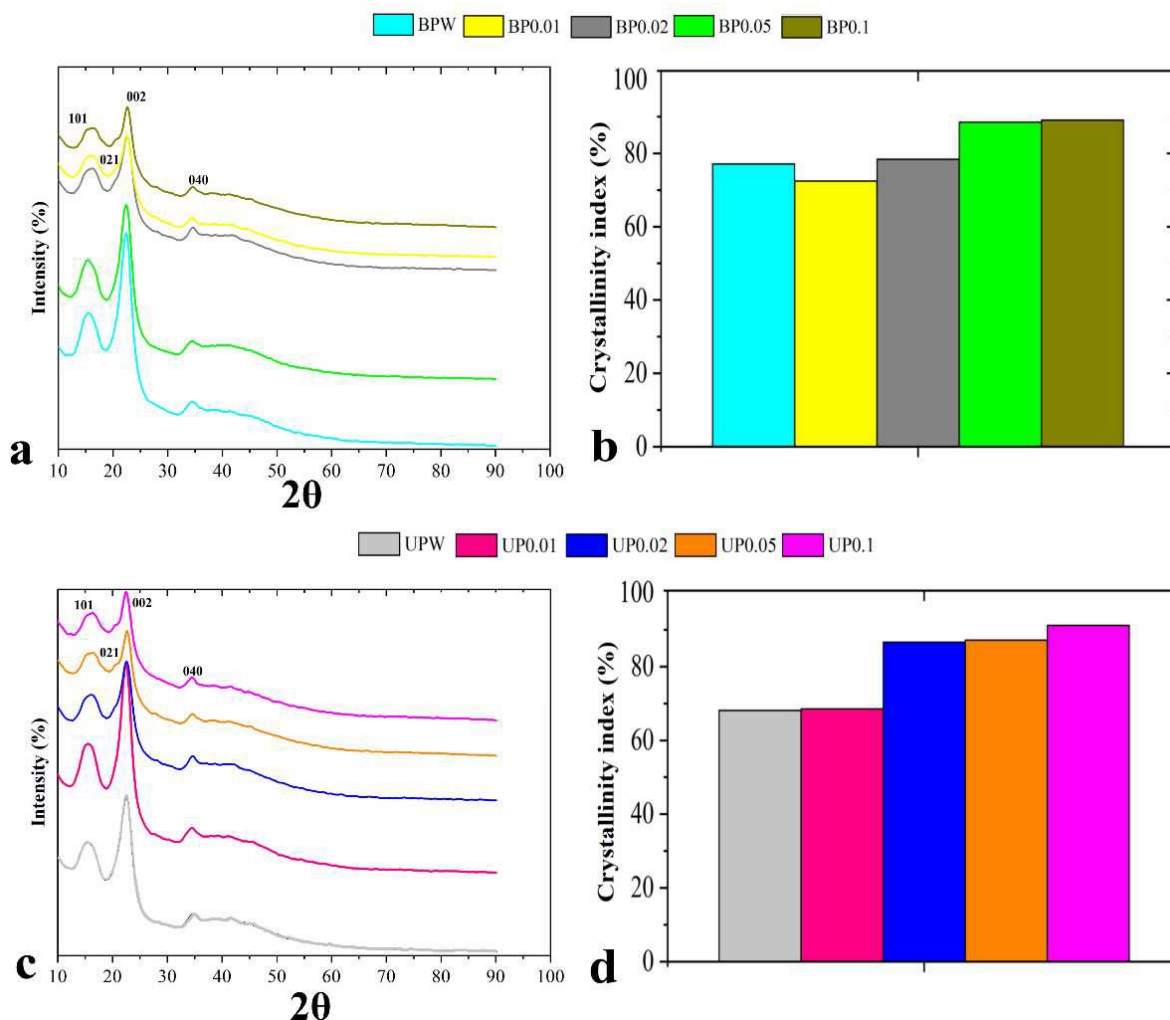


Figura 2. Difratogramas e índices de cristalinidade das NFC de polpas branqueada (a-b) e não branqueada (c-d).

Conclusões

A hidrólise com Cellic CTec2 seguida de fibrilação mecânica foi eficiente para produzir hidrogéis de NFC a partir de polpas kraft branqueada e não branqueada de eucalipto. Em comparação às testemunhas, o pré-tratamento reduziu de forma acentuada o diâmetro das estruturas, com diminuição aproximada de 65% na polpa branqueada e 75% na não branqueada. A resposta dimensional não foi estritamente proporcional à concentração enzimática: 0,05% apresentou o menor valor na polpa não branqueada, enquanto o aumento para 0,10% favoreceu principalmente a cristalinidade e a estabilidade térmica. Doses iguais ou superiores a 0,02% promoveram enriquecimento relativo dos domínios cristalinos, alcançando cerca de 89% na polpa branqueada e 90–91% na não branqueada. A maior resistência à degradação acima de 350 °C e a intensificação de bandas características da celulose corroboraram a remoção preferencial de segmentos amorfos. Como não surgiram novas bandas relevantes no FTIR, a estrutura química fundamental foi preservada. As diferenças entre as polpas confirmam que lignina e hemiceluloses influenciam simultaneamente a acessibilidade enzimática e a preservação dos domínios organizados. Assim, 0,05% representa uma condição promissora quando se prioriza maior individualização



com menor consumo de enzima, enquanto 0,10% é indicada quando cristalinidade e estabilidade térmica são determinantes. Os resultados demonstram que o ajuste da dose enzimática permite direcionar as propriedades das NFC e apoiar rotas de menor severidade química para materiais de maior valor agregado.

Agradecimentos

À CAPES, CEME-SUL/FURG, CMPC Celulose Riograndense, Embrapa Florestas e PRPPGI/UFPel pelo apoio.

Referências

- BALEA, A. et al. Influence of pretreatment and mechanical nanofibrillation energy on properties of nanofibers from Aspen cellulose. *Cellulose*, 28(14), 9187-9206, 2021. DOI: 10.1007/s10570-021-04109-w.
- CEBREIROS, F. et al. Enhancing cellulose nanofibrillation of eucalyptus Kraft pulp by combining enzymatic and mechanical pretreatments. *Cellulose*, 28(1), 189-206, 2021. DOI: 10.1007/s10570-020-03531-w.
- COPENHAVER, K. et al. Pretreatment of lignocellulosic feedstocks for cellulose nanofibril production. *Cellulose*, 29(9), 4835-4876, 2022. DOI: 10.1007/s10570-022-04580-z.
- BONDANCIA, T. J. et al. Cellulose nanostructures obtained using enzymatic cocktails with different compositions. *International Journal of Biological Macromolecules*, 207, 299-307, 2022. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2022.03.007.
- RAMÍREZ BRENES, A. et al. Endo-exoglucanase synergism for cellulose nanofibril production assessment and characterization. *Molecules*, 28(3), 948, 2023. DOI: 10.3390/molecules28030948.
- TONG, X. et al. Enzymatic treatment processes for the production of cellulose nanomaterials: a review. *Carbohydrate Polymers*, 299, 120199, 2023. DOI: 10.1016/j.carbpol.2022.120199.
- WANG, J. et al. Preparation and characterization of nanocellulose fiber (CNF) by biological enzymatic method. *Journal of Thermoplastic Composite Materials*, 37(3), 1223-1241, 2024. DOI: 10.1177/08927057231180479.
- CEBREIROS, F. et al. Sequential ball milling as a promising method for the isolation of cellulose nanofibers (CNF) from enzyme-treated eucalyptus kraft pulp. *Industrial Crops and Products*, 219, 119293, 2024. DOI: 10.1016/j.indcrop.2024.119293.
- MORÁN-AGUILAR, M. G. et al. Advancing sustainable production of high-performance cellulose pulps. *Materials*, 18(21), 4968, 2025. DOI: 10.3390/ma18214968.