

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE  
ALIMENTOS

**APROVEITAMENTO DE TORTA DE OLIVEIRA PARA PRODUÇÃO DE  
NANOFIBRAS DE CELULOSE ATRAVÉS DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA:  
APLICAÇÃO EM FILMES BIODEGRADÁVEIS**

Patrik de Souza Rocha

Porto Alegre, RS.

2022

PATRIK DE SOUZA ROCHA

APROVEITAMENTO DE TORTA DE OLIVEIRA PARA PRODUÇÃO DE  
NANOFIBRAS DE CELULOSE ATRAVÉS DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA:  
APLICAÇÃO EM FILMES BIODEGRADÁVEIS

Dissertação de mestrado submetida ao PPG  
em Ciência e Tecnologia de Alimentos da  
UFRGS como um dos requisitos para  
obtenção do título de Mestre em Ciência e  
Tecnologia de Alimentos

Orientadores:

Prof. Dr. Plinho Francisco Hertz e

Prof<sup>a</sup> Dra. Simone Hickmann Flôres

Coorientador:

Dr. Carlos Henrique Pagno

Porto Alegre, RS

2022

#### CIP - Catalogação na Publicação

Rocha, Patrik de Souza  
APROVEITAMENTO DE TORTA DE OLIVEIRA PARA PRODUÇÃO  
DE NANOFIBRAS DE CELULOSE ATRAVÉS DE HIDRÓLISE  
ENZIMÁTICA: APLICAÇÃO EM FILMES BIODEGRADÁVEIS /  
Patrik de Souza Rocha. -- 2022.  
106 f.  
Orientadores: Plinho Francisco Hertz, Simone  
Hickmann Flôres.

Coorientador: Carlos Henrique Pagno.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul, Instituto de Ciência e Tecnologia  
de Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Ciência e  
Tecnologia de Alimentos, Porto Alegre, BR-RS, 2022.

1. Nanofibras. 2. Reaproveitamento de resíduos  
agroindustriais. 3. Embalagens de alimentos. 4. Filmes  
biodegradáveis. 5. Celulose. I. Hertz, Plinho  
Francisco, orient. II. Hickmann Flôres, Simone,  
orient. III. Pagno, Carlos Henrique, coorient. IV.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os  
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

### **Agradecimentos:**

- À Ciência que permitiu a síntese da vacina contra o covid-19;
- Aos meus familiares: minha mãe e meu pai (*in memorian*), à minha irmã, meu cunhado, à minha querida irmã-amiga Michelle e à minha afilhada Chiara;
- Aos meus orientadores Plinho, Simone e Carlos por todo apoio, aprendizado, suporte, sugestões e críticas construtivas que levarei para todo o sempre;
- À Rossana Angelica Schenato (*in memorian*) que foi minha primeira orientadora e com quem dei os primeiros passos no laboratório, onde quer que esteja sei que estará contente com essa conquista;
- Ao laboratório 210 que me proporcionou tanto aprendizado, tanta discussão científica e tantos desabafos sobre a árdua e atual vida brasileira;
- Aos colegas que o ICTA me trouxe, em especial ao grupo do *muffin* das aulas de processamento de produtos de cereais;
- Ao núcleo técnico científico do ICTA, principalmente aos técnicos Ana, Michele e Tiago;
- Aos amigos que estiveram sempre presentes nas horas mais escuras e nas mais radiosas dessa pandemia;

## RESUMO:

No presente estudo avaliou-se o potencial de produção de nanofibras de celulose pelo aproveitamento da torta de oliveira, esse resíduo foi caracterizado físico-quimicamente, desengordurado, pré-tratado e submetido à hidrólise com enzimas hemicelulolíticas. O nanomaterial obtido pela ação das enzimas hemicelulolíticas foi analisado pelas técnicas de FTIR-ATR, DRX, TGA e DTG e aplicado como aditivo na produção de filmes biodegradáveis de amido de milho e glicerol pela técnica de *casting*, sendo caracterizados quanto à espessura, propriedades mecânicas, composição, opacidade, permeabilidade ao vapor de água e solubilidade. As análises tiveram a finalidade de avaliar o efeito do nanomaterial na matriz do filme e que alterações essa adição promove nas características dos filmes. A concentração de nanofibras de 5% (m/v) apresentou efeito positivo nas propriedades mecânicas, propriedades térmicas e solubilidade visto que proporcionou aumento da temperatura de degradação térmica de 210°C para 222°C e aumento da tensão máxima na ruptura de 3,79 para 6,21 MPa. Os resultados obtidos neste estudo indicam que um dos aproveitamentos viáveis para a torta de oliveira é a conversão do material lignocelulósico em nanofibras que podem ser empregadas como material de reforço em compósitos biodegradáveis.

## **ABSTRACT**

In the present study, the potential for producing cellulose nanofibers using olive pomace (OP) was evaluated. This residue was physical-chemically characterized, pre-treated and subjected to hydrolysis with hemicellulolytic enzymes. The nanomaterial obtained by the action of hemicellulolytic enzymes was analyzed by the techniques of FTIR-ATR, DRX, TGA and DTG and applied as an additive in the production of biodegradable films of corn starch and glycerol by the casting technique, being characterized in thickness, mechanical properties, chemical composition, opacity, water vapor permeability and solubility. The analyzes were intended to evaluate the effect of the nanomaterial on the film matrix and what changes this change promotes in the characteristics of the films. The concentration of nanofibers of 5% (m/v) had a positive effect on the mechanical properties, thermal properties and solubility since there was an increase in the temperature of thermal degradation from 210°C to 222°C and an increase in the maximum stress at rupture from 3.79 to 6, 21 MPa. The results obtained in this study indicate that one of the viable uses for olive pomace is the conversion of lignocellulosic material into nanofibers that can be used as reinforcement material in biodegradable composites.

## Lista de figuras

Figura 1: Monômero de glicose em conformação cadeira (conformação termodinamicamente estável)	14
Figura 2: Dímero de glicose (celobiose) na cadeia linear da celulose	15
Figura 3: Ligações de hidrogênio intramoleculares e intermoleculares das cadeias de celulose	16
Figura 4: Esquema das regiões hemicelulolíticas que formam a parede celular dos vegetais	17
Figura 5: Recorte da parede celular dos vegetais	17
Figura 6: Pentoses, hexoses, ácidos urônicos e desoxieoses que formam a hemicelulose	18
Figura 7: Álcoois cumarílico, coniferílico e sinapílico que são os principais monômeros da lignina	19
Figura 8: Principais sítios de hidrólise das enzimas hemicelulolíticas	21
Figura 9: Mecanismos de hidrólise das enzimas hemicelulolíticas por (A) Retenção da configuração do carbono anomérico e por (B) Inversão da configuração do carbono anomérico	22
Figura 10: Descrição do mecanismo da hidrólise hemicelulolítica com recuperação do catalisador	23
Figura 11: Árvore oliveira, frutos, folhas e detalhes do fruto da oliveira	26
Figura 12: Regiões preferenciais de cultivo da oliveira (em verde) no RS	27
Figura 13: Fluxograma da produção do azeite de oliva	29
Figura 14: Torta de oliveira fresca (resíduo pastoso) e alperujo (rejeito líquido)	31
Figura 15: Constituintes fenólicos encontrados na torta de oliveira	33
Figura 16: Regiões do amido (a) amilose e (b) amilopectina	43
Figura 17: Fluxograma de tratamento inicial da amostra	47
Figura 18: Digestão ácida da torta de oliveira para determinação do teor de celulose	49
Figura 19: Fluxograma para as análises de extrativos, celulose e hemicelulose	51

Figura 20: Erlenmeyer contendo a amostra em KOH 5% após as 24 horas de reação (pré-tratamento alcalino)	52
Figura 21: Gráfico do ensaio de condição ótima de pH do preparo enzimático utilizado	54
Figura 22: Gráfico do ensaio de condição ótima de temperatura do preparo enzimático utilizado	55
Figura 23: Licores obtidos após a lavagem do material pré-tratado por hidrólise alcalina	62
Figura 24: Espectro de varredura da lignina presente no licor obtido após as lavagens	63
Figura 25: comparativo entre amostra bruta (esquerda), pré-tratada com KOH (centro) e hidrolisada (direita)	64
Figura 26: TGA da amostra bruta (em preto) e amostra hidrolisada que corresponde às NFC (em vermelho)	65
Figura 27: Curva de derivada primeira do TGA das amostra bruta (em preto) e da amostra hidrolisada que corresponde às NFC (em vermelho)	67
Figura 28: Espectro de FTIR-ATR da amostra bruta	69
Figura 29: Espectro de FTIR-ATR da amostra que corresponde à NFC	70
Figura 30: Difrátograma (DRX) da amostra bruta (em preto) e da amostra que corresponde às NFC (em vermelho)	71
Figura 31: Curva de TGA dos filmes: Controle (cinza); adição 0,5% de NF(vermelho); adição 1% de NFC (azul); adição 2,5% de NFC (verde); adição 5% de NFC (violeta)	78
Figura 32: Curva de derivada primeira da análise termogravimétrica do filme controle (em azul) e com adição de 0,5% de NFC (verde); 1% de NFC (amarela); 2,5% de NFC (vermelho) e 5% de NFC (preto)	80
Figura 33: Curva de calibração da xilose	105
Figura 34: Curva de calibração de glicose	106



## SUMÁRIO

1. Introdução.....	11
2. Objetivos.....	13
3. Revisão Bibliográfica.....	14
3.1. Características e composição da celulose.....	14
3.2. Caracterização e composição da hemicelulose.....	18
3.3. Caracterização de outros componentes da parede celular.....	19
3.4. Enzimas hemicelulolíticas e celulolíticas.....	20
3.4.1. Hemicelulases.....	20
3.4.2. Celulases.....	24
3.5. A torta de oliveira como fonte de celulose.....	26
3.6. Nanotecnologia e Nanomateriais como reforço em filmes.....	35
3.7. Filmes para embalagens de alimentos.....	40
3.7.1. Filmes à base de amido e adicionados de NFC.....	42
4. Justificativa.....	46
5. Material e Métodos.....	47
5.1 Matéria-prima.....	47
5.2. Caracterização da Matéria-prima.....	47
5.2.2. Teor de celulose.....	48
5.2.3. Teor de lignina e hemicelulose.....	49
5.3. Análise dos grupos funcionais.....	51
5.4. Análise da microestrutura.....	51
5.5. Obtenção das nanofibras.....	52
5.5.1. Hidrólise Enzimática.....	52
5.6. Aplicação das nanofibras obtidas.....	56
5.6.1. Produção de filmes e preparação dos suportes.....	56
5.7. Caracterização dos filmes.....	56
5.7.1. Propriedades mecânicas.....	56
5.7.2. Solubilidade em água.....	57
5.7.3. Permeabilidade ao vapor de água.....	57
5.7.4. Opacidade.....	58
5.7.5. Análise termogravimétrica.....	58
5.7.6. Biodegradabilidade.....	58
6. Resultados.....	60
6.1. Caracterização da matéria-prima.....	60

6.1.1. Análise centesimal.....	60
6.1.2. Análise de fibras lignocelulósicas e extrativos totais.....	61
6.2. Hidrólise alcalina e enzimática.....	62
6.6. Caracterização da farinha e das nanofibras.....	64
6.6.1. Análise termogravimétrica.....	64
6.6.2. Análise dos grupos funcionais por FTIR-ATR.....	67
6.6.3. Análise da cristalinidade por difração de raio-x.....	71
6.7. Análise dos filmes obtidos.....	72
6.7.1. Solubilidade em água.....	73
6.7.2. Propriedades mecânicas.....	74
6.7.3. Propriedades ópticas (Opacidade).....	76
6.7.4. Propriedades térmicas.....	78
7. Considerações finais.....	81
8. Referências.....	83
9. APÊNDICE.....	104
9.1. Hidrólise enzimática.....	104

## 1.Introdução

Nas últimas décadas houve uma crescente demanda da exploração de materiais duráveis para utilização diária e dentre estes podemos elencar os polímeros sintéticos oriundos do petróleo, com grande variedade de aplicações, devido a suas propriedades, versatilidade de uso e preço (FRANCHETTI; MARCONATO, 2006). Na indústria de alimentos esses materiais estão intimamente relacionados com a embalagem do alimento. Em função disso, o consumo de materiais plásticos vem aumentando, trazendo como consequência elevadas quantidades de resíduos que podem gerar impactos ambientais (DE LÉIS *et al.*, 2017; GEYER; JAMBECK; LAW, 2017; ZINK; GEYER, 2017).

Para contrapor esse cenário, surgem as pesquisas com polissacarídeos que vêm ganhando espaço em função de serem produtos obtidos a partir de fontes renováveis e pelo baixo custo associado. Dentre os polissacarídeos largamente estudados estão a celulose, o amido e a quitosana (BAILLIE, 2004; BRODIN *et al.*, 2017; COLLAZO-BIGLIARDI; ORTEGA-TORO; CHIRALT BOIX, 2018; MOHANTY, A.K., MISRA, M. AND HINRICHSEN, G.,2000; SILVA, R. *et al.*, 2009).

Além da celulose convencional, a nanocelulose tem obtido destaque nos meios industriais, principalmente por suas propriedades ópticas e de resistência mecânica (AZIZI SAMIR; ALLOIN; DUFRESNE, 2005; SQUINCA *et al.*, 2020). As nanofibras de celulose (NFC) podem ser obtidas de diferentes formas, tais como por hidrólise ácida e por síntese bacteriana, porém a hidrólise ácida caracteriza-se como um processo agressivo e que demanda alta quantidade de água para neutralização (LAVORATTI, 2015; TIBOLLA, Heloisa; PELISSARI; MENEGALLI, 2014a). Esses materiais também podem ser extraídos por processos mecânicos que diminuem o emprego de reagentes químicos (JONOOBI *et al.*, 2010), porém, ainda que essa seja uma estratégia que diminui o impacto ambiental causado pelas soluções ácidas empregadas, é uma tecnologia onerosa devido a quantidade de energia necessária. Outra maneira de obtenção de NFC é pelo emprego de enzimas, tais como,

hemicelulases e celulases, sendo principalmente as hemicelulases as enzimas com alto potencial de hidrólise para este fim (TIBOLLA, Heloisa; PELISSARI; MENEGALLI, 2014b).

As NFC são apontadas na literatura como um aditivo com capacidade de reforçar filmes biodegradáveis que podem ser empregados como embalagens de alimentos (ALMEIDA *et al.*, 2015; BLANCO *et al.*, 2018; GOPAKUMAR *et al.*, 2018; MERCANTE *et al.*, 2021). Para esses autores são propriedades das NFC: o fato de serem renováveis, apresentarem baixo custo e baixa solubilidade em água, quando comparada ao amido, que é outro polissacarídeo abundante.

Os filmes citados podem ser comestíveis ou serem enriquecidos com agentes antioxidantes, enzimas e outras substâncias inorgânicas, auxiliando na diminuição de reações de oxidação ou demonstrar o estado de conservação do alimento, acusando substâncias tóxicas e inaceitáveis aos consumidores (LAGUERRE; LECOMTE; VILLENEUVE, 2007; LECETA *et al.*, 2013; REALINI; MARCOS, 2014).

Um resíduo que se mostra promissor como fonte de celulose é a torta de oliveira oriunda da produção de azeite de oliva. Cultivada em larga escala em países da Europa, Argentina e Chile, a oliveira vem apresentando potencial de exploração em alguns estados do Brasil como Minas Gerais e Rio Grande do Sul. A ampliação do cultivo abre também perspectivas para pesquisas com os resíduos obtidos após a prensagem da azeitona para obtenção do azeite (DA SILVA, L. F. de O. *et al.*, 2012; OLIVEIRA *et al.*, 2010).

A partir dessas constatações, o presente estudo verificou o potencial da torta de oliveira como fonte de celulose que, após hidrolisada enzimaticamente, servirá para a produção de nanofibras que serão aplicadas posteriormente como material de reforço em compósitos de biopolímeros.

## **2.Objetivos**

Produzir nanofibras de celulose usando a hidrólise enzimática de resíduos lignocelulósicos da torta de oliveira para aplicação em filmes biodegradáveis.

A partir disso, são objetivos específicos deste trabalho:

- Caracterizar a torta de oliveira utilizada como matéria-prima para obtenção das nanofibras de celulose.
- Testar o potencial de hemicelulases comerciais na produção de nanofibras de celulose (NFC) a partir da matriz citada.
- Produzir duas formulações de filmes biodegradáveis de amido, sendo uma com adição de NFC.
- Testar as propriedades mecânicas, térmicas, ópticas, a composição dos filmes obtidos e o potencial biodegradável.

### 3.Revisão Bibliográfica

#### 3.1. Características e composição da celulose

Notadamente, a celulose é o polímero natural mais abundante em toda a natureza e a síntese anual dessa substância por plantas, algas e outros organismos é estimada em 1,55 bilhões de toneladas (SILVA, R. *et al.*, 2009). Essa macromolécula é constituída basicamente por monômeros de glicose (Figura 1) ligados entre si por ligações  $\beta$ -1,4-glicosídicas, sendo que o arranjo das cadeias poliméricas formadas é linear, além disso essas cadeias formadas apresentam elevado grau de polimerização.

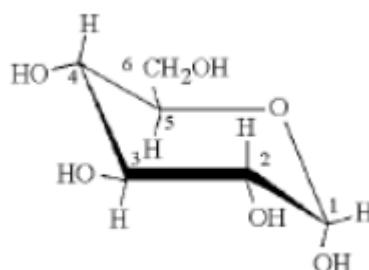


Figura 1: Monômero de glicose em conformação cadeia (conformação termodinamicamente estável)

A ligação glicosídica do tipo *beta* é formada em consequência da união de dois anéis de glicose invertidos entre si, com ângulo de  $180^\circ$  (considerando o mesmo plano), essa ligação resulta no dissacarídeo denominado celobiose (KLEMM *et al.*, 2005). Ou seja, a celulose trata-se de um polímero linear constituído por dímeros de glicose, a figura 2 destaca o dímero citado.

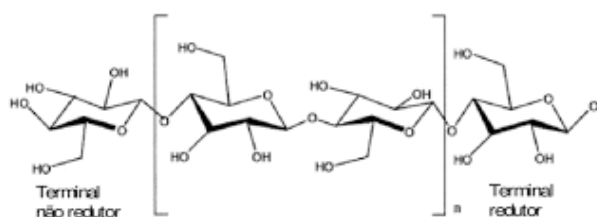


Figura 2: Dímero de glicose (celobiose) na cadeia linear da celulose

A glicose é um monossacarídeo que apresenta a conformação “cadeira”, conformação que apresenta menor calor de combustão ou entalpia de combustão, ou seja, essa conformação do anel é termodinamicamente mais estável. Essa conformação repercute na posição dos hidrogênios, preferencialmente na posição axial e na posição das hidroxilas, em posição equatorial, sendo os grupos funcionais oxigenados ligados aos carbonos que representam as posições 2, 3 e 6 do anel. Esses grupos definem a disposição das ligações de hidrogênio, ou seja, definirão as propriedades químicas e físicas do polímero em questão. Alguns autores como FENGEL, D; WEGENER, (1989) e DE MESQUITA *et al.* (2012) destacam que as ligações de hidrogênio podem ser intermoleculares ou também intramoleculares (que estão esquematicamente demonstradas na figura 3). Esse conjunto de interações culminam na formação de fibras com segmentos cristalinos e amorfos que conseqüentemente estão relacionados com a rigidez da biomolécula.

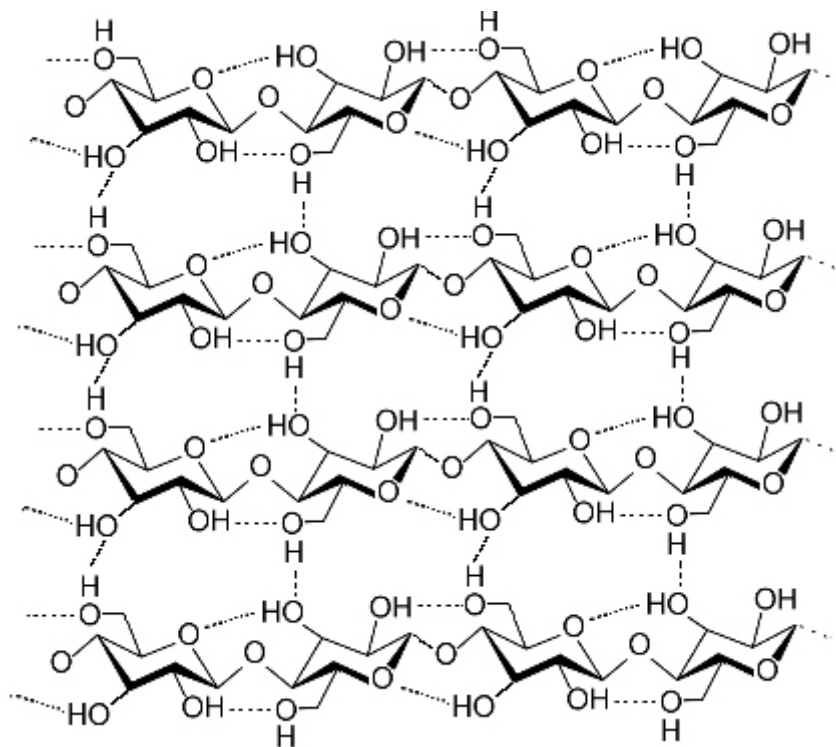


Figura 3: Ligações de hidrogênio intramoleculares e intermoleculares das cadeias de celulose

Ressalta-se que a celulose apresenta uma propriedade interessante que é o elevado caráter hidrofílico (devido os grupamentos OH), porém é insolúvel em meio aquoso devido à forte interação entre os feixes das fibras e ao elevado peso molecular (BRAUN; DORGAN; CHANDLER, 2008).

Embora a composição química da celulose seja simples porque é basicamente formada por sacarídeo, sua estrutura física apresenta elevada complexidade, possuindo regiões altamente cristalinas e outras menos organizadas, denominadas como regiões amorfas. A figura 4 mostra que moléculas de celulose são organizadas em unidades maiores, dando origem às protofibrilas ou fibrilas elementares, que são recobertas em unidades maiores chamadas de microfibrilas que finalmente se organizam em fibrilas maiores, denominadas macrofibrilas, formando as fibras de celulose.



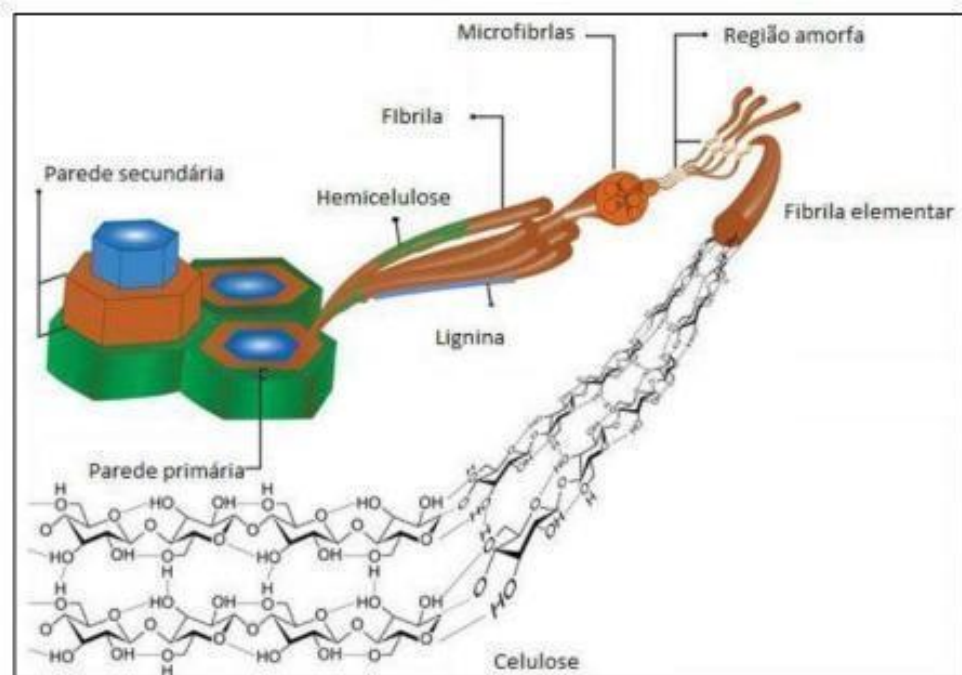


Figura 4: Esquema das regiões hemicelulolíticas que formam a parede celular dos vegetais

Fonte: Lengowski

Além da celulose, os compostos majoritários da parede celular incluem: hemicelulose, lignina e substâncias pécicas como pode ser observado na figura 5:

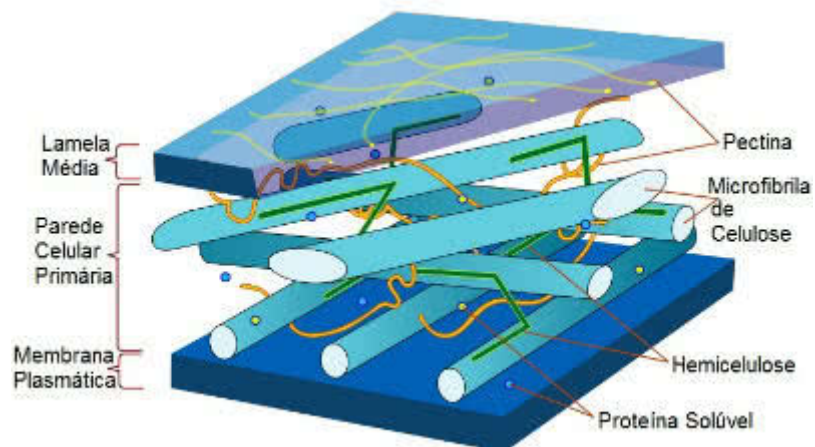


Figura 5: Recorte da parede celular dos vegetais

Fonte: [todamateria.com.br/parede-celular/](http://todamateria.com.br/parede-celular/)

A parede celular vegetal é comumente subdividida em camada primária e secundária. A distribuição de celulose, hemicelulose e lignina varia consideravelmente entre essas camadas. A parede secundária é dividida em mais três unidades, onde normalmente a segunda é a mais espessa, e é constituída na sua maioria de celulose (LAVOINE *et al.*, 2012; MENON; RAO, 2012).

### 3.2. Caracterização e composição da hemicelulose

A hemicelulose é um polissacarídeo com peso molecular inferior ao da celulose. É formada a partir de outros sacarídeos, tais como, xilose, manose, galactose, glicose, arabinose, 4-O-metil-glicurônico, D-galacturônico e ácido D-glicurônico, cujos monômeros estão representados na figura 6.

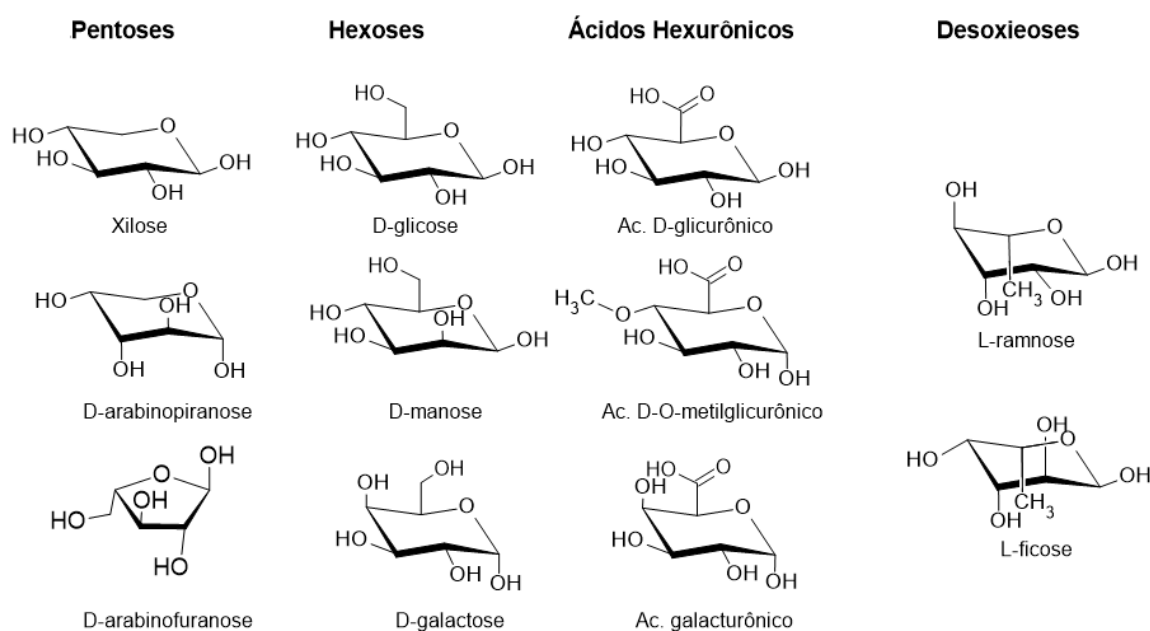


Figura 6: Pentoses, hexoses, ácidos urônicos e desoxieoses que formam a hemicelulose

Os monossacarídeos que constituem a hemicelulose estão ligados entre si por ligações glicosídicas,  $\beta$ -1,4 e  $\beta$ -1,3. Diferente da celulose, que é um composto cristalino e resistente à hidrólise, a hemicelulose apresenta uma estrutura ramificada e amorfa com pouca resistência à hidrólise (GREGORY; BOLWELL, 1999; HEINZE; LIEBERT, 2012; MADEIRA *et al.*, 2017).

### 3.3. Caracterização de outros componentes da parede celular

A lignina é um heteropolímero amorfo, insolúvel em água, consistindo de precursores de unidades de fenilpropanóides esquematizados na figura 7, esses monômeros são descritos como álcoois p-cumarílico (1) coniferílico (2), sinapílico (3).

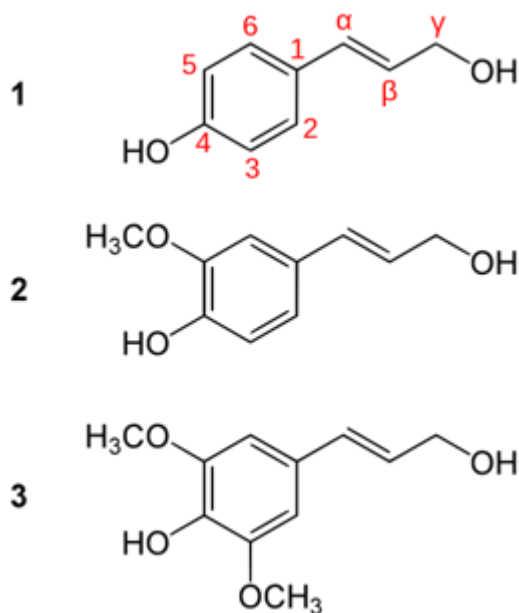


Figura 7: Álcoois cumarílico, coniferílico e sinapílico que são os principais monômeros da lignina

Ela está presente na parede celular vegetal, ligada à hemicelulose e a celulose, formando uma espécie de barreira impenetrável, para dar suporte estrutural, impermeabilidade e resistência contra o ataque microbiano e estresse oxidativo. Quanto maior a proporção de lignina, maior a resistência à degradação química (por ácidos ou bases) e enzimática (SÁNCHEZ, 2009). Dessa forma, para a produção de nanofibras, quanto maior o teor de lignina, maior deverá ser a eficácia do processo de deslignificação.

### 3.4. Enzimas hemicelulolíticas e celulolíticas

As enzimas hemicelulolíticas constituem um complexo capaz de atuar sobre fibras lignocelulósicas promovendo consecutivas hidrólises. É comum a aplicação desse complexo enzimático com o intuito de se produzir açúcares fermentescíveis. Sistemáticamente, sabe-se que a glicose a partir da celulose e a xilose a partir das xilanas são o maior alvo de estudos com essas enzimas, que são produtos com diversos fins na indústria de alimentos (MACHADO DE CASTRO; PEREIRA, 2010; ROBL *et al.*, 2019).

#### 3.4.1. Hemicelulases

Devido à heterogeneidade da estrutura da hemicelulose, sua degradação requer ação de várias enzimas. As substâncias presentes neste sistema são as seguintes enzimas: endo-1,4- $\beta$ -xilanases (E.C.3.2.1.8), responsáveis por catalisar a hidrólise da cadeia principal do xilano até a formação de xilooligossacarídeos; as 1,4- $\beta$ -xilosidases (E.C.3.2.1.37), que hidrolisam as ligações glicosídicas entre unidades formadoras de xilooligossacarídeos (xiloses) nas extremidades não redutoras; as  $\alpha$ -glicuronidase (E.C.3.2.1.139), que hidrolisam as ligações  $\alpha$ -1,2 do ácido glicurônico com os resíduos de xilose; as  $\alpha$ -L-arabinofuranosidases (E.C.3.2.1.55), que removem os substituintes de L-arabinoses; as acetil xilano esterases (E.C.3.1.1.72), que removem substituintes O-acetil dos resíduos de xilose e as esterases dos ácidos ferúlico (E.C.3.1.1.73) e p-cumárico (3.1.1.), que hidrolisam as ligações ésteres destes componentes ligados nas cadeias laterais do xilano (alguns sítios de atuações dessas enzimas podem ser observados na figura 8). A taxa de hidrólise depende do comprimento da cadeia e do grau ou tipo de substituição da cadeia principal (DOBREV, 2009; CINTRA *et al.*, 2020; KUMAR SHARMA; SINGH ARORA, 2013; MOREIRA; FILHO, 2016).

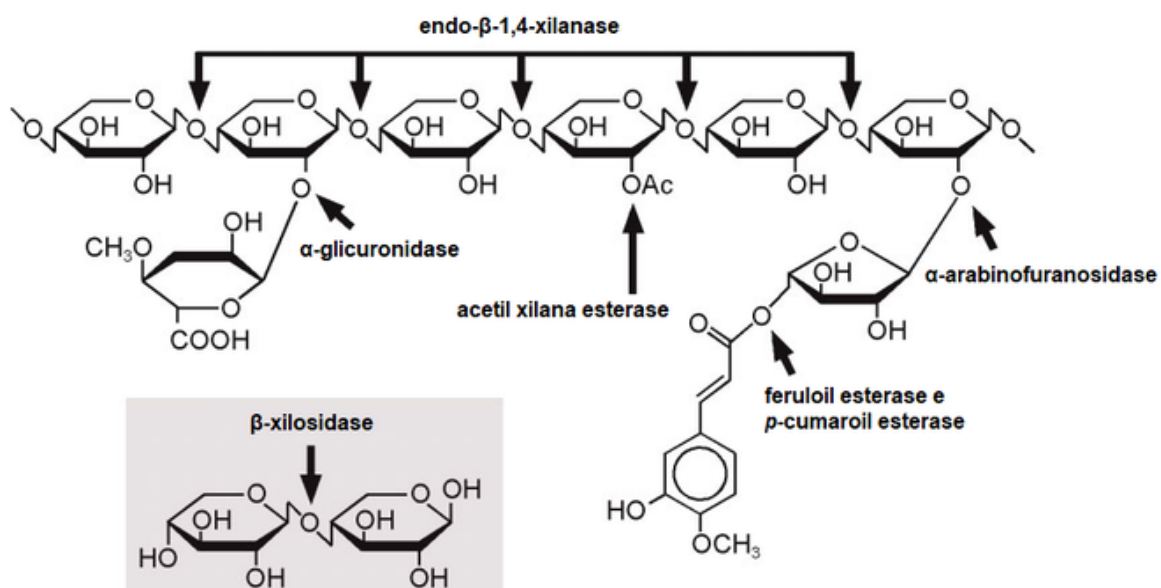


Figura 8: Principais sítios de hidrólise das enzimas hemicelulolíticas

Fonte: <https://bioquimicabrasil.com/2018/02/04/enzimas-xilanases/>

As enzimas que hidrolisam a hemicelulose podem atuar, no geral, por dois mecanismos catalíticos diferentes. Um desses mecanismos mantém a configuração do centro anomérico, via duplo deslocamento (por formação do intermediário enzima-carboidrato) sendo chamado de "retenção de configuração do centro anomérico", o mecanismo genérico está descrito na figura 9-A.

Outras enzimas atuam de maneira a alterar a configuração do carbono anomérico deixando a hidroxila de equatorial para axial no produto final, esse mecanismo é denominado "inversão da configuração do centro anomérico" e está descrito na figura 9-B (CINTRA *et al.*, 2020; MOREIRA; FILHO, 2016; SEGATO *et al.*, 2014).

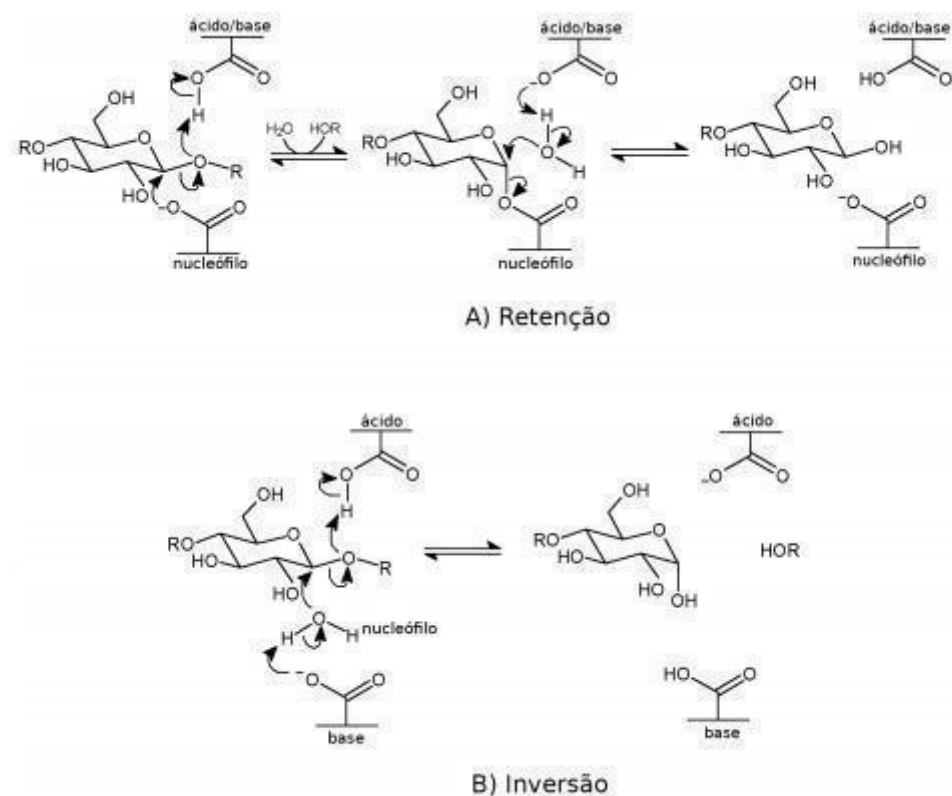


Figura 9: Mecanismos de hidrólise das enzimas hemicelulolíticas por (A) Retenção da configuração do carbono anomérico e por (B) Inversão da configuração do carbono anomérico

Fonte: Koshland, 1953

A classe de enzimas que clivam o xilano agem via mecanismo de duplo deslocamento, que do ponto de vista termodinâmico é mais favorável, essas enzimas são geralmente descritas como endo-enzimas, uma vez que são enzimas que atuam na hidrólise de ligações glicosídicas internas da cadeia. Por outro lado, enzimas que atuam hidrolisando ligações glicosídicas terminais e liberam resíduos de açúcares, são conhecidas como exo-enzimas – que são as responsáveis pela produção açúcares ou carboidratos de baixo peso molecular (SEGATO *et al.*, 2014).

Ainda a respeito dos aspectos mecanísticos, VIEGAS *et al.*, (2014) e OLIVEIRA (2010) relatam que a ação de hemicelulases trata-se de um mecanismo de reação ácido-base, as espécies envolvidas nesse processo são a glutamina (78) que age como nucleófilo e a glutamina (172) que atua como catalisador (Figura 10). O nucleófilo promove o ataque nucleofílico, clivando a ligação glicosídica, ao passo

que o catalisador estabiliza o oxigênio, doando um átomo de hidrogênio na forma de próton. Ocorre a formação de um intermediário e posteriormente a hidrólise, hidroxilação e transferência do hidrogênio, regenerando o catalisador.

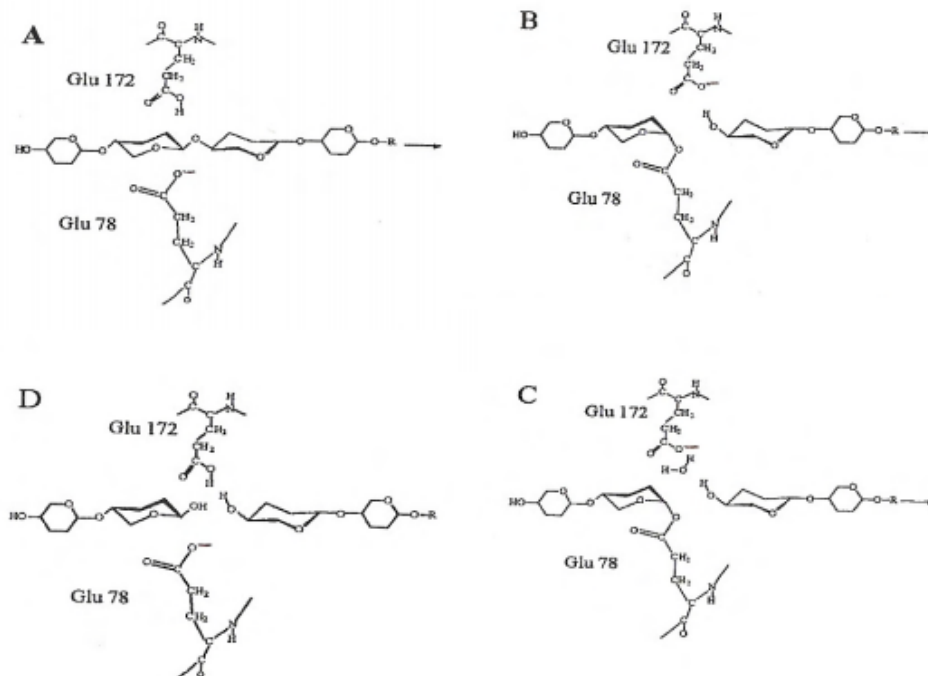


Figura 10: Descrição do mecanismo da hidrólise hemicelulolítica (de xilanase) com recuperação do catalisador

Fonte: Oliveira, 2010

Sobre os microrganismos que sintetizam essas enzimas, os fungos filamentosos são os microrganismos que apresentam maior potencial para síntese desse tipo de enzima em relação a leveduras e bactérias (POLIZELI *et al.*, 2005).

A respeito das condições ideais para ensaio com esse tipo de enzimas, LIAO (2015) e colaboradores observaram diferentes faixas de temperaturas e pH ótimos para 4 xilanases extraídas a partir de diferentes microrganismos, ficando evidente que essas enzimas apresentam diferentes especificidades, propriedades e parâmetros cinéticos em função do meio, predominando a faixa de pH entre 4 e 7.

Dentre as aplicações exploradas por esse complexo enzimático, as xilanases são comumente aplicadas na hidrólise enzimática de biomassa lignocelulósica derivada de resíduos ou subprodutos agroindustriais, tal como a cana-de-açúcar

para produção de etanol (ZIMBARDI *et al.*, 2013), no processo Kraft, para minimizar a utilização de produtos químicos na produção de papéis de qualidade (BUZALA *et al.*, 2016; CUI *et al.*, 2015; TORRES *et al.*, 2012); na alimentação animal ou produção de ração para aumentar a palatabilidade (ANBU *et al.*, 2015; POETA *et al.*, 2018) e como aditivos na indústria de alimentos com vistas a melhoria das propriedades tecnológicas e organolépticas de alguns produtos, principalmente em produtos de panificação no melhoramento da farinha de trigo (ELGHARBI *et al.*, 2015).

### 3.4.2. Celulases

As celulases são comumente classificadas como hidrolases que clivam ligações glicosídicas das cadeias da celulose. Essas enzimas são classificadas conforme o local de atuação no substrato celulósico. São divididas em três grandes grupos: as endoglicanases, que hidrolisam ligações internas da fibra celulósica; as exoglicanases, que atuam na região externa da celulose; e  $\beta$ -glicosidases, que hidrolisam oligossacarídeos em glicose (ZHANG; LYND, 2004).

A endoglicanase (endo-1,4- $\beta$ -D-glicanase: EC 3.2.1.4) é a enzima do complexo celulolítico responsável por iniciar a hidrólise, que atua randomicamente nas regiões internas da fibra celulósica. São liberados oligossacarídeos de diversos graus de polimerização (GP) e, por conseguinte, novos terminais: redutor, quando a glicose possui uma hidroxila heterosídica livre e um não redutor, quando a hidroxila heterosídica da molécula da extremidade participa de ligação com a glicose adjacente (FABIOLA RODRÍGUEZ-ZÚÑIGA *et al.*, [s. d.]; LYND *et al.*, 2002).

O grupo das exoglicanases é constituído por celobiohidrolase (CBH) e glicano-hidrolase (GH). A CBH (exo-1,4- $\beta$ -D-glicanase, EC 3.2.1.91) participa da hidrólise primária da fibra e é responsável pela amorfogênese, que é um fenômeno que envolve ruptura física do substrato, desestratificando as fibras, devido ao aumento das regiões intersticiais. Este fenômeno promove aumento na taxa de hidrólise, por tornar amorfas as regiões cristalinas do polímero, deixando-o mais exposto às celulases (MACHADO DE CASTRO; PEREIRA, 2010; ZHANG; LYND, 2004).



O grupo de enzimas do complexo celulolítico que engloba a glicosidase (1,4- $\beta$ -D-glicosidase) é capaz de hidrolisar celobiose e oligossacarídeos solúveis em glicose (LYND *et al.*, 2002).

Aparentemente, dentre os grupos de celulases, a única que apresenta potencial de uso para a produção de nanofibras é a endo-glucanase, visto que as demais tendem a agir muito na cadeia cristalina, gerando oligossacarídeos ou até mesmo dissacarídeos. Essa inferência é confirmada por dois autores: HENRIKSSON *et al.*, (2007) e PÄÄKKO *et al.* (2007) que melhoraram o processo de produção de NFC empregando apenas a celulase denominada endo-glucanase.

### 3.5. A torta de oliveira como fonte de celulose

A oliveira (*Olea europae L.*) é uma árvore que apresenta troncos de casca grossa, ramos delgados, folhas persistentes e alongadas e frutos denominados azeitonas (Figura 11) com alto teor de óleos de onde se extrai o azeite de oliva (CAVALHEIRO *et al.*, 2014).

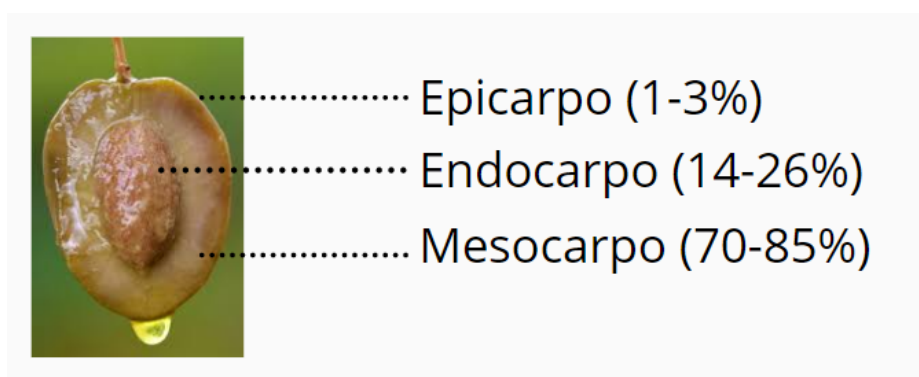


Figura 11: Fruto da oliveira (azeitona) com descrição do percentual correspondente ao epicarpo (pele), endocarpo (polpa) e endocarpo (caroço)

Fonte: <https://olivapedia.com/oliveiras-no-brasil-arauco/>

O clima do Rio Grande do Sul - normalmente com estações bem definidas auxiliou na adaptação desta planta aos solos gaúchos. Segundo o levantamento climático, a região sul do estado apresenta o melhor ambiente para cultivo da oliveira, pois nessa região há maior similaridade com climas temperados de outros países em que a planta se originara (WREGGE *et al.*, 2015). No entanto, o levantamento edafoclimático do Rio Grande do Sul (Figura 12) demonstra que embora o clima seja favorável, a presença de solo rico em rochas basálticas faz com que muitas regiões do estado não demonstrem estabilidade estrutural propícia para a fixação no solo e desenvolvimento de pomares de oliveiras (WREGGE *et al.*, 2015). Dessa forma o RS não possui áreas preferenciais para o crescimento de oliveiras - que seriam regiões com clima e solo perfeitos para esse cultivo. Porém, há nos pampas gaúchos regiões recomendáveis, ou seja, regiões que possuem qualidades para moderada adaptação desse vegetal. As regiões recomendáveis estão

marcadas pela coloração verde no mapa (Figura 12). Uma ponderação que deve ser levada em consideração é que como observa-se no esquema, o estado do RS apresenta potencial de ampliar o cultivo desse vegetal e processamento dos frutos, criando desafios para o aproveitamento de resíduos provenientes do plantio e processamento de azeitonas.

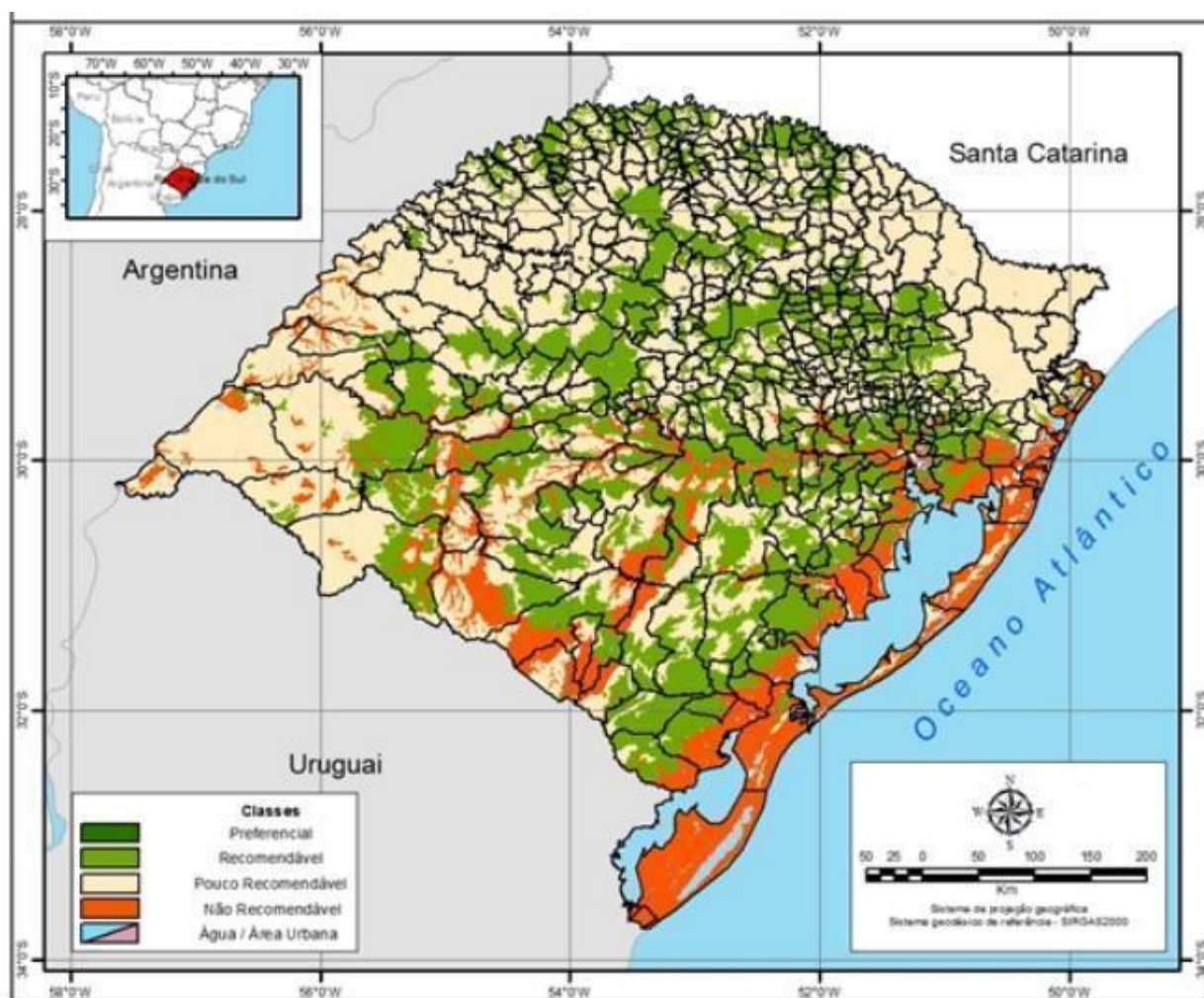


Figura 12: Regiões preferenciais de cultivo da oliveira (em verde) no RS

Fonte: Alba, Flores e Wrege (2015)

Estima-se que a produção mundial da safra de 2021 tenha ultrapassado 3 milhões de toneladas (IOC, 2021), sendo que o consumo desse produto estimado em 3.211.000 toneladas. No Brasil, a safra de 2019 rendeu cerca de 230 mil litros de

azeite, sendo aproximadamente 180 mil litros produzidos no estado do Rio Grande do Sul (*IBRAOLIVA*, 2020).

Segundo *CARDOSO; COIMBRA; AVEIRO, [s. d.] e MANDARINO (2005)*, o fruto da oliveira apresenta em média 50% de água, 1,6% de proteínas, 22% de óleo, 19,1% de carboidrato, 5,8% de celulose e 1,5% de minerais.

O interesse nessa planta está relacionado ao fato de que azeite de oliva possui um valor agregado, em relação a outros triglicerídeos empregados na dieta humana. Essa ação benéfica à saúde está relacionada com presença de fenólicos e aos ácidos de cadeia insaturada quando comparado com óleos de sementes oleaginosas como a soja, milho e semente de girassol. Alguns autores afirmam que a ingestão periódica de azeite de oliva extra-virgem possui uma correlação com a diminuição da prevalência de doenças como câncer e doenças cardiovasculares (*CAVALHEIRO et al., 2014; DA SILVA, L. F. de O. et al., 2012; KRIS-ETHERTON et al., 1999; LARSEN; JESPERSEN; MARCKMANN, 1999*).

O azeite de oliva consiste em triglicerídeos de ácidos graxos cuja obtenção pode ser efetuada a partir da operação de extração e é nessa etapa do processo que são produzidos os subprodutos. Normalmente o processo de extração é precedido por outras operações como pode ser observado abaixo (Figura 13).

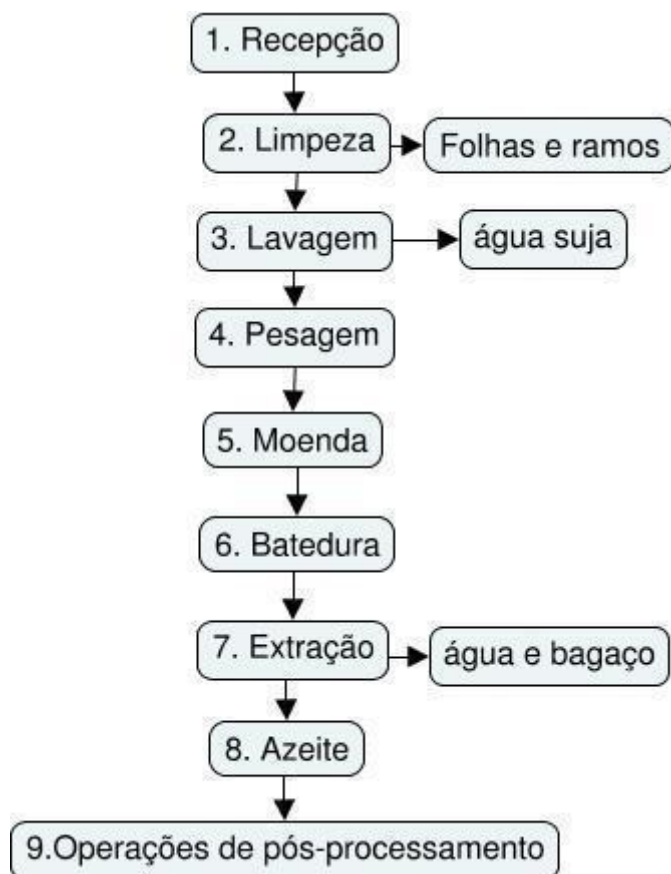


Figura 13: Fluxograma da produção do azeite de oliva

A limpeza (operação 2 da figura 13) corresponde à etapa posterior ao descarregamento da matéria-prima em esteiras para remoção de pedaços de rocha e elementos mais volumosos, logo após os materiais são encaminhados para câmaras sujeitas à corrente de ar que são responsáveis pela eliminação de folhas e outras impurezas leves. A operação de lavagem das azeitonas (3) é realizada com água em temperatura ambiente, permitindo a remoção de elementos sólidos como terra ou pequenas pedras. A moenda ou moagem (5) é a operação seguinte onde ocorre o aumento da superfície de contato e promove o rompimento da polpa, liberando gotículas de azeite, é necessariamente nessa etapa, portanto, que se forma uma pasta que ficará disponível para a etapa de batedura ou termobatedura. A termobatedura (quando ocorre com aquecimento brando, 30°C) corresponde à agitação lenta e contínua da pasta. São nessas condições que ocorrem a coalescência de gotículas de óleo e a separação das fases aquosa e oleosa (APARICIO; HARWOOD, 2013).

Posteriormente aos processos citados, a pasta obtida está apta a ser encaminhada para separação das fases, ou seja, a para a operação de extração (7), esta separação pode ocorrer por um dos três métodos consolidados: sistema tradicional de prensas; sistema de centrifugação de duas fases ou sistema de centrifugação de três fases.

Seja qual for o método empregado, o aumento da produção de azeite de oliva no Brasil proporciona um aumento da geração de resíduos e os estudos sobre o aproveitamento do bagaço de azeitona ainda são escassos no país. A respeito dos tipos de resíduos provenientes da extração de azeite de oliva, os autores geralmente os classificam em dois tipos: resíduos sólidos e resíduos líquidos. A natureza desse resíduo está intimamente ligada ao tipo de extração a qual ele foi submetido, como demonstra-se no quadro 1.

Quadro 1: Tipos de resíduo nos sistemas de extração de azeite

	<b>Sistema tradicional Sistema três fases</b>	<b>Sistema duas fases</b>
<b>Resíduo sólido</b>	Torta ou bagaço	Bagaço de duas fases
<b>Resíduo líquido</b>	Água ruça	-

Fonte: Medeiros et.al. 2016

A ausência de resíduo líquido no sistema de duas fases é explicada através da natureza do processo em que as azeitonas são trituradas, submetidas a batidura e ocorre a formação de fase líquida constituída pelos óleos, ou seja, o azeite propriamente dito. A segunda fase é a pastosa que corresponde aos sólidos e a água de constituição da azeitona (ALBURQUERQUE *et al.*, 2004). Esse sistema é comumente empregado no Rio Grande do Sul para a produção de azeite de oliva em grande escala. A principal vantagem de se adotar o sistema de duas fases é que resíduos líquidos denominados “água ruça” ou “alperujo” não são produzidos diretamente porque estão misturados na pasta que corresponde à torta de oliveira, a figura 14 apresenta o aspecto da torta de oliveira fresca cedido pela empresa Olivas do Sul e ao lado o líquido drenado desse material.

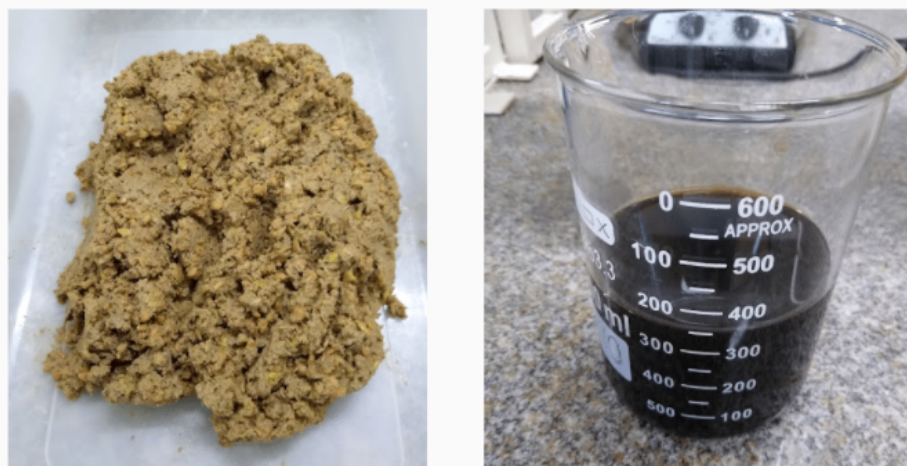


Figura 14: Torta de oliveira fresca (resíduo pastoso) e alperujo (rejeito líquido)

Segundo Medeiros et al. (2016) as fases aquosas do sistema tradicional e de três fases quando liberadas na rede de esgoto, ou seja, no meio ambiente, trazem danos ambientais devido a alta carga de compostos orgânicos dispersos, podendo causar eutrofização dos corpos d'água. De qualquer forma, mesmo não havendo liberação de resíduo aquoso nos sistemas de extração empregados no RS, é de suma importância que ocorra a exploração de novas alternativas de uso do resíduo sólido.

Diversos são os sub-produtos lignocelulósicos que podem ser gerados no cultivo, colheita, e no processamento das azeitonas para a obtenção de azeite, à medida que a produção de azeite aumenta, torna-se um desafio o reaproveitamento dos resíduos provenientes do setor oleícola com o intuito de diminuir eventuais danos ambientais, destes, os principais sub-produtos são: (a) **resíduo da poda de oliveira**, que corresponde às folhas, galhos e porções do caule cortadas a cada dois anos a partir da primeira colheita, sendo ricos em celulose, hemicelulose, lignina, cinzas e extrativos (ROMERO-GARCÍA *et al.*, 2014); (b) **caroços** que podem ser produzidos a partir da produção de azeitonas de mesa ou a partir do seu processamento na extração do azeite, apresentando alto teor de celulose (mais de 25%) além de hemicelulose e lignina (HODAIFA *et al.*, 2013; ROMERO-GARCÍA *et al.*, 2014); (c) **folhas de oliveira**, um resíduo que também pode ser proveniente da poda da árvore, apresenta na sua constituição substâncias de interesse como compostos fenólicos, minerais e ácidos graxos insaturados (CAVALHEIRO *et al.*,

2014) e (d) **bagaço de azeitonas** ou **torta de oliveira** que corresponde ao resíduo pastoso ou sólido obtido a partir da extração do óleo dos frutos por prensa ou por centrifugação.

É consenso que a torta de oliveira corresponde a uma importante fonte de fibras lignocelulósicas, visto que de acordo com esses autores (CHIOFALO *et al.*, 2004; CONTRERAS *et al.*, 2020; DOMÉNECH *et al.*, 2021; MEDEIROS *et al.*, 2016) há presença significativa de extrativos, celulose, hemicelulose, lignina, açúcares, ácidos orgânicos, compostos fenólicos e íons diversos, correspondendo à fração mineral.

Dependendo do rendimento da extração de azeite, o sub-produto pode apresentar elevada quantidade de material lipofílico, prevalecendo triacilgliceróis com ácidos graxos de cadeia insaturada – esses compostos lipídicos podem ser extraídos e dar origem ao óleo de bagaço de oliva (RUIZ-MÉNDEZ *et al.*, 2013). Além dos óleos estão presentes quantidades significativas de outros metabólitos secundários: ácidos triterpênicos (como o oleanólico) e diálcoois triterpênicos (como o uvaol), que são exemplos de substâncias de alto caráter antioxidante podendo atuar contra a oxidação de lipoproteínas do tipo LDL (CLODOVEO *et al.*, 2014) e compostos fenólicos (MEDEIROS *et al.*, 2016).

São compostos de destaque e que vêm sendo estudados mundialmente a partir da torta de oliveira: hidroxitirosol (I), oleuropeína (II), tirosol (III), ácido cafeico (IV), ácido p-coumárico (V), ácido vanílico (VI), elucidados na Figura 15 (DE CARVALHO *et al.*, 2016; MEDEIROS *et al.*, 2016).



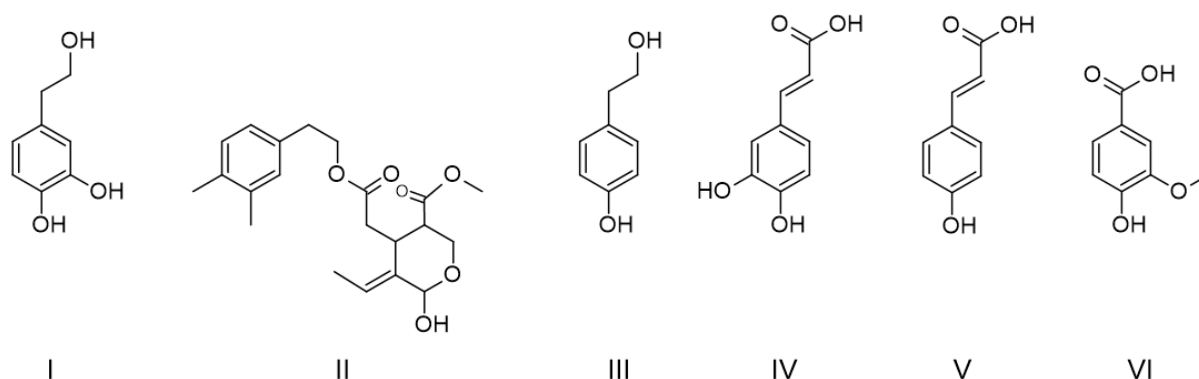


Figura 15: Constituintes fenólicos encontrados na torta de oliveira

Além dessas substâncias que conferem caráter bioativo há presença de teores significativos de pectinas na parede celular das células que compõe o mesocarpo, sendo o bagaço, portanto, uma fonte promissora de substâncias pécticas para uso como espessante na indústria de alimentos. Estudos demonstram que o poder gelificante da pectina encontrada nesse sub-produto se assemelha à pectina de baixa metoxilação comumente comercializada como aditivo alimentar (GALANAKIS; TORNBERG; GEKAS, 2010).

E a respeito da aplicação dos resíduos gerados nos processos citados, ainda predominam usos como fertilizantes para plantações, alimentação de animais e até mesmo produção de biocombustíveis, visto o alto teor de matéria orgânica e fibras insolúveis (Vera, 2009; Cabrera, 2010).

Por outro lado RABOUHI *et al.* (2009) demonstraram que esse sub-produto era capaz de agir como aditivo em polímeros, segundo esses autores incorporações de diferentes teores de sólidos provenientes da torta de oliveira em matrizes poliméricas, após funcionalização com diclorodimetilsilano otimizaram as características físico-químicas de diversos polímeros. Trabalhos que utilizam essa abordagem justificam que dessa forma o polímero sintético torna-se menos agressivo ao meio ambiente. Atualmente esse pensamento deve ser revisto, já que se sabe que o polímero sintético permanece em grande quantidade na matriz do produto e caso sejam descartados de forma inadequada, continuarão gerando impactos ambientais. LAMMI *et al.*, (2018) testaram aplicações voltadas para a

química de polímeros e desenvolveram compósitos com a exploração das características de distintas frações do bagaço de oliveira. As frações do subproduto empregadas nessa abordagem foram sub-divididas e classificadas de acordo com a polaridade da fração: (a) fração de alta polaridade devido a grupamentos hidroxila, majoritariamente constituída de celulose cristalina (b) fração mais amorfa, rica em lignina e outros constituintes fenólicos e (c) fração de propriedades intermediárias. A partir da exploração dessas frações e suas respectivas aplicações, esses autores citam melhora nas propriedades de barreira. DE MORAES CRIZEL *et al.*, (2018) testaram três concentrações (10%, 20% e 30%) do sub-produto na forma de farinha e de micropartículas como aditivos em filmes de quitosana, concluíram que em maiores teores, os filmes tendem a ficar menos uniformes e menos resistentes à tração embora aumentem significativamente o efeito protetor contra a oxidação do alimento embalado pela ação dos metabólitos secundários presentes no bagaço. Outros autores citam melhora nas propriedades reológicas de filmes (KHALIFA *et al.*, 2016).

Esses estudos recentes voltados à ciência de materiais abrem espaço para a pesquisa com celulose a partir de torta de oliveira, produção de nanocelulose e emprego como material de reforço na produção de filmes biodegradáveis.

Há também na literatura abordagens que relacionam a utilização desse sub-produto na bioconversão mediada por *Streptomyces sp.* em cultivo submerso, visando uma maior disponibilidade de proteínas, açúcares pela hidrólise e biotransformação de fibras e gorduras presentes na torta de oliveira (MEDOUNI-HAROUNE *et al.*, 2018). Além de estudos de bioconversão, a utilização da torta de oliveira como substrato em cultivo em estado sólido também é considerada, apresentando, dessa forma, uma valorização integrada do bagaço de oliveira para produção de lipase e obtenção de substâncias de valor agregado (RIBEIRO *et al.*, 2020).

Outros estudos vêm sendo realizados na última década com o intuito de purificar e efetuar aplicações em diversos seguimentos da indústria. Dos quais podemos citar a extração de oleuropeína para aplicações farmacológicas, sobretudo devido suas propriedades anti-oxidantes, anti-inflamatórias anti-microbianas e de prevenção contra o mal de Alzheimer (BULOTTA *et al.*, 2014; JG *et al.*, 2018)

explorações biotecnológicas como produção de enzimas microbianas (CLODOVEO *et al.*, 2014), cultivo de micro-organismos em estado semi-sólido (OLIVEIRA *et al.*, 2018), produção de biocombustíveis como biogás e etanol a partir de fermentação/hidrólise (ABU TAYEH *et al.*, 2014; CONTRERAS *et al.*, 2020). Na indústria de alimentos autores relatam a adição das fibras desse sub-produto na produção e enriquecimento nutricional de produtos de panificação e confeitaria, tais como, massas alimentícias, pães e biscoitos aumentando o teor de fibras e atividade antioxidante desses alimentos (CECCHI *et al.*, 2019; PADALINO *et al.*, 2018; SIMONATO *et al.*, 2019).

No entanto, aplicação que se explorou nesse trabalho foi o emprego do conteúdo de fibras lignocelulósicas da torta de oliveira, purificação da celulose e produção de nanofibras de celulose por hidrólise enzimática, considerando que a celulose é um composto que vem ganhando destaque pelo caráter renovável e por suas propriedades físico-químicas.

### **3.6. Nanotecnologia e Nanomateriais como reforço em filmes**

Define-se um material com propriedade nanotecnológica quando ele possui estrutura molecular estável com pelo menos uma dimensão inferior a 100 nanômetros, manipulados a fim de dar origem a materiais com melhores performances (DISNER; CESTARI, 2016; PACHECO-TORGAL; JALALI, 2010). Quando comparados a outros materiais, os materiais de escala nanométrica possuem melhores propriedades, tanto na qualidade como na eficiência, sendo uma tecnologia emergente e interdisciplinar, já aplicada e relacionada a inúmeras áreas de conhecimento, tais como materiais de embalagem, indústria farmacêutica, cosmética, tintas, eletrônica, medicina, materiais plásticos, entre muitas outras (MIKKONEN, 2020).

Grande parte dos trabalhos que sintetizam NFC relatam tamanhos médios de diâmetro inferiores a 10 nm, confirmando o potencial de produção de estruturas em escala nanométrica a partir da celulose (SAMUEL; ADEFUSIKA, 2019; TIBOLLA, Heloisa; PELISSARI; MENEGALLI, 2014a). A literatura corrente aponta também,

que há o interesse e potencial de aplicações de nanofibras de celulose na indústria de alimentos (como aditivo em embalagens biodegradáveis para melhorar propriedades físicas e mecânicas desses materiais).

Conforme MACHADO (2012), por exemplo, as NFC da fibra de côco podem ser empregadas como agente de reforço de filmes de amido de mandioca. Nesse trabalho houve também a adição de erva-mate como aditivo antioxidante natural. Este material foi empregado para o acondicionamento de azeite de dendê e segundo os autores, mesmo em atmosfera de oxidação acelerada, houve pouca formação de peróxidos, indicando eficiência da embalagem. Esse estudo corrobora com SOZER & KOKINI (2009) que ponderam que o emprego de nanomateriais em embalagens de alimentos possibilita o desenvolvimento de embalagens bioativas, pois estes são capazes de estabilizar compostos ativos – como prebióticos, probióticos, vitaminas encapsuladas ou outros metabólitos secundários – em ótimas condições, até que sejam liberados de forma controlada para o produto acabado.

Além de atuar como reforço em filmes, as NFC podem atuar como estabilizante de compostos bioativos e como estabilizante em diversas emulsões alimentares. A estabilidade nesses sistemas está intimamente relacionada ao fato dos nanocristais ou NFC atuarem como partículas de *janus*, ou seja, partículas que apresentem caráter anfipático (LI *et al.* 2021).

A síntese de NFC vêm sendo encorajada a partir de diferentes fontes de celulose, sobretudo no Brasil, que é um país rico em biodiversidade. Chandra *et al.* (2016) demonstraram a possibilidade de empregar celulose de resíduos de palmeira para produção de nanocelulose, a partir de métodos químicos e mecânicos, segundo esses autores o processo acarretou em melhores propriedades mecânicas e térmicas, apresentando aptidão como material de reforço.

PELLISSARI *et al.*, (2017) defenderam o emprego de enzimas para produção de nanofibras de celulose, objetivando alto aproveitamento de frutos e engaços da banana, nesse trabalho são descritos diversos fatores como pH, temperatura e atividade das enzimas hemicelulases e celulases, conforme essa autora o uso de enzimas para a produção de filmes é um processo eficaz, pois apesar do valor econômico alto das enzimas quando comparados a reagentes químicos, as rotas enzimáticas culminam em processos mais brandos e ambientalmente amigáveis.

Segundo a autora citada, o complexo celulolítico não apresentou resultados promissores pela alta degradação da cadeia cristalina. Indicando que devem ser encorajadas pesquisas focadas na hidrólise mediada por hemicelulases como as xilanases. Essa abordagem sugere sobre que a utilização desse processo corresponde a uma tecnologia que emprega reaproveitamento de material de baixo custo, facilmente disponível, sendo ambientalmente amigável, exigindo baixo consumo de energia na fabricação.

De acordo com o quadro 2 podemos observar a composição e as propriedades relacionadas com a adição de NFC obtidas de diferentes fontes em filmes de diferentes matrizes.

Quadro 2: Propriedades obtidas pela adição de nano-reforços em filmes biodegradáveis

<b>Referência</b>	<b>Matriz</b>	<b>Reforço</b>	<b>Propriedades destacadas</b>
George, 2011	Amido comercial	NFC de celulose bacteriana	Filmes com melhores propriedades mecânicas
Machado et. al. 2014	Mandioca	NFC de fibra de coco	Diminuição da atividade de água
Silva, 2015	Mandioca	NFC de fibra de coco, milho e eucalipto	Diminuição da PVA e aumento das propriedades mecânicas
Martins, 2017	Mandioca	NFC de fibras de pupunha	Diminuição da PVA e da solubilidade em água
Pelissari, 2017	Banana	NFC de casca de banana	Aumento da opacidade, da resistência à água e à tração
Marques, 2018	Mandioca	NFC de rami	Redução da absorção de água
Sanchez, 2021	Polivinil álcool	NFC de resíduo de poda de oliveira	Aumento da estabilidade térmica, redução da PVA
Franco 2020	Quitosana	NFC de pupunha	Aumento da alongação e TR,

			aumento da opacidade
Tibolla, 2019	Amido	NFC de banana	Diminuição da PVA, aumento da opacidade e melhora das PM
Coelho, 2020	Amido	Nanocristais de bagaço de uva	Maior opacidade, aumento da TR
Sá, 2020	celulose bacteriana	nanocristais de celulose bacteriana	Diminuição da PVA e aumento da cristalinidade
Martins, 2020	Amido	NFC de pupunha	Aumento da TR, redução da PVA, aumento da opacidade
Silva, 2017	Amido de manga	Nanocristais de celulose e nanoamido	melhores propriedades mecânicas
Roy et al. 2020	Amido de feijão	nanoamido	diminuição da solubilidade, aumento das propriedades mecânicas
Tibolla, 2020	Amido de banana	NFC de fibras de banana	melhora do shelf life
Shapi'i et al. 2020	Amido de mandioca	nanoquitosana	atividade antimicrobiana
Mukurumbira et al. 2017	Amido de inhame e batata	nanoamido	diminuição da pva, aumento da opacidade e estabilidade térmica
Qin et al. 2016	Amido de milho	Nanowhiskers de celulose	aumento das propriedades mecânicas, diminuição da PVA, aumento da opacidade
Li et al 2018	Amido de milho	Nanofibras de polpa de beterraba	Aumento das propriedades mecânicas, aumento da temperatura de transição vítrea, diminuição da PVA

Travalini 2019	Amido de mandioca	Nanofibra de bagaço de mandioca	aumento da opacidade, diminuição da PVA
Nieto-Suaza et al 2019	Amido de banana e babosa	Nanoamido	diminuição da PVA, aumento da resistência térmica, diminuição da alongação
Fazeli et al 2018	Amido	Nanofibra de agave	Aumento do módulo elástico, diminuição da PVA
Fan et al 2016	Amido	nanofibras de milho ceroso	Melhora nas propriedades mecânicas, aumento módulo de <i>young</i> e diminuição de PVA
Tian et al 2019	Amido	nanofibra de eucalipto	melhora das propriedades mecânicas
Lélis de Souza et al. 2021	Amido de fruta lobo	nanopartículas de celulose	aumento das propriedades térmicas, aumento da tensão na ruptura, aumento da opacidade
Xu et al. 2016	Amido	Nanocristais de celulose de bagaço de uva	Aumento da opacidade, aumento das propriedades mecânicas
Leal, 2018	Poliacetato de vinila	NFC de fibra de paina	Aumento da resistência à tração

Legenda: TR: tensão na ruptura; PVA: permeação de vapor d'água

Desse modo, pode-se considerar as NFC são uma classe de materiais atraentes para elaboração de compósitos de baixo custo e de melhores propriedades, que podem ser empregados na produção de filmes para embalagem ou cobertura de alimentos.

### 3.7. Filmes para embalagens de alimentos

As embalagens apresentam finalidade de proteção do alimento, *a priori*, não devem apresentar nenhum tipo de interação com ele. O embalamento do alimento é uma parte importante dentre todas operações de processamento do alimento e entre as funções as embalagens estão: a contenção para manter o alimento seguro até o consumo, a proteção contra riscos mecânicos e ambientais, comunicação para identificar e auxiliar a venda do produto, a maquinabilidade que está relacionada à eficácia na linha de produção, velocidade de enchimento e fechamento com mínimas paradas do processo e conveniência que relaciona todo processo de estocagem, distribuição, abertura, descarte e recebimento do consumidor (Fellows, 2006).

Atualmente as embalagens envolvem uma gama de materiais, sendo os mais utilizados: plásticos, metais, vidros e papéis. Outrossim, existe grande interesse no desenvolvimento de novos tipos de embalagens principalmente no que diz respeito à diminuição de emprego de plásticos, uma vez que apesar desses materiais possuírem excepcionais propriedades funcionais, são considerados não biodegradáveis e estão envolvidos em problemas ambientais, pois levam muito tempo para se degradarem, permanecendo praticamente intactos ao longo dos anos (BONA, 2007).

Segundo a Abiplast (2019) o uso dos plásticos como embalagens de produtos alimentícios acarreta um grande problema ambiental porque esses materiais apresentam curto tempo de duração da prateleira ao consumidor final, gerando uma grande quantidade de resíduos.

Dessa forma diversos estudos empregando macromoléculas para produção de filmes biodegradáveis vem sendo encorajados na tentativa de substituição das embalagens convencionais: DA ROSA ZAVAREZE, (2012) propuseram a aplicação de proteínas miofibrilares e sarcoplasmáticas de corvina na produção de filmes biodegradáveis, já que essa é considerada uma das espécies mais importantes da atividade pesqueira no Brasil. Segundo esses autores ainda são necessários novos estudos para melhorar as propriedades como resistência à tração, permeabilidade à água, resistência e flexibilidade de filmes oriundos das proteínas desse pescado.



CHAMBI & GROSSO (2011) exploraram propriedades como umidade, espessura do filme, textura, permeabilidade de vapor de água em filmes de metilcelulose, pectina, glicomanana e gelatina, observando que filmes com melhores propriedades mecânicas foram obtidos a partir da mistura dos polissacarídeos citados, sendo que a permeabilidade ao vapor de água foi melhorada com a adição de gelatina desde que o experimento seja conduzido em meio ácido. Esses trabalhos trazem à tona problemas relacionados à matriz como a complexidade das propriedades de filmes (principalmente a solubilidade), mas por outro lado enfatizam a abundância das matrizes utilizadas, ou seja, estimulam o foco no reaproveitamento, mesmo que nem todas apresentem potencial de aplicações em larga escala.

Dentro dos materiais biodegradáveis, podemos citar as embalagens enriquecidas com princípios ativos que interagem de maneira intencional com o alimento, prolongando sua vida de prateleira ou conferindo características sensoriais e/ou nutricionais desejáveis (OLIVEIRA DE SOUZA; SILVA; DRUZIAN, 2012). A utilização de produtos de origem natural para o desenvolvimento de uma embalagem biodegradável com ação antioxidante é de grande interesse para a indústria de alimentos e para a sociedade, visto que se trata de uma embalagem que traz benefícios no consumo do alimento e sobretudo ao meio-ambiente no que diz respeito à biodegradabilidade (LAMMI *et al.*, 2018; MALI; GROSSMANN; YAMASHITA, 2010).

Muitos trabalhos têm desenvolvido novos sistemas de embalagens utilizando matrizes biodegradáveis (filmes ou coberturas comestíveis biodegradáveis). Nessa abordagem a classe de compostos majoritariamente empregada é a dos polissacarídeos (amido, quitina, alginato etc) e proteínas como a gelatina, sendo que o amido possui baixo preço e pode ser encontrado em vários vegetais, nos últimos anos houveram pesquisas explorando o amido de milho (MALHERBI *et al.*, 2019), batata (HU; CHEN; GAO, 2009), mandioca (MANIGLIA *et al.*, 2019), ervilha (CHEN, Y. *et al.*, 2009) e outros vegetais endêmicos do Brasil.

### 3.7.1. Filmes à base de amido e adicionados de NFC

O amido é um polissacarídeo renovável, biodegradável, de baixo custo, disponível, podendo estar presente em diferentes órgãos de vegetais, tais como, raízes, caule (tubérculos), frutos e sementes. Na dieta humana corresponde à mais importante fonte de glicose (energia). Já na indústria esse carboidrato possui diversas aplicações como agente gelificante, espessante, estabilizador de coloide, na retenção de água e na formação de miolo e estrutura em produtos de panificação e confeitaria. As principais fontes comerciais de amido são o milho, trigo, mandioca, a batata, o arroz, etc. (LUCHESE; SPADA; TESSARO, 2017; MALI *et al.*, 2005; MALI; GROSSMANN; YAMASHITA, 2010).

As propriedades desse carboidrato dependem da fração de amilose e amilopectina presentes. A amilose (Figura 16 - A) é formada por uma cadeia de glicoses ligadas por ligação glicosídica  $\alpha$ -1,4, que lhe conferem uma conformação linear, propriedades de retrogradação e formação de géis firmes. E na produção de filmes essa fração acarreta produtos de maior resistência mecânica. Nesse sentido para confecção de filmes são requeridos amidos que apresentem elevada fração de amilose. A amilopectina (Figura 16-B). Por sua vez, é formada por cadeias de estrutura ramificada formada por ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,6 e, quando dispersa em água, é mais estável, ou seja, apresenta menor tendência a retrogradar culminando em filmes fracos (ASHOGBON; AKINTAYO, 2014; MALI; GROSSMANN; YAMASHITA, 2010; ROY *et al.*, 2020).

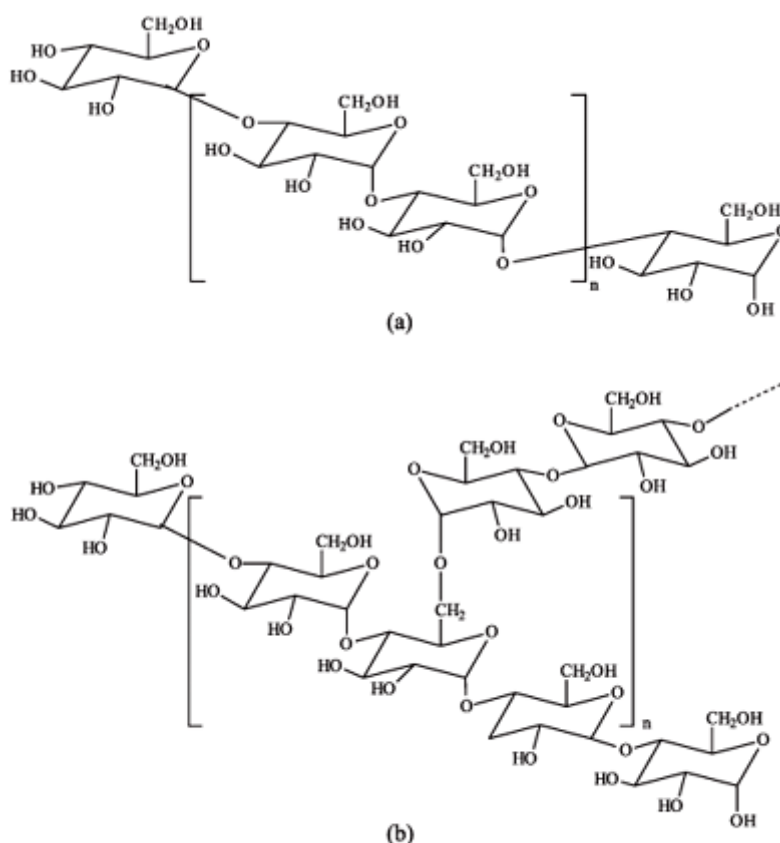


Figura 16: Regiões do amido (a) amilose e (b) amilopectina

Para emprego em um filme, o amido, deve sofrer a transição da fase amorfa, ou seja, seus grânulos devem ser desestruturados e posteriormente recristalizados de forma parcial. Esse fenômeno pode ocorrer por meio do evento conhecido como gelatinização (MIRANDA, V. R.; CARVALHO, 2011; SOUZA; ANDRADE, 2000).

A gelatinização consiste na transformação do amido granular em uma pasta viscoelástica e ocorre em ambientes aquosos. Durante o aquecimento de uma dispersão de amido, os grânulos incham até atingirem a temperatura na qual eles são rompidos, a chamada “temperatura de gelatinização”, e assim tem sua ordem molecular destruída, alterando suas propriedades de forma irreversível (SOUZA; ANDRADE, 2000). Todavia, quanto maior for a proporção de água, maior será a temperatura em que esse fenômeno ocorre. Em condições favoráveis, as moléculas gelatinizadas podem sofrer reassociações por meio de interações intermoleculares, sobretudo a ligação de hidrogênio, possibilitando a formação de uma estrutura teoricamente mais cristalina. Esse fenômeno é conhecido como retrogradação está

relacionado ao fenômeno que leva ao envelhecimento dos filmes de amido, tornando-os mais quebradiços e rígidos (MALI; GROSSMANN; YAMASHITA, 2010).

Para evitar esse processo, comumente se adicionam aditivos que evitam o processo de retrogradação e permitindo que o amido mantenha suas propriedades de gel. Nesse sentido, um aditivo primordial na síntese de filmes são os ditos plastificantes, que tornam o produto obtido (filme) menos quebradiço e com melhores propriedades físicas.

Para esse fim, geralmente são empregados polióis dos quais são comumente empregados: glicerol, sorbitol, xilitol, frutose, sacarose ou polietilenoglicol na produção de filmes biodegradáveis. O glicerol tem aparecido nos trabalhos como um plastificante efetivo devido a sua menor massa molecular, maior hidrofiliçidade, disponibilidade e preço, gerando filmes com elevada flexibilidade (SUEIRO; FARIA-TISCHER; LONNI C E SUZANA MALI, 2016).

A literatura aponta que o mecanismo de ação dos plastificantes é o rompimento das interações do próprio polímero, no caso do amido, causando aumento nos espaços intermoleculares, aumentando a mobilidade e gerando uma diminuição dos interstícios, resultando materiais com menores temperaturas de transição vítrea. A temperatura de transição vítrea trata-se da temperatura em que o material passa do estado de menor mobilidade molecular e maior rigidez para o estado em que há maior mobilidade molecular (MALI *et al.* 2010).

Essas estratégias, de adição de diferentes substâncias, para reforço ou como agente plastificante dizem muito a respeito das propriedades gerais dos filmes que empregam biomoléculas, já que os biopolímeros empregados para a produção desses materiais comumente apresentam propriedades mecânicas e de barreira inferiores aos polímeros sintéticos à base de petróleo. Nos últimos anos tem se explorado, portanto, diversos compósitos e blendas que possam superar essa problemática (SÁ, 2020).

A aplicação da celulose em filmes biodegradáveis e filmes biodegradáveis ativos vem sendo explorada de diversas formas nos últimos anos. Os estudos voltados à área de alimentos demonstram que este tipo de tecnologia pode apresentar a possibilidade de criação de novos produtos e embalagens (ALMEIDA *et al.*, 2015).

Filmes com a adição de nanocelulose consistem em compósitos opticamente de baixa opacidade, com um coeficiente de dilatação térmica mais baixo em relação a aditivos inorgânicos que não são tão disponíveis. Além disso, as películas formadas com NFC resultam em composições que podem ser facilmente dobráveis e biodegradáveis o que as potencializa como excelentes materiais de reforço (MARTOÏA *et al.*, 2016; SILVEIRA *et al.*, 2020).

A utilização de NFC obtida por hidrólise enzimática como agente de reforço para filmes biodegradáveis na substituição de embalagens comerciais não é uma novidade por si só, o estudo realizado por PELISSARI *et al.*, (2017) evidenciou essa possibilidade, aplicando hidrólise enzimática para produção de nanofibras de celulose. Por outro lado as abordagens que empregam torta de oliveira como fonte de celulose utilizam hidrólise ácida na sua produção.

Além dos aditivos que promovem a melhora nas propriedades físicas dos filmes, como é o caso das nanofibras, outra vertente explora a interação do filme/embalagem com o alimento, trata-se das embalagens ativas. Segundo AZEREDO *et al.* (2000) uma embalagem ativa pode alterar positivamente a vida de prateleira de alimentos de diferentes apresentações, tais como, a atmosfera modificada mantida por equilíbrios dinâmicos entre a respiração e permeação do alimento. Outra forma seria o emprego de sistemas que capturem gás oxigênio, impedindo reações de oxidação, proliferação de microorganismos aeróbios, para tal finalidade o autor sugere que essa redução da oxidação pode se dar pela aplicação de sistemas enzimáticos, fotoquímicos, químicos, liberação de aditivos, dentre outros.

Dessa forma torna-se um desafio explorar as características de materiais de reforço naturais que melhorem as propriedades de biomoléculas já empregadas como filmes substitutos a plásticos, como é o caso do amido, pois à medida que os filmes biodegradáveis se aproximam, em termos de propriedades, dos plásticos, maior serão as suas empregabilidades e menor será a justificativa para continuarmos explorando os plásticos sintéticos oriundos do petróleo e seus derivados que tanto comprometem o meio ambiente quando mal descartados.

#### **4. Justificativa**

Como apontado no referencial, poucos são os trabalhos que empregam enzimas (livres ou imobilizadas) na hidrólise de materiais lignocelulósicos para a produção de nanofibras e posterior uso em filmes biodegradáveis. As hidrólises ácidas da maioria dos trabalhos encontrados, além de usar solventes agressivos ao meio ambiente, necessitam de quantidades excessivas de água para realizar a lavagem/neutralização dos materiais obtidos. Apesar de terem potencial para diminuir o uso de plásticos obtidos a partir do petróleo, ainda se distanciam da proposta em prol do meio ambiente ao empregar grande quantidade de ácidos e água, o que pode inviabilizar a produção em larga escala.

Na tentativa de contrapor esse cenário, essa pesquisa destinou-se a diminuir o emprego de tais substâncias (ácidos, principalmente), substituindo-as por enzimas hemicelulases e celulases, que a princípio apresentam especificidade elevada, trazendo processos de elevado rendimento, revertendo ou diminuindo o uso de outras substâncias.

Dessa forma podemos supor que esse projeto possui caráter de contribuir com o meio ambiente de três formas: na substituição de plásticos para embalagens de alimentos, na redução de descarte inapropriado do processo de produção de azeite e na diminuição de substâncias que demandam altas quantidades de água.

## 5. Material e Métodos

### 5.1 Matéria-prima

Foi utilizado para o desenvolvimento das nanofibras o resíduo agrícola do processamento do azeite de oliva fornecidos pela empresa Olivas do Sul localizada na cidade de Cachoeira do Sul – RS. A amostra foi mantida congelada em freezer doméstico (-18°C) até o momento do uso. Durante o descongelamento foi separado o líquido (alperujo) da parte sólida por peneiração. A porção sólida foi seca em estufa com circulação de ar forçada a 60°C por 24h, processada em moinho de facas para obtenção de uma farinha peneirada em malha 20 mesh, embalada a vácuo e armazenada em freezer até seu uso e posterior caracterização. O panorama geral do projeto pode ser conferido no fluxograma na figura 17.

### 5.2. Caracterização da Matéria-prima



Figura 17: Fluxograma de tratamento inicial da amostra

A composição da farinha foi verificada conforme métodos da AOAC (2005), onde foram analisados teores de umidade, proteína, lipídeos totais, cinzas e fibras totais. Além disso, a farinha foi caracterizada quanto aos seguintes parâmetros:

### **5.2.1. Teor de extrativos totais**

O teor de extrativos totais foi obtido conforme o método gravimétrico descrito por FORNARI JUNIOR *et al.* (2016) com devidas adaptações. Foi adicionado a amostra o solvente orgânico polar (etanol) na proporção de 0,025. O conjunto foi acondicionado em um erlenmeyer e tapado com um vidro de relógio fixado com papel filme. O material foi acondicionado em agitador mecânico com velocidade de 100 rpm por 24 horas em temperatura ambiente, após, foi filtrado com o auxílio do papel filtro, lavado exaustivamente, a amostra foi seca em temperatura ambiente ainda no funil e posteriormente levada a estufa à 110°C até peso constante. As medidas gravimétricas foram aferidas em balança analítica por diferença do peso inicial e final

### **5.2.2. Teor de celulose**

O teor de celulose foi estimado de acordo com a metodologia descrita por TIBOLLA (2014a) com adaptações segundo a qual pesou-se 1 grama da amostra seca e livre de extrativos totais, adicionou-se 20 mL de ácido acético 80% e 2 mL de ácido nítrico 70%. Essa mistura foi mantida em banho aquecido por 20 minutos a 110°C. Utilizou-se a mesma fonte de aquecimento do Kjehldal como mostra a FIGURA 18. Após decorrido o tempo de aquecimento, foi efetuado o resfriamento em banho de gelo. Adicionou-se cerca de 60 mL de água destilada e filtrou-se a vácuo o material, o sólido foi lavado até a neutralidade com água e etanol com a finalidade de remover o ácido nítrico e os produtos gerados durante a reação, após a neutralização, a amostra então foi transferida para uma placa tarada e o sistema foi submetido a secagem em estufa por 24h a 70°C, até peso constante. A massa de celulose foi calculada de acordo com a Eq.2:



$$\%celulose = \frac{MPA - MP}{MA} \times 100 \quad (\text{Eq. 2})$$

Onde: MPA: massa da placa com amostra; MP: massa da placa e MA: massa da amostra.



Figura 18: Digestão ácida da torta de oliveira para determinação do teor de celulose

### 5.2.3. Teor de lignina e hemicelulose

Para determinar o teor dessas macromoléculas utilizou-se a metodologia descrita por TIBOLLA (2014a) com devidas adaptações. A amostra 0,3 gramas livre de extrativos junto a 3 mL de ácido sulfúrico 72% foram incubados a 30°C por 1h. O ácido foi então diluído com água deionizada (84 mL) e o sistema foi submetido a autoclavagem a 121°C por 1 hora.

O teor de lignina insolúvel em ácido foi determinado a partir da filtração a vácuo. Os sólidos foram lavados com 50 mL de água deionizada e por fim, o sólido foi seco em estufa até o peso constante.

A amostra foi calcinada para efetuar a quantificação de impurezas minerais de acordo com a metodologia AOAC 2005. Sendo o teor de lignina calculado pela Eq.3:

$$\%lig = \frac{MP - MFA - MC}{MI} \times 100 \quad (\text{eq. 3})$$

Onde: MP: massa da placa; MFA: massa final da amostra; MC: massa de cinzas e MI: massa inicial.

O filtrado da análise de lignina insolúvel correspondeu à lignina solúvel, sendo a análise realizada em espectrofotômetro UV/VIS no comprimento de onda de 240nm. O teor dessa macromolécula foi determinado pela Eq.4:

$$\%ligs = \frac{abs.vf.FD}{a.MI} \times 100 \quad (\text{eq. 4})$$

Onde: %ligs é o teor de lignina solúvel; abs: absorvância; vf: volume do filtrado; FD: fator de diluição; a absorvidade molar e MI: massa inicial.

A absorvidade molar utilizada foi = 25 considerando os comprimentos de onda de 240 nm (SLUITER *et al.*, 2008).

O teor de hemicelulose foi calculado por diferença dos teores encontrados de celulose, ligninas e cinzas.

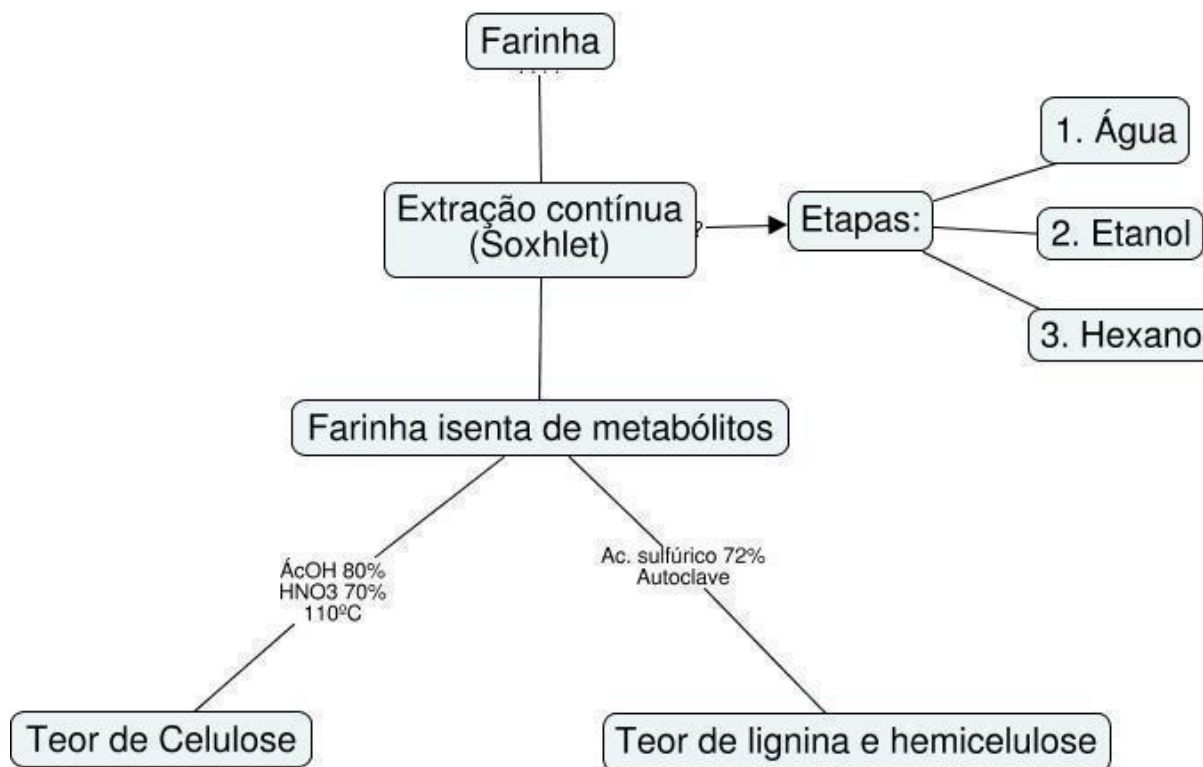


Figura 19: Fluxograma para as análises de extrativos, celulose e hemicelulose

### 5.3. Análise dos grupos funcionais

A análise dos grupos funcionais presentes no resíduo foi realizada em espectrofotômetro de absorção no Infravermelho com janela espectral de 400 a 4000  $\text{cm}^{-1}$ , sendo aplicado o modo de atenuação da transmitância da radiação incidida, dessa forma serão comparados os grupos funcionais antes e após as hidrólises e relacionando com os teores de celulose, hemicelulose e lignina encontrados.

### 5.4. Análise da microestrutura

A análise da microestrutura da farinha da torta de oliveira foi efetuada a partir de microscopia eletrônica de varredura (MEV), realizadas junto ao Centro de Microscopia Eletrônica (CME) da UFRGS. As amostras foram colocadas em suportes de alumínio e cobertas com uma camada de 92 Å de ouro para melhorar a sua condutividade, sob voltagem de aceleração de 10 kV.

## 5.5. Obtenção das nanofibras

### 5.5.1. Hidrólise Enzimática

Para essa metodologia foram seguidos os passos propostos por TIBOLLA et al (2014):

Anteriormente ao processo de hidrólise enzimática, foi efetuado o tratamento alcalino com hidróxido de potássio 5 % m/v por 14h (Figura 20), respeitando a proporção de bagaço e solução de KOH (1:20). Esse procedimento visou atacar as frações de lignina da fibra vegetal.

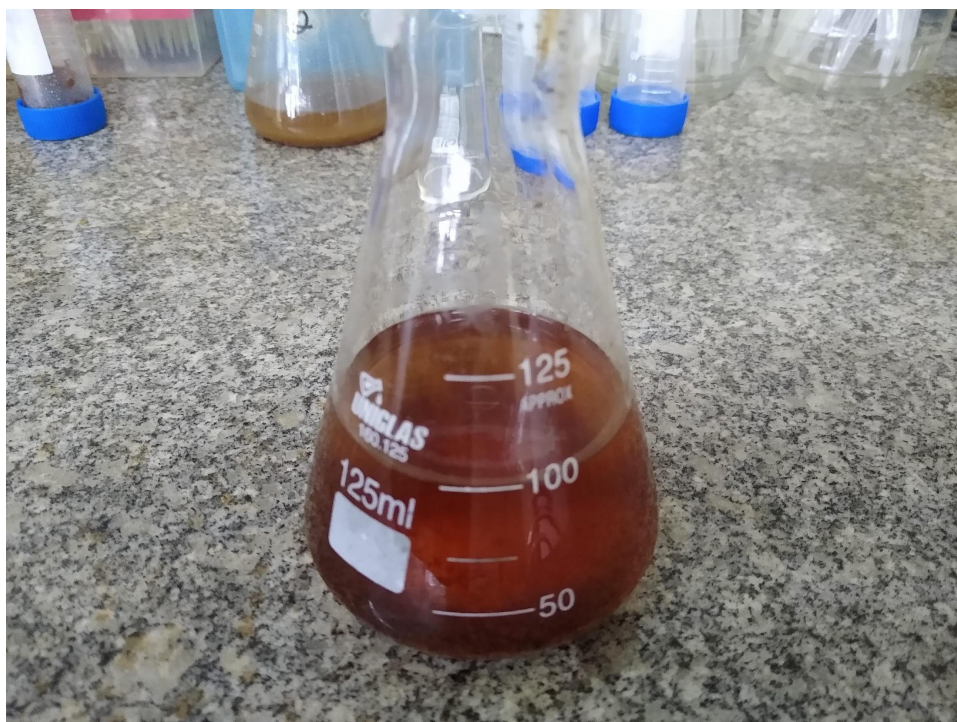


Figura 20: Erlenmeyer contendo a amostra em KOH 5% após as 24 horas de reação (pré-tratamento alcalino)

Antes de dar início à hidrólise enzimática, e após o pré-tratamento, foi esquematizada uma lavagem com água deionizada dividida em 10 etapas, com a finalidade de neutralizar o teor de base empregado no pré-tratamento alcalino, para isso foram utilizados ciclos de centrifugação de 15 minutos a 3000 g na temperatura de 5°C.

O licor obtido pela lavagem da amostra alcalina foi diluído e suas absorbâncias lidas no espectrofotômetro para comparação do teor de lignina.

Na sequência, esses materiais foram submetidos à primeira hidrólise enzimática na presença da enzima hemicelulase comercial nas condições ideais da enzima (pH e temperatura, cujos resultados estão dispostos nas Figuras 21 e 22).

A atividade do complexo de enzimas hemicelulolíticas foi baseada na metodologia proposta por GHOSE e BISARIA (1986) para tal foi elaborada uma curva de calibração dos açúcares presentes na hemicelulose (xilose) e na celulose (glicose) (APÊNDICE 9.1). O substrato foi xilana de sabugo de milho (0,9 mL na concentração de 0,5%) e papel filtro (50 mg), nesses substratos ocorreu a adição de 0,1 mL de preparado enzimático filtrado. Todas soluções foram feitas em meio tampão acetato 0,05 M. As reações ocorreram por 10 min na temperatura de 50°C. A reação foi parada com a adição de 1mL de ácido 3,5-dinitrosalisílico e colocada em banho-maria a 100°C por 15 minutos e posteriormente resfriada. Os açúcares redutores foram quantificados pelo método proposto por Miller (1959) e a leitura foi feita em espectrofotômetro em 540 nm.

A partir das reações de hidrólise enzimática dos substratos xilana de sabugo de milho e celulose na forma de papel filtro e do uso das enzimas hemicelulases e celulases, a atividade calculada experimentalmente do preparo enzimático foi de 160 U/g e 2,5 FPU/g. Para hemicelulases 1 U é a atividade padrão que hidrolisa a xilana promovendo a formação de 1 micromole de xilose equivalente.

Além da medição da atividade foram estabelecidas as condições ótimas para o emprego da enzima em relação à atividade de hemicelulase. As condições ideais são importantes para conhecer o comportamento da enzima e maximizar a eficiência do processo de hidrólise hemicelulolítica.

Foi testado o comportamento nos pHs 4, 5, 6 e 7. Para o pH (FIG. 21), a faixa escolhida está relacionada com as especificações encontradas na literatura e com o indicado por GHOSE (1986), o gráfico obtido indica que o pH 5 é de fato o mais indicado para a condução da hidrólise, conforme o autor citado a enzima apresenta condição ideal de trabalho no pH 4,8.

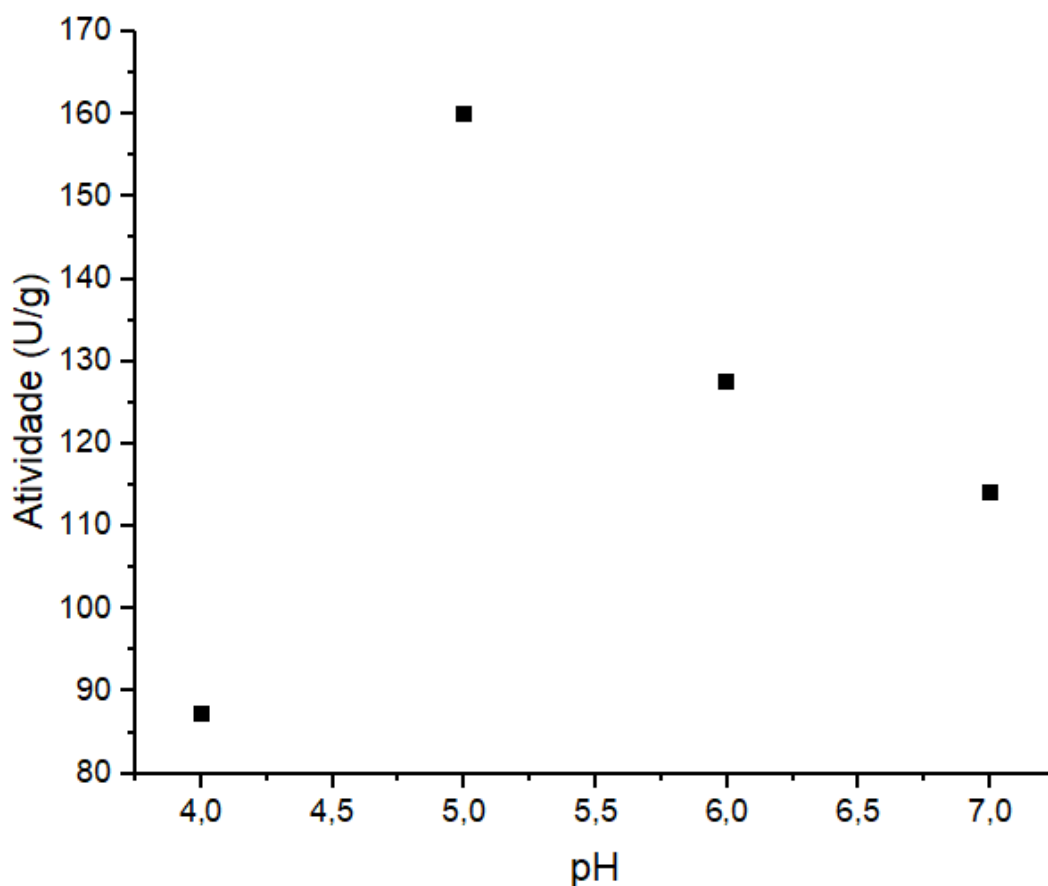


Figura 21: Gráfico do ensaio de condição ótima de pH do preparo enzimático utilizado

Para a determinação da temperatura ideal (Figura 22), o experimento foi conduzido em pH 5, em solução tampão acetato (0,05 M). O comportamento observado indicou que a temperatura de 50°C é favorável para o processo, dentre os pontos analisados. Alguns artigos que empregam hemicelulases comerciais citam uma faixa de trabalho que varia de 50°C a 65°C, porém nossos ensaios preliminares verificaram que a partir de 60°C esse preparo perdia sua atividade em proporção logarítmica e nessas condições a partir de 73°C a atividade da enzima tende a zero, porém para parar a reação optamos em trabalhar com a temperatura de 90°C para garantir a desnaturação de todo complexo enzimático.

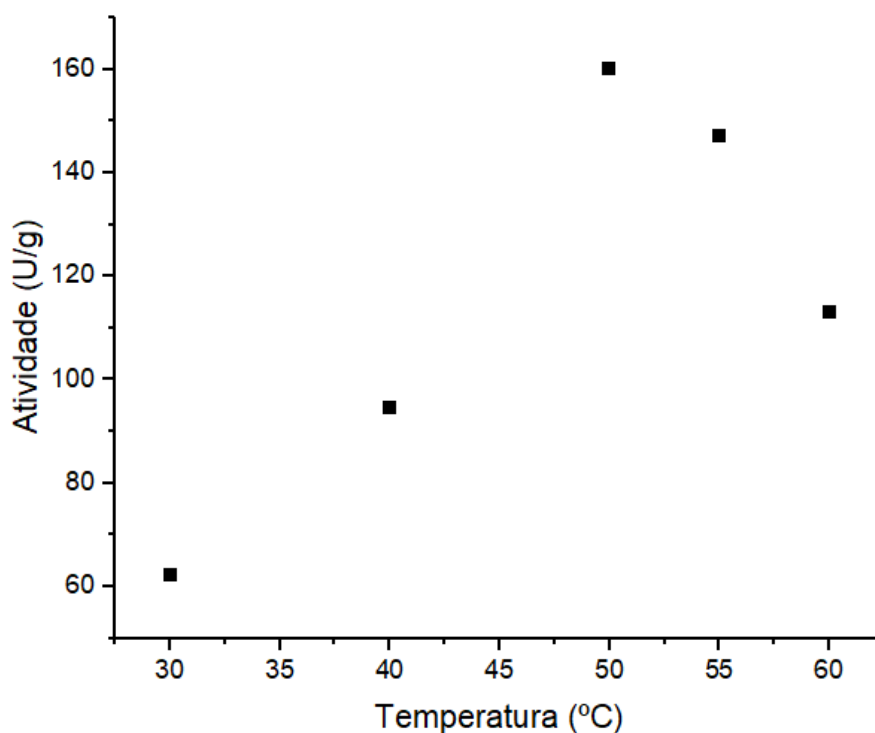


Figura 22: Gráfico do ensaio de condição ótima de temperatura do preparo enzimático utilizado

Após a determinação da atividade, e condições ideais, efetuou-se a hidrólise enzimática da amostra livre de extrativos, desengordurada e deslignificada.

Os materiais obtidos a partir da hidrólise enzimática da matriz foram liofilizados e analisadas física e quimicamente. Para isso, foram efetuados os testes de análise de grupos funcionais com espectroscopia de infravermelho, comportamento térmico e microestrutura e cristalinidade no RX com a finalidade de interpretar se as reações químicas (hidrólises) modificaram de forma significativa a estrutura do material obtido.

## 5.6. Aplicação das nanofibras obtidas

### 5.6.1. Produção de filmes e preparação dos suportes

Os filmes foram preparados segundo a metodologia proposta por Soares (1998), sendo a técnica utilizada a tipo *casting*.

A solução filmogênica foi obtida dissolvendo-se 4 gramas de amido em água destilada sob aquecimento até completa gelatinização (80°C por 30 min) em conjunto das nanofibras de celulose e da adição de glicerol. Todos os componentes foram homogeneizados, e posteriormente, levados para banho ultrassônico por 15 minutos para remoção das bolhas formadas durante o processo. A concentração de plastificante está de acordo com a encontrada na literatura (MALHERBI *et al.*, 2019; PAGNO *et al.*, 2015; TIBOLLA, H. *et al.*, 2019). A suspensão filmogênica foi vertida em placas de acrílico e levadas à secagem em atmosfera controlada para impedir contaminações.

Quadro 3: Composição dos filmes de amido produzidos

Filmes	%		
	Amido	NFC	Plastificante
Controle negativo	100	0	0,25
Amostras contendo NFC	99,5	0,5	0,25
	99	1	0,25
	97,5	2,5	0,25
	95	5	0,25

## 5.7. Caracterização dos filmes

### 5.7.1. Propriedades mecânicas

Os filmes foram cortados em tiras de 100mm de comprimento de 10 mm de largura e a espessura dos corpos de prova foi determinada a partir de cinco medições em regiões aleatórias empregando micrômetro digital (DIGIMESS -



precisão de 0,001mm, resolução 00mm ~ 25mm. Os ensaios de tração foram efetuados no texturômetro (TA.XT2i) com carga de 5kg (ASTM D882-09) (ASSIS *et al.*, 2018; PAGNO *et al.*, 2015).

### 5.7.2. Solubilidade em água

A solubilidade foi calculada empregando a metodologia proposta por GONTARD *et al.* (1992). Para tal, três discos de cada filme com diâmetro de 20 mm foram alocados em dessecador contendo sílica por 48 horas. Essas amostras foram pesadas para obtenção do peso seco inicial e posteriormente imersas em solução aquosa de cloreto de sódio 0,02% m/v a 25°C por 24 horas. Após esse intervalo de tempo foi realizada uma operação de filtração e a matéria insolúvel foi seca em estufa, o material resultante foi novamente pesado para a constituição do peso seco final.

### 5.7.3. Permeabilidade ao vapor de água

Essa metodologia foi baseada no trabalho de PAGNO (2014) com modificações, para tal as células de permeação (63 mm de diâmetro; 25 mm de altura) foram preenchidas com sílica gel e seladas com a amostra. Esses sistemas foram alocados em câmaras de vidro contendo solução saturada de cloreto de sódio 75% m/v a 25°C. A permeabilidade foi mensurada gravimetricamente empregando balança analítica (AY 220, Shimadzu). O resultado desse teste foi obtido de acordo com a eq. 5:

$$wvp = \frac{w.L}{A.t.\Delta p} \quad (\text{eq. 5})$$

Onde: w: é a massa da água permeada; L: é a largura do filme; A: é a área total do filme e  $\Delta p$ : a diferença entre a pressão de vapor interna e externa.

#### 5.7.4. Opacidade

A transmissão de luz foi aferida utilizando espectrofotômetro (UV 1800 - Shimadzu) nos comprimentos de onda de 210 nm e 500 nm, abrangendo, portanto, o UV e o visível e de acordo com ASSIS *et al.*, (2018). A montagem desse experimento foi feita cortando os filmes em retângulos do tamanho de cubetas (1 cm de largura) e fazendo as leituras diretamente no equipamento.

#### 5.7.5. Análise termogravimétrica

A estabilidade térmica foi realizada utilizando um aparelho TGA, para isso amostras de aproximadamente 5 mg foram aquecidas de 25°C a 800°C a 10°C/min. A estabilidade foi aferida pela perda de peso em função da temperatura conforme (PAGNO *et al.*, 2015).

#### 5.7.6. Biodegradabilidade

A análise de biodegradabilidade dos filmes produzidos foi realizada de acordo com a metodologia descrita por ASSIS *et al.*, (2018), para isso os filmes foram cortados em retângulos, secos em estufa a 60°C até peso constante, após esses filmes foram acomodados entre malhas de alumínio e esse conjunto introduzido em caixas plásticas contendo solo orgânico natural com pH próximo a neutralidade, com 4 cm de profundidade. Após 15 dias, a amostra deve ser retirada do solo, lavada, submetida à secagem em estufa novamente até o peso constante. A biodegradabilidade foi calculada conforme a eq. 7:

$$WL(\%) = \frac{m_t - m_0}{m_0} \times 100 \quad \text{eq.7}$$

Onde: WL é a perda de massa dos filmes (relacionada com a biodegradabilidade);  $m_t$  é a massa seca e  $m_0$  é a massa inicial.

Os gráficos apresentados nos resultados foram plotados no software Origin e as diferenças estatísticas, quando apresentadas, foram calculadas no software Statistical Analysis System (SAS) utilizando teste Tukey com nível de confiança de 95% ( $p < 0,05$ ).

## 6. Resultados

### 6.1. Caracterização da matéria-prima

Quadro 4: Resultado da análise centesimal, de fibras lignocelulósicas e de extrativos totais

Parâmetro	Autores citados	Encontrado no presente estudo
<b>Umidade</b> Albuquerque et al. 2004	72%	8,73±0,01%
<b>Cinzas</b> Medeiros et al. 2016 Leite et al. 2016 Fernandes et al 2016	3 – 4,5%	4,65±0,14
<b>Gorduras</b> Alhamad et al. 2017	13%	26,10±0,02
<b>Proteínas</b> Chiofalo et al. 2004 Albuquerque et al. 2004	3,28-7%	0,26±0,02
<b>Celulose</b> Fernandes et al. 2016	22,9%	19,74±3,55
<b>Hemicelulose</b> Leite et al. 2016 Ribeiro et al. 2020	11-24%	29,71±3,91
<b>Lignina</b> Leite et al. 2016	>40%	45,9±1,65
<b>Extrativos</b> Doménech et al 2021	42%	40,22±0,58

#### 6.1.1. Análise centesimal

Para a umidade o valor experimental obtido no presente estudo está de acordo com a RDC nº 263 de 2005 que normatiza o teor máximo aceitável de umidade de até 15% em farinhas/farelos.

Para as cinzas, a quantidade de minerais nos alimentos é muito variável pois depende de fatores extrínsecos, principalmente edafoclimáticos. As reduções de

íons em relação ao referencial, podem estar relacionadas a solubilidade em água ou aos processos os quais o material foi submetido (ORDONEZ, 2005).

O teor de lipídeos encontrado foi superior ao relatado por outros autores, no entanto a origem do bagaço interfere nesse parâmetro bromatológico, visto que diferentes métodos de extração e diferentes cultivares culminam em teores diferentes de lipídeos no subproduto.

### **6.1.2. Análise de fibras lignocelulósicas e extrativos totais**

O teor determinado de celulose (19,74%) é próximo do relatado por FERNANDES, M. C. *et al.*, (2016) que apontam 22,9% dessa macromolécula no resíduo analisado. Outros autores LEITE *et al.*, (2016); MIRANDA, I. *et al.*, (2019) e RIBEIRO *et al.*, (2020) apontam teores inferiores aos encontrados no presente estudo para essa biomolécula. O conhecimento do teor de celulose é importante para a determinação do rendimento das reações de hidrólise.

O valor experimental para a quantidade de hemicelulose é superior ao relatado por alguns trabalhos na literatura. DOMÉNECH *et al.*, (2021) indicam teores de hemicelulose entre 11,7% e 12,4%, já FERNANDES, M. C. *et al.*, (2016); LEITE *et al.*, (2016) e MIRANDA, I. *et al.*, (2019) apontam valores entre 22 e 24% de hemicelulose na torta de oliveira, teores mais próximos ao encontrado em nosso trabalho.

A lignina trata-se da biomolécula que deve ser extraída no processo de pré-tratamento por emprego de álcali, uma vez que ela envolve as fibrilas de celulose, dessa forma sua remoção facilita o ataque promovido pelas enzimas do complexo celulolítico. Segundo LEITE *et al.*, (2016) essa substância encontra-se em teores de quase 42% na torta de oliveira. A partir dos nossos dados experimentais, a lignina apresentou um teor mais elevado em relação aos trabalhos consultados.

O teor de extrativos totais encontrado na amostra foi de  $40,22 \pm 2,48\%$  ( $n=3$ ), estando esse resultado de acordo com (DOMÉNECH *et al.*, 2021) que abordam no seu estudo que a torta de oliveira apresenta  $42 \pm 1,2\%$  de extrativos totais.

## 6.2. Hidrólise alcalina e enzimática

Após 14h de hidrólise alcalina, o licor resultante da primeira lavagem (primeiro béquer da esquerda para a direita na figura 23) foi devidamente diluído e lido em espectrofotômetro de absorção molecular.



Figura 23: Licores obtidos após a lavagem do material pré-tratado por hidrólise alcalina

A análise do espectro de varredura no UV-Vis (Figura 24) permitiu a conclusão de que havia no licor um teor considerável de lignina dissolvida, visto que a absorbância máxima da solução se deu próxima a 240 nm, similar ao comportamento demonstrado por NACARID (2009) e colaboradores corroborando ao fato de que o emprego da base (KOH 5%) contribuiu no processo de deslignificação e de remoção dos produtos fenólicos presentes na amostra.

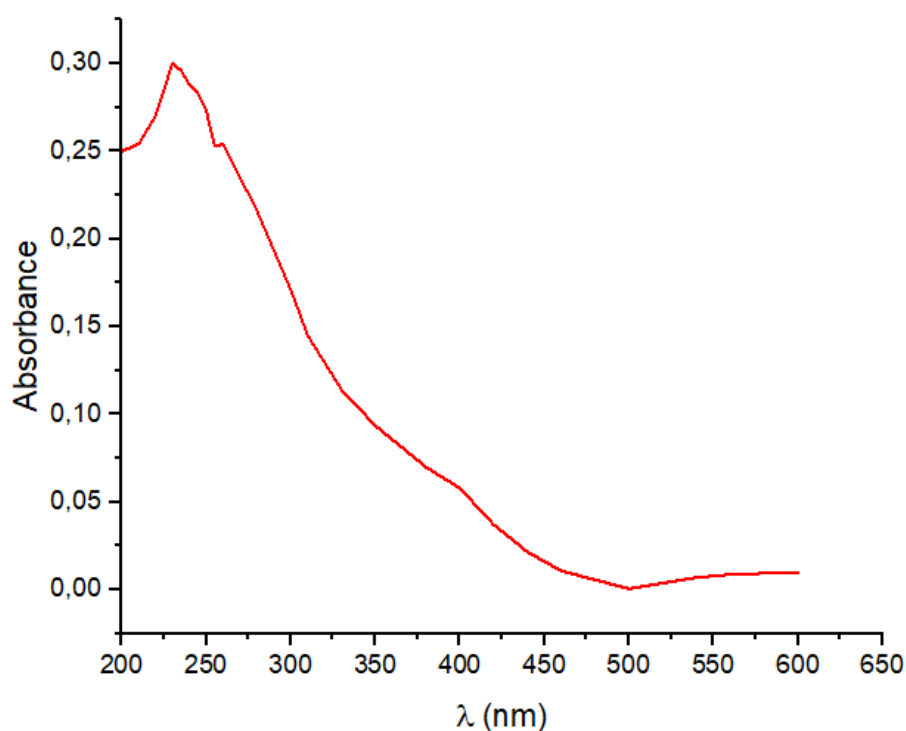


Figura 24: Espectro de varredura da lignina presente no licor obtido após as lavagens

Após a determinação da atividade de hemicelulase e celulase, confirmação das condições ideais, as quantidades de enzimas foram dissolvidas em tampão acetato ( $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$ ), onde obteve-se uma solução com atividade hemicelulolítica de  $3 \text{ U/mL}$ , sendo o volume total de tampão em cada erlenmeyer de  $50 \text{ mL}$  onde foi realizada a hidrólise do material desengordurado, livre de extrativos e deslignificado. O material obtido após a hidrólise foi centrifugado (Figura 25, à direita) e liofilizado para posteriores análises, comparação com a fibra bruta e aplicação nos filmes.



Figura 25: comparativo entre amostra bruta (esquerda), pré-tratada com KOH (centro) e hidrolisada (direita)

## **6.6. Caracterização da farinha e das nanofibras**

### **6.6.1. Análise termogravimétrica**

A análise termogravimétrica é uma importante ferramenta analítica que relaciona a perda de massa durante o aquecimento controlado em função do tempo. Dessa forma podemos verificar a estabilidade de um material e relacionar com a composição do mesmo. A amostra livre de extrativos e desengordurada apresentou uma perda de massa expressiva em 239°C (dentro da faixa de degradação térmica da hemicelulose), além disso a amostra teve outras perdas em temperaturas maiores, possivelmente decomposição da celulose e ligninas. Esse mesmo comportamento vai ao encontro da análise termogravimétrica realizada por outros autores tais como SAHU & GUPTA (2017) que citam a estabilidade térmica de compósitos híbridos contendo nanocristais de celulose de sisal.



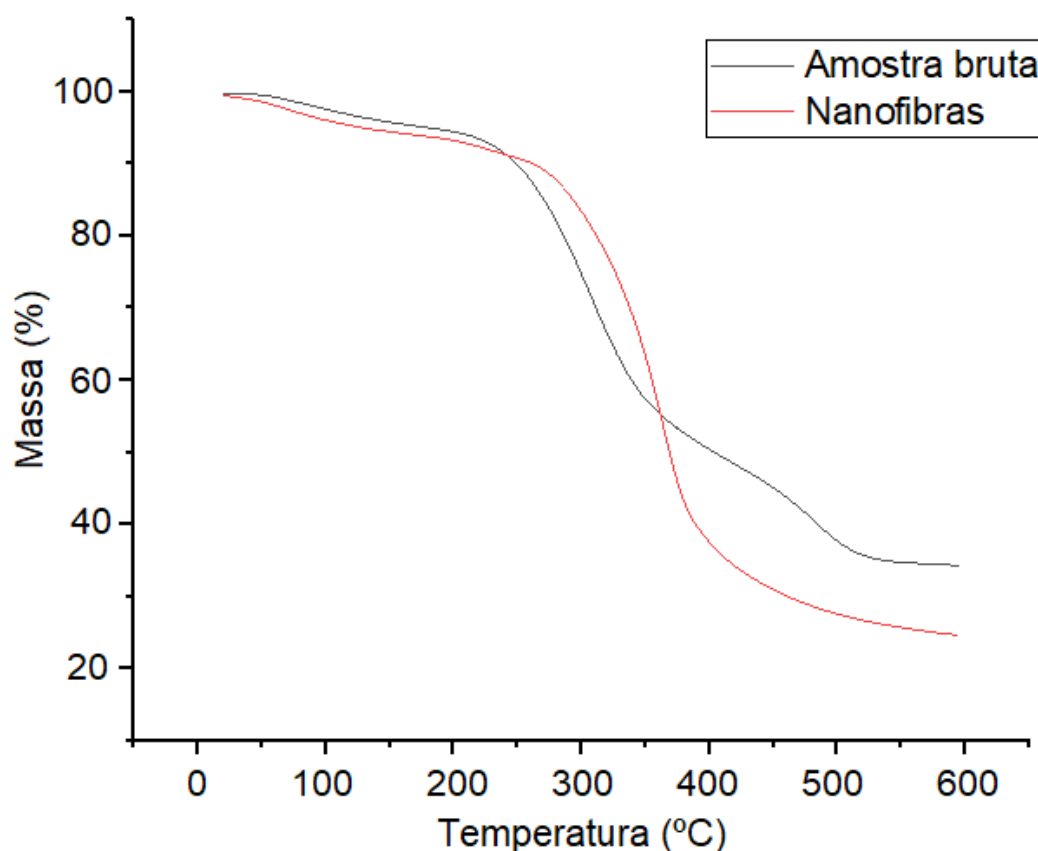


Figura 26: TGA da amostra bruta (em preto) e amostra hidrolisada que corresponde às NFC (em vermelho)

No entanto, ao analisarmos a figura acima, nota-se que a amostra que sofreu hidrólise com hemicelulase apresentou 59,33% de degradação a 286°C. Segundo o referencial adotado, a celulose sofre degradação térmica na faixa entre 240-350°C; ORRABALIS *et al.*, (2020) relataram perda expressiva de massa nas amostras de NFC de cactus a partir de 290°C, segundo os autores citados, o aumento da cristalinidade faz com que nanofibras possam perder a estabilidade térmica em faixas de temperatura mais elevadas que a hemicelulose (290°C a 375°C). Dessa forma os resultados obtidos para esse parâmetro estão de acordo com essas inferências.

A análise de DTG apresentada na FIG. 29 permite a corroboração desses apontamentos visto que a amostra bruta apresenta dois eventos de perda

significativa e a amostra tratada com as enzimas hemicelulases apresentou praticamente um evento demonstrando perda na faixa de degradação térmica da celulose. A concentração de celulose cristalina é apontada na literatura como a causa desse comportamento. No trabalho descrito por HUANG *et al.* (2016) as nanofibras de celulose demonstram um comportamento térmico similar aos do presente estudo (com temperaturas de degradação acima de 300°C). Para esses autores na presença de impurezas ou quando são funcionalizadas pela ação de algum reagente, as nanofibras apresentam reduzida resistência térmica. Alguns autores relatam que na hidrólise da celulose com ácido sulfúrico, ocorre reação de sulfonação em hidroxilas, impactando nessa propriedade.

O comportamento encontrado no gráfico de degradação térmica também foi observado por SHARMA *et al.* (2018) que compararam a degradação térmica de fibras de celulose obtidas por hidrólise alcalina de resíduos de arroz, celulose e nanofibras de celulose ponderando que as nanofibras obtiveram melhor resistência térmica aumentando de 260°C para 321°C.

Essa inferência é corroborada pela análise de DTG (Figura 27) dessas amostras.

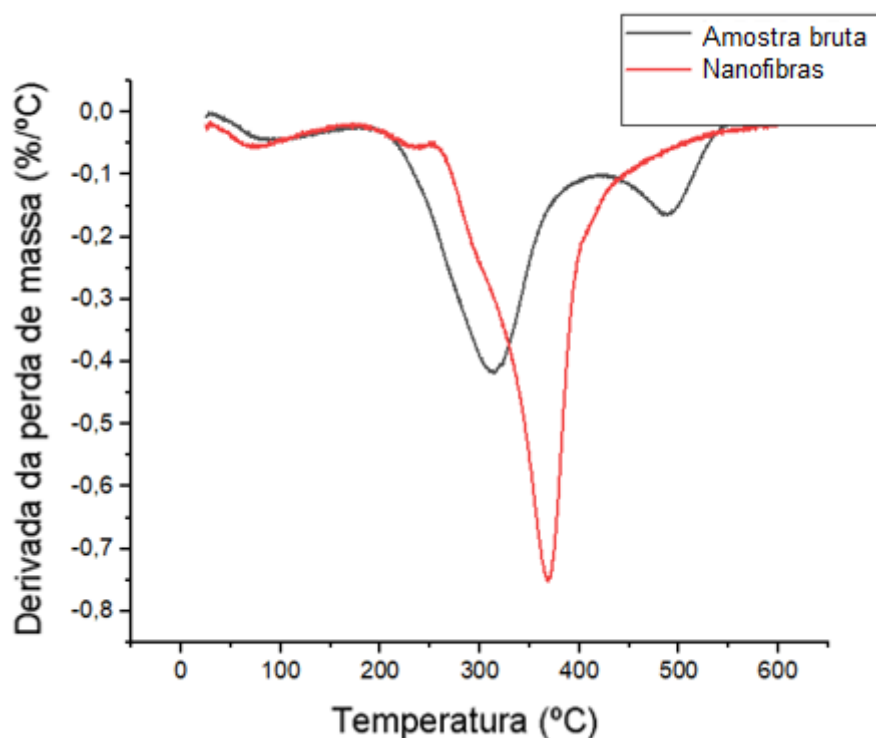


Figura 27: Curva de derivada primeira do TGA das amostra bruta (em preto) e da amostra hidrolisada que corresponde às NFC (em vermelho)

Como é mostrado na figura 29, a decomposição da celulose da amostra tratada com enzimas (em vermelho na figura 29) se dá em um único pico/evento visto que à medida que a temperatura aumenta, inicia o evento de degradação térmica em 298°C que segue aumentando continuamente atingindo um pico próximo a 375°C, tal comportamento é similar ao indicado por JIANG *et al.*, (2020); KRISTANTO; AZIS; PURWONO (2021).

### 6.6.2. Análise dos grupos funcionais por FTIR-ATR

A espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier é uma técnica analítica que possui várias aplicações no campo da química e engenharias. Essa técnica está relacionada com a absorção de energia infravermelha média nas frequências entre 400 e 4000  $\text{cm}^{-1}$ . Ao absorver essa energia, as ligações químicas vibram e como diferentes tipos de ligação apresentam diferentes entalpias de ligação, a partir da relação entre a transmitância (ou absorbância) é possível identificar qual é o grupo funcional presente na amostra. A incidência da radiação

infravermelha na amostra livre de extrativos pela técnica de FTIR-ATR (Figura 28) apresenta absorções máximas registradas nos números de onda  $3559\text{ cm}^{-1}$ ,  $2923\text{ cm}^{-1}$ ,  $2852\text{ cm}^{-1}$ ,  $1743\text{ cm}^{-1}$ ,  $1644\text{ cm}^{-1}$ ,  $1461\text{ cm}^{-1}$ ,  $1376\text{ cm}^{-1}$ ,  $1226\text{ cm}^{-1}$ ,  $1159\text{ cm}^{-1}$ ,  $1068\text{ cm}^{-1}$ ,  $860\text{ cm}^{-1}$ ,  $788\text{ cm}^{-1}$ ,  $755\text{ cm}^{-1}$ ,  $713\text{ cm}^{-1}$ . Segundo o referencial, as vibrações acima de  $3300\text{ cm}^{-1}$  referem-se ao estiramento das ligações OH, a baixa intensidade e o alargamento desse pico devem-se ao fato de que a amostra, mesmo desengordurada é uma matriz complexa em que os grupos OH encontram-se majoritariamente em interações de grande energia associada, tais como, dipolo-dipolo e ligação de hidrogênio (Liang *et al.*, 2013; PRASAD *et al.*, 2008), a complexidade do material fica ainda mais evidente quando se observa as absorções abaixo de  $1000\text{ cm}^{-1}$ , uma vez que muitas bandas apresentam-se sobrepostas.

É consenso na literatura que as absorções entre  $3000\text{ cm}^{-1}$  e  $2800\text{ cm}^{-1}$  são devido ao estiramento das ligações C-H (Sócrates, 2004). O pico próximo a  $1743\text{ cm}^{-1}$  é característico de carbonila presente na hemicelulose e lignina (XU, F. *et al.*, 2013). Diversos autores relatam a presença de um pico em formato de “V” devido a vibrações de deformação angular das ligações de moléculas de água adsorvidas na matriz (SALAM *et al.*, 2011) o que explica a absorção em  $1644\text{ cm}^{-1}$ . O pico em  $1461\text{ cm}^{-1}$  é atribuído às vibrações dos anéis siringila e guaiacila da lignina (DENCE; LIN, 1992). A vibração em torno de  $1376\text{ cm}^{-1}$  pode ser referente às ligações -C-CH<sub>3</sub> acopladas a grupos acetil (SALAM *et al.*, 2011) e o pico em torno de  $1226\text{ cm}^{-1}$  devido deformação angular de grupos acetil/éster de hemicelulose (COSTA *et al.*, 2017). As absorções entre  $1159\text{ cm}^{-1}$  e  $1068\text{ cm}^{-1}$  são características de vibrações de anéis de monossacarídeos (como a piranose) e vibrações de ligação glicosídica, já a absorção em  $860\text{ cm}^{-1}$  pode ser atribuída à deformação angular de ligações presentes em porções amorfas da celulose ou da própria hemicelulose (SOCRATES, 2001).

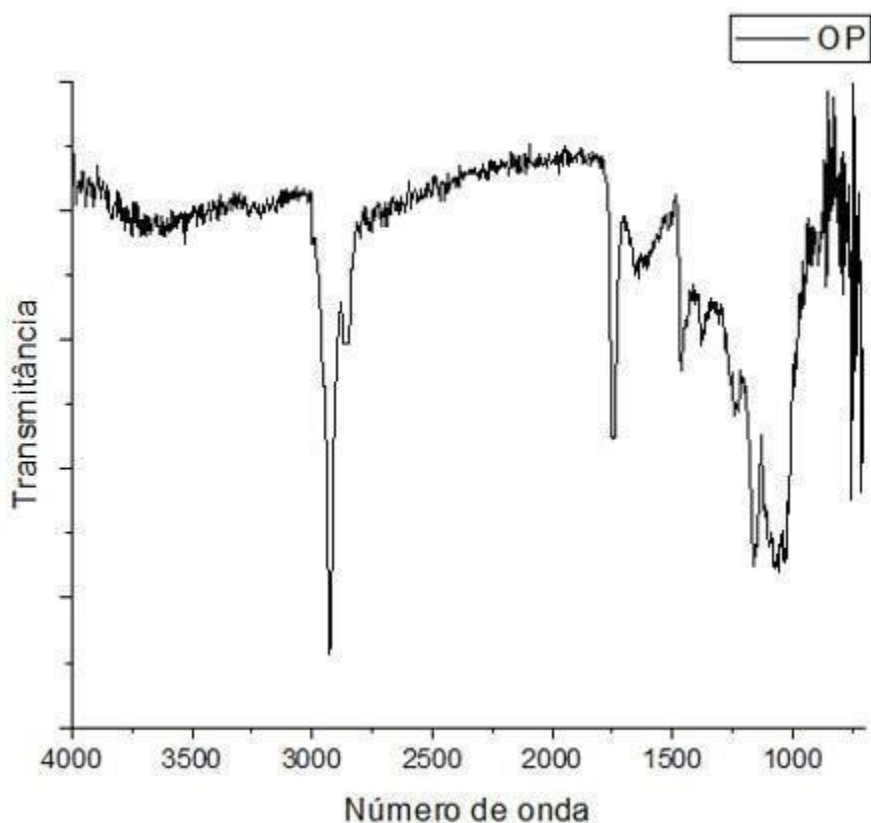


Figura 28: Espectro de FTIR-ATR da amostra bruta

Ao passo que, após a remoção de lignina e hidrólise promovida pelas hemicelulases, além das mudanças macroscópicas observadas (mudança de coloração e textura da suspensão) a análise do FTIR-ATR do produto obtido revela uma série de modificações na composição da matriz, de acordo com a figura 29, podemos constatar um aumento do sinal referente ao estiramento das ligações de grupamentos hidroxila em  $3343\text{ cm}^{-1}$ , a redução da frequência e o pico mais agudo podem indicar uma alteração ou redução das interações intermoleculares das fibras presentes. Outros autores Liang *et al.*, (2013) Meng *et al.* (2014) obtiveram um aumento desse sinal nas amostras de nanofibras.

A redução dos picos referentes ao estiramento das ligações C-H reduziu por causa da remoção de cadeias carbônicas dos componentes da hemicelulose e lignina (SILVESTRE *et al.* 2017).

Já o pico referente aos grupos carbonilados ( $1741\text{ cm}^{-1}$ ) diminuiu significativamente, corroborando que a remoção de fibras não celulósicas foi eficaz, visto que carbonilas podem ser encontradas tanto nos ácidos urônicos, quanto nos componentes das ligninas.

O aumento do pico entre  $1639\text{ cm}^{-1}$  e  $1641\text{ cm}^{-1}$  indica um aumento de água adsorvida que pode ser explicada pela interação devido à exposição das hidroxilas do produto obtido (FANG *et al.*, 2002; Meng *et al.*, 2014; SALAM *et al.*, 2011; TIAN *et al.*, 2017; TIBOLLA, Heloisa; PELISSARI; MENEGALLI, 2014a). Os picos entre  $1149\text{ cm}^{-1}$  e  $1035\text{ cm}^{-1}$  referem-se às deformações no plano das ligações (C-O-C) e do anel piranose presente nos monômeros glicose (SOCRATES, 2001; WU *et al.*, 2014).

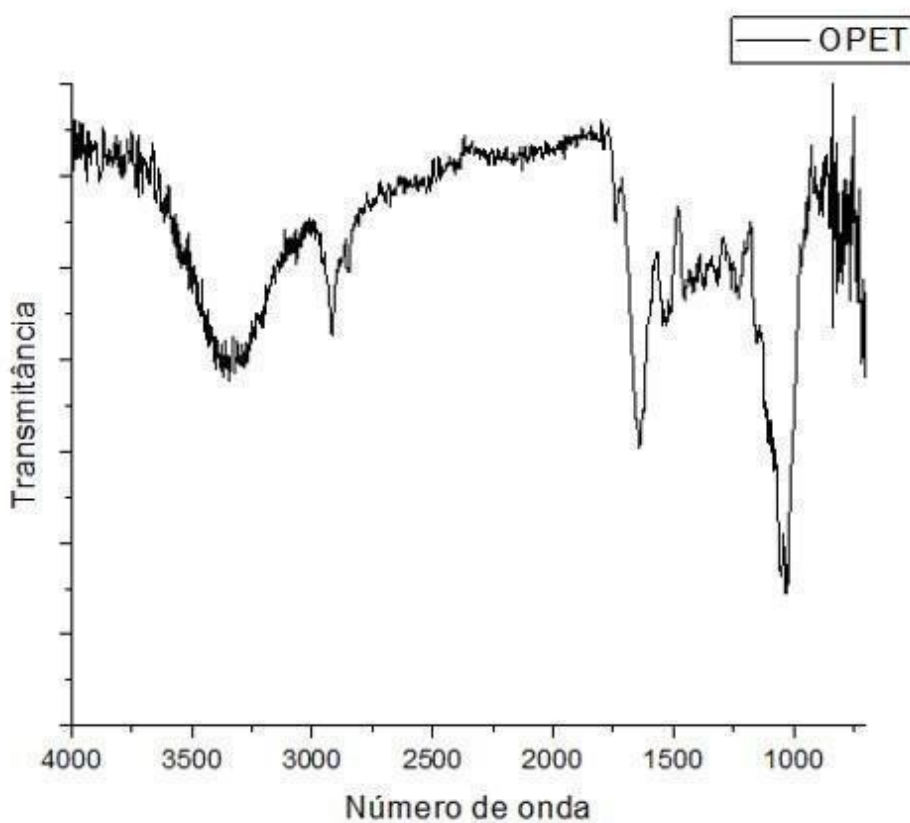


Figura 29: Espectro de FTIR-ATR da amostra que corresponde à NFC

### 6.6.3. Análise da cristalinidade por difração de raio-x

A comparação do difratograma da amostra bruta e da amostra hidrolisada com hemicelulase (Figura 30) permite inferir que a intensidade próxima a  $22^\circ$  é mais acentuada na amostra que foi submetida ao tratamento enzimático. Li e colaboradores (2014) demonstraram um comportamento de espalhamento dos raios x similares ao produzirem nanofibras de celulose a partir de beterraba açucareira. Os resultados do presente estudo indicaram um grau de cristalinidade de 20,84 e 43,28% para a amostra bruta (OP) e tratada com enzimas (OPET), respectivamente. Segundo ABU TAYEH *et al.*, (2014) a perda de interações entre as fibras (hemicelulose e celulose) ou a diminuição de sítios amorfos da celulose são a causa de aumento na cristalinidade do material. TIBOLLA *et al.* (2014) demonstraram que após a aplicação de hidrólise enzimática a cristalinidade do material aumentou de 15 para 49,2%, valores próximos aos encontrados no presente estudo.

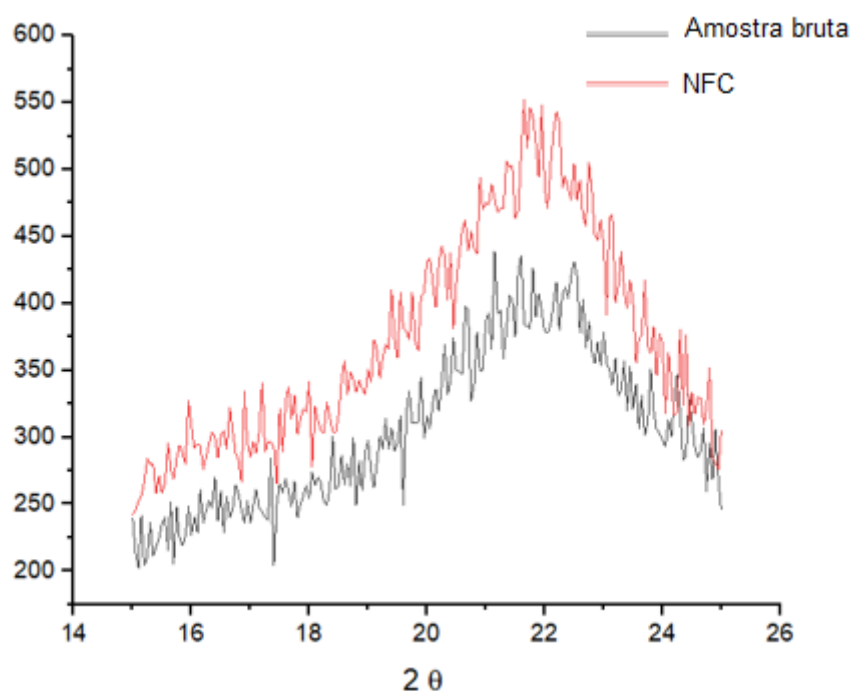


Figura 30: Difratograma (DRX) da amostra bruta (em preto) e da amostra que corresponde às NFC (em vermelho)

A partir da equação de Scherrer, foi estabelecida uma média do diâmetro das fibras obtidas após a ação das enzimas. O valor experimental encontrado nesse trabalho foi igual 22,84 nm. Outros autores apontam diâmetros menores que 10 nm (MORÁN *et al.*, 2007; PELISSARI *et al.*, 2017; TIBOLLA, Heloisa; PELISSARI; MENEGALLI, 2014a) indicando que outros tratamentos, como o tratamento mecânico por homogeneização à alta pressão poderiam ser úteis caso fossem aplicados no produto obtido com o objetivo de diminuir mais ainda o diâmetro das fibras obtidas e melhorar suas propriedades físicas.

### 6.7. Análise dos filmes obtidos

O quadro 5 mostra os resultados das principais propriedades dos filmes com adição de NFC e do filme controle (somente amido):

Quadro 5: Resultados das análises mecânicas, ópticas e térmicas dos filmes produzidos

Formulação	Propriedades mecânicas		Propriedade óptica	Propriedade térmica
	Tensão máxima na ruptura (MPa)	Elongação (%)	Opacidade (%)	T onset (°C)
Amido	3,79±1,10 <sup>b</sup>	63,22±13,60 <sup>a</sup>	0,54±0,13 <sup>c</sup>	310 <sup>ns</sup>
Amido + NFC 0,5%	4,29±0,52 <sup>b</sup>	72,89±14,45 <sup>a</sup>	0,87±0,16 <sup>c</sup>	315 <sup>ns</sup>
Amido + NFC 1%	5,18±0,67 <sup>b</sup>	69,16±13,56 <sup>a</sup>	1,76±0,11 <sup>b</sup>	319 <sup>ns</sup>
Amido + NFC 2,5%	5,12±0,94 <sup>b</sup>	67,57±18,58 <sup>a</sup>	1,91±0,08 <sup>b</sup>	317 <sup>ns</sup>
Amido + NFC 5%	6,21±1,19 <sup>a</sup>	34,49±9,22 <sup>b</sup>	2,57±0,23 <sup>a</sup>	322 <sup>ns</sup>

Legenda: NFC= nanofibra de celulose; <sup>a,b,c</sup>=as letras diferentes em mesma coluna representam a diferença estatística (p<0,05) entre as médias aferidas pelo teste de Tukey. Ns = estatística não avaliada.



### 6.7.1. Solubilidade em água

A solubilidade dos filmes refere-se a um parâmetro importante, pois indica sua integridade em meios aquosos como também se o filme poderá ser empregado em meios em que a atividade de água é elevada, determinando o comportamento durante processos em que água livre esteja presente, como a cocção e até mesmo para seu comportamento no caso de ingestão, caso seja aplicado em filmes comestíveis (DA MATTA *et al.*, 2011).

Filmes com maior resistência a água terão menor valor de solubilidade (TIAN, Y. *et al.*, 2019). Esse fenômeno consiste, portanto, em um parâmetro crucial na definição das aplicações de filmes biopoliméricos (QIN *et al.*, 2016). Certas aplicações, como embalagens de alimentos, exigem baixa solubilidade em água para manter a integridade do produto, enquanto outras aplicações podem exigir uma solubilidade significativamente maior.

Através dos resultados (QUADRO 6) pode-se perceber que somente a adição de 5% de NFC proporcionou diminuição na solubilidade dos filmes.

Quadro 6: Resultado da análise de solubilidade dos filmes produzidos

Formulação	Amido (controle)	Amido + NFC 0,5%	Amido+ NFC 1%	Amido + NFC 2,5%	Amido + NFC 5%
Solubilidade (%)	33,56±1,92 <sup>a</sup>	31,57±2,74 <sup>a</sup>	30,91±3,01 <sup>a</sup>	29,38±1,23 <sup>a</sup>	25,14±2,49 <sup>b</sup>

O valor da solubilidade do filme de amido encontrado experimentalmente é similar ao descrito por TRAVALINI *et al.*, (2019) cujo valor de solubilidade descrito para o controle foi de 31,3±0,64%. A solubilidade dos filmes de amido no presente estudo diminuiu com a incorporação das NFC como já mencionado, dessa forma, a explicação para a redução da solubilidade em água pode estar na própria natureza da celulose que é insolúvel no meio aquoso, ainda que possua hidroxilas aptas a interagirem por ligação de hidrogênio. A diminuição desse parâmetro para KHAN; HUSAIN; AZAM, (2012) e SANTANA *et al.*, (2016) é atribuída à cristalinidade das

nanofibras de celulose que tornam o filme menos hidrofílico que o amido e também às fortes interações que podem ocorrer entre o amido, o plastificante e as nanofibras.

Os resultados da adição de adição NFC indica que as nanofibras trouxeram uma maior resistência, integridade e estabilidade no meio aquoso. PELISSARI *et al.*, (2017) e WILPISZEWSKA & CZECH, (2014) relatam um comportamento parecido ao adicionarem nanofibras de celulose de casca de banana em filmes de amido obtendo 32,3% de solubilidade para o filme controle e uma redução para 23,9% no filme com adição 5% de NFC submetidas previamente à homogeneização de alta pressão.

### **6.7.2. Propriedades mecânicas**

Os filmes de amido são comumente descritos como quebradiços e apresentam baixo coeficiente de plasticidade, baixa alongação e baixa ductilidade. Essas características são relacionadas principalmente às interações intermoleculares estabelecidas na matriz do amido (MALI *et al.*, 2005; SELIGRA *et al.*, 2016). No presente trabalho, a adição de NFC promoveram mais interações na matriz, deixando os filmes mais resistentes à ruptura por energia mecânica.

Diversos autores (CHEN, W. *et al.*, 2018; COELHO *et al.*, 2020; PELISSARI *et al.*, 2017; MISHRA; GREGOR; WIMMER, 2017) ponderam que o emprego de NFC traz vantagens nas características internas da matriz polimérica – em nível molecular, reduzindo a quantidade e o tamanho de poros, proporcionando melhores propriedades mecânicas.

Os valores mensurados das propriedades mecânicas estão listados na tabela 5. Dentre todas as formulações, aquela que tinha 5% de adição de NFC apresentou maior resistência à tração e menor alongação em relação ao controle e às outras amostras. A adição de 5% de NFC promoveu diferenças estatísticas significativas ( $p < 0,05$ ) nesses parâmetro.

Os valores de TR obtidos no presente trabalho foram maiores que os encontrados por TIAN, Y. *et al.*, (2019) e por CHENG *et al.*, (2019) que relataram tensão máxima na ruptura de 4,5 Mpa em filmes formulados com 1% de NFC,

indicando propriedades mecânicas interessantes de reforço para o material produzido.

Corroborando com dados encontrados na literatura, os filmes adicionados de 5% de NFC apresentaram redução significativa da elongação, indicando maior tenacidade e rigidez do material. Isso pode ser atribuído à maior interação entre os componentes do filme.

De forma geral, o comportamento obtido neste trabalho vai ao encontro dos parâmetros de outros estudos consultados que empregam NFC em filmes de amido, já que eles indicam que a adição de nanomateriais ocasiona melhoras nas propriedades mecânicas - no que diz respeito ao aumento da tensão de ruptura (COELHO *et al.*, 2020; FRANCHETTI; MARCONATO, 2006; SÁ, 2020; TIBOLLA, H. *et al.*, 2019).

Nos estudos citados, as mudanças nas propriedades mecânicas dos filmes geralmente são atribuídas à mudança das interações, principalmente aumento da ligação de hidrogênio. Para MARAN *et al.*, (2013) durante a preparação de filmes de amido, os retículos cristalinos são destruídos principalmente por causa da absorção de energia térmica que aumenta tanto a vibração das ligações, quanto a tensão de cisalhamento. Esse fenômeno favorece a entrada das moléculas de glicerol (plastificante), promovendo a formação de novas interações.

Além das interações intermoleculares, CHAND *et al.* (1988) apud PARUL SAHU (2017) apontam que a resistência à tração é diretamente proporcional à concentração de celulose no meio, corroborando com os resultados obtidos no presente estudo, uma vez que na concentração mais alta de NFC (5%) houve melhores resultados de tensão máxima de ruptura. Já o alongamento máximo de ruptura ou elongação aumenta proporcionalmente com o aumento do ângulo entre os constituintes da matriz, pois nessas condições é maior o trabalho de fratura necessário para que haja o estiramento das fibras. Como a elongação em concentrações intermediárias desse estudo (0,5%, 1% e 2,5%) foram estatisticamente iguais ao controle, portanto maiores do que a elongação da amostra com adição de 5% de NFC, acredita-se que a conformação do amido e das nanofibras nesses filmes tenha sido termodinamicamente favorável e tenham

contribuído com a mobilidade na matriz, proporcionando maiores elongações em relação à amostra de maior concentração.

O comportamento observado permite apontar que a adição de NFC a 5% apresentou tendência de diminuir ou substituir descontinuidades e zonas quebradiças, favorecendo a rigidez, diminuindo a mobilidade, visto que a ruptura ocorreu numa força máxima mais elevada. Segundo MARTINS *et al.*, (2020) e TIBOLLA, H. *et al.*, (2019), a causa disso pode ser as ligações cruzadas entre moléculas de amido com as NFC, proporcionando melhoras nas propriedades mecânicas, especialmente a ruptura.

### **6.7.3. Propriedades ópticas (Opacidade)**

Os parâmetros ópticos são importantes visto que no caso de filmes, se aplicados em embalagens podem influenciar as características nutricionais e de aceitabilidade do alimento. A transparência dos filmes tem relação com seus componentes, dessa forma estabelece-se uma relação proporcional à espessura, pois quanto mais espesso e quanto maior o teor de substâncias dispersas, mais opaco será o filme obtido.

A partir da observação dessa propriedade e levando em conta a espessura do filme obteve-se uma variação de 0,54% a 2,57%. A amostra com 0,5% de NFC não apresentou diferença significativa em relação ao controle, no entanto em adições superiores a 1% houve aumento significativo da opacidade.

Os índices de opacidade dos filmes desenvolvidos no presente trabalho apresentaram o mesmo comportamento de MARQUES (2018) que demonstrou um aumento de 0,32 para 2,21% ao adicionar nanofibras de rami em filmes de amido.

Na literatura outros estudos vêm demonstrando que as NFC mesmo em teores abaixo de 5% ocasionam mudanças nas propriedades ópticas de diversos filmes (COELHO *et al.*, 2020; LI *et al.*, 2021; MARTINS, 2017; PELISSARI *et al.*, 2017; SANTANA *et al.*, 2017).

Para os autores citados, esse aumento observado na opacidade é um fator proporcional às fortes interações entre as nanofibras de celulose e a matriz de amido, levando à formação de um compósito compacto que modifica o índice de refração e restringe a passagem da luz através do filme. Essas informações

corroboram com a inferência apontada na análise das propriedades mecânicas quando ocorre a adição de 5% de NFC nas condições citadas proporciona à matriz melhores interações que por sua vez repercutem nas propriedades mecânicas, térmicas e ópticas.

#### 6.7.4. Propriedades térmicas

A estabilidade térmica é um parâmetro essencial a ser considerado quando determinamos o potencial de uso de compósitos para uso em embalagens, visto que o comportamento da degradação de um modo geral, seja térmica ou pela aplicação de outro tipo de energia, permite aos pesquisadores projetar condições de processamentos e maximizar o desempenho do produto obtido. Desse modo, é importante entender as características de materiais na presença de NFC, já que esse parâmetro depende da fonte, do tipo de matriz e do processo de secagem da solução filmogênica (LI *et al.*, 2021; SANTOS; PIZATO; CORTEZ-VEGA, 2020; WU *et al.*, 2014; XU, Y.; ATRENS; STOKES, 2020).

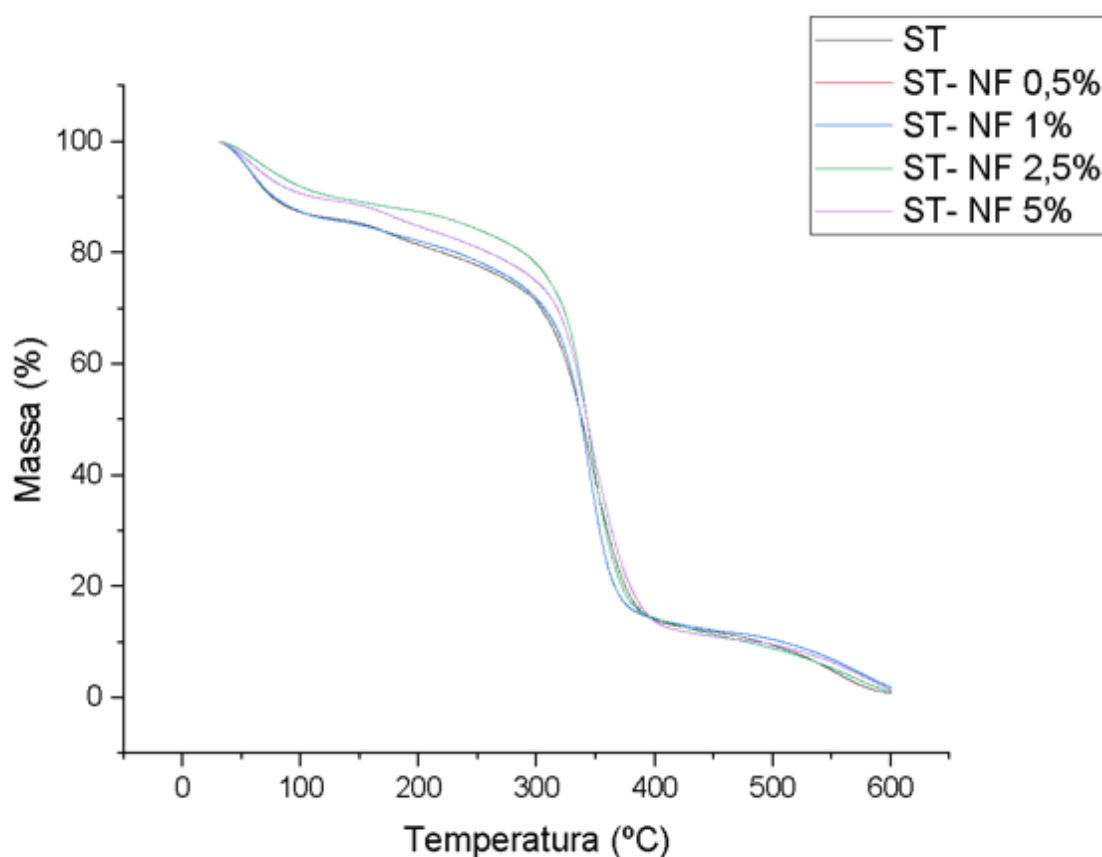


Figura 31: Curva de TGA dos filmes: Controle (cinza); adição 0,5% de NF(vermelho); adição 1% de NFC (azul); adição 2,5% de NFC (verde); adição 5% de NFC (violeta)

De acordo com a fig. 31 a degradação térmica dos materiais obtidos pode ser dividida em duas etapas: na primeira perda de umidade no evento que vai até aproximadamente 150°C que de acordo com POP *et al.*, (2019) é nessa etapa que ocorre a perda total de água. Já no outro evento ocorre a maior perda de massa devido a degradação do plastificante, do amido e das nanofibras de celulose (MONTERO *et al.*, 2017).

De acordo com LIU *et al* (2020); apud PALUDO (2021) existe uma relação entre o teor de NFC e a degradação térmica, visto que de acordo com o estudo citado aumentando a adição de 3% para 4% de nanofibras de celulose bacteriana, os picos de degradação podem aumentar de 330°C para 440°C.

Os resultados desse parâmetro obtidos no presente estudo indicam que as NFC produzidas apresentaram capacidade de melhorar a resistência à degradação térmica, uma vez que o início desse evento nas amostras com 2,5% e 5% ocorreram em temperaturas maiores.

Ao observarmos o gráfico de DTG das amostras (Figura 32), verifica-se que dentre as amostras com NFC, aquela com 5% é de fato o filme que sofreu menor perda de massa, corroborando ao fato de que elevadas concentrações de nanofibras tendem a apresentar maiores interações que exigem maiores energias de ativação.

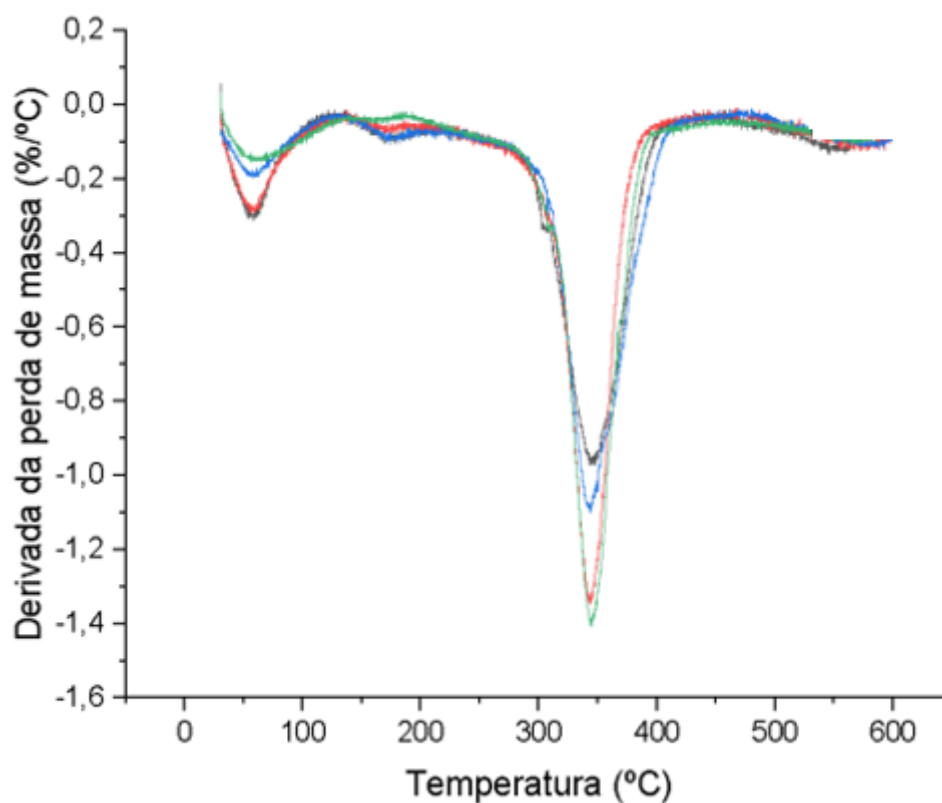


Figura 32: Curva de derivada primeira da análise termogravimétrica do filme controle (em azul) e com adição de 0,5% de NFC (verde); 1% de NFC (amarela); 2,5% de NFC (vermelho) e 5% de NFC (preto)

Essa característica observada no filme com adição de 5%, somadas às informações espectroscópicas e às propriedades mecânicas permitem concluir que é favorável a aplicação desse material em embalagens de alimentos (MISHRA; GREGOR; WIMMER, 2017; PELISSARI *et al.*, 2017).



## 7. Considerações finais

A hidrólise enzimática proporcionou a produção de um nanomaterial celulósico com 43% de rendimento. A composição centesimal do material bruto foi determinada e as modificações estruturais foram acompanhadas pela análise de resultados da diferença na massa do material, teor de extrativos e ligninas extraídos no pré-tratamento e por dados instrumentais como o TGA, DRX e FTIR-ATR.

Um dos objetivos principais foi a adição nas NFC em filmes biodegradáveis. A matriz polimérica estudada, composta por amido de mandioca, glicerol e nanofibras de celulose provindas do sub-produto denominado torta de oliveira, permitiu a elaboração de filmes com até 5% de inclusão de NFC.

Os filmes produzidos apresentaram-se macroscopicamente homogêneos não ficando evidentes bolhas de ar ou rachaduras. A determinação de propriedades físico-químicas não revelou diferença estatística na espessura e as propriedades mecânicas (tensão máxima na ruptura) aumentaram cerca de 50% em relação ao filme de amido controle quando se adicionou 5% de NFC na solução filmogênica.

A adição do nanomaterial resultou na alteração das interações intermoleculares entre os componentes do filme (amilose e amilopectina), minimizando as ligações de hidrogênio entre as moléculas de amido e formando novas ligações que repercutiram nas propriedades mecânicas como o aumento da tensão de ruptura.

O comportamento térmico dos filmes também foi alterado pela adição das nanofibras, levando ao aumento da temperatura de degradação. A degradação em um único estágio também confirmou a alta interação entre a matriz de amido e as nanofibras.

Dessa forma conclui-se que os filmes desenvolvidos no presente trabalho (com a adição de nanofibras de celulose de torta de oliveira por hidrólise enzimática) tiveram propriedades mecânicas, e térmicas melhoradas e solubilidade diminuída, o que justifica o potencial de reaproveitamento do resíduo denominado torta de oliveira. Também destaca-se que os resultados obtidos estão de acordo com princípios da química verde no que diz respeito ao reaproveitamento, à substituição

de plásticos sintéticos, e sobretudo à especificidade e ao uso de catalisador em processos industriais, visto que substituímos ácidos por enzimas.

Novos ensaios devem ser realizados com o intuito de melhorar a alongação e a resistência à tração simultaneamente variando a concentração de plastificante. Do mesmo modo, serão realizados experimentos visando testar o potencial do filme como suporte para enzimas.

## 8. Referências

ABU TAYEH, Hiba *et al.* Potential of bioethanol production from olive mill solid wastes. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 152, p. 24–30, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2013.10.102>

ALBURQUERQUE, J. A. *et al.* Agrochemical characterisation of “alperujo”, a solid by-product of the two-phase centrifugation method for olive oil extraction. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 91, n. 2, p. 195–200, 2004. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(03\)00177-9](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(03)00177-9)

ALHAMAD, Mohammad N. *et al.* The physicochemical properties, total phenolic, antioxidant activities, and phenolic profile of fermented olive cake. **Arabian Journal of Chemistry**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 136–140, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.ARABJC.2012.07.002>

ALMEIDA, Ana Carolina Sergio *et al.* Aplicação de nanotecnologia em embalagens de alimentos. **Polímeros**, [s. l.], v. 25, p. 89–97, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/0104-1428.2069>. Acesso em: 14 mar. 2022.

ANBU, Periasamy *et al.* Microbial Enzymes and Their Applications in Industries and Medicine 2014. **BioMed Research International**, [s. l.], v. 2015, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2015/816419>

APARICIO, Ramón; HARWOOD, John. Handbook of olive oil: Analysis and properties. **Handbook of Olive Oil: Analysis and Properties**, [s. l.], p. 1–772, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-7777-8>

ASHOGBON, Adeleke Omodunbi; AKINTAYO, Emmanuel Temitope. Recent trend in the physical and chemical modification of starches from different botanical sources: A review. **Starch - Stärke**, [s. l.], v. 66, n. 1–2, p. 41–57, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/STAR.201300106>. Acesso em: 15 mar. 2022.

ASSIS, Renato Queiroz *et al.* Synthesis of biodegradable films based on cassava starch containing free and nanoencapsulated  $\beta$ -carotene. **Packaging Technology and Science**, [s. l.], v. 31, n. 3, p. 157–166, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/PTS.2364>. Acesso em: 4 mar. 2022.

AZEREDO, Henriette Monteiro Cordeiro de; FARIA, José de Assis Fonseca; AZEREDO, Alberto Monteiro Cordeiro de. Embalagens ativas para alimentos. **Food Science and Technology**, [s. l.], v. 20, n. 3, p. 337–341, 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0101-20612000000300010>. Acesso em: 15 mar. 2022.

AZIZI SAMIR, My Ahmed Said; ALLOIN, Fannie; DUFRESNE, Alain. Review of recent research into cellulosic whiskers, their properties and their application in nanocomposite field. **Biomacromolecules**, [s. l.], v. 6, n. 2, p. 612–626, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/BM0493685>. Acesso em: 14 mar. 2022.

BAILLIE, Caroline. Green composites: polymer composites and the environment. [s. l.], p. 308, 2004.

BLANCO, Angeles *et al.* Nanocellulose for industrial use: Cellulose nanofibers (CNF), cellulose nanocrystals (CNC), and bacterial cellulose (BC). **Handbook of Nanomaterials for Industrial Applications**, [s. l.], p. 74–126, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813351-4.00005-5>

BRAUN, Birgit; DORGAN, John R.; CHANDLER, John P. Cellulosic nanowhiskers. Theory and application of light scattering from polydisperse spheroids in the Rayleigh-Gans-Debye regime. **Biomacromolecules**, [s. l.], v. 9, n. 4, p. 1255–1263, 2008. Disponível em: [https://doi.org/10.1021/BM7013137/SUPPL\\_FILE/BM7013137-FILE003.PDF](https://doi.org/10.1021/BM7013137/SUPPL_FILE/BM7013137-FILE003.PDF). Acesso em: 21 mar. 2022.

BRODIN, Malin *et al.* Lignocellulosics as sustainable resources for production of bioplastics – A review. **Journal of Cleaner Production**, [s. l.], v. 162, p. 646–664, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.JCLEPRO.2017.05.209>

BULOTTA, Stefania *et al.* Beneficial effects of the olive oil phenolic components oleuropein and hydroxytyrosol: focus on protection against cardiovascular and metabolic diseases. **Journal of Translational Medicine** **2014** **12:1**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 1–9, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/S12967-014-0219-9>. Acesso em: 25 jul. 2021.

BUZALA, Kamila Przybysz *et al.* Effect of cellulases and xylanases on refining process and kraft pulp properties. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 11, n. 8, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0161575>

CARDOSO, Susana M; COIMBRA, Manuel a; AVEIRO, Universidade De.

Propriedades gelificantes de substâncias pécnicas extraídas de bagaço de azeitona. [s. l.], p. 5–8,

CAVALHEIRO, Caroline Viegas *et al.* Composição química de folhas de oliveira (*Olea europaea* L.) da região de Caçapava do Sul, RS. **Ciência Rural**, [s. l.], v. 44, n. 10, p. 1874–1879, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/0103-8478CR20131139>. Acesso em: 25 jul. 2021.

CECCHI, Lorenzo *et al.* Sensory Profiling and Consumer Acceptance of Pasta, Bread, and Granola Bar Fortified with Dried Olive Pomace (Pâté): A Byproduct from Virgin Olive Oil Production. **Journal of Food Science**, [s. l.], v. 84, n. 10, p. 2995–3008, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/1750-3841.14800>

CHAMBI, Hulda Noemi Mamani; GROSSO, Carlos Raimundo Ferreira. Mechanical and water vapor permeability properties of biodegradable films based on methylcellulose, glucomannan, pectin and gelatin. **Food Science and Technology**, [s. l.], v. 31, n. 3, p. 739–746, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0101-20612011000300029>. Acesso em: 15 mar. 2022.

CHANDRA, Prafulla K.; ATALA, Anthony A. Use of matrix and seeding with cells for vasculature of organs. **Encyclopedia of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, [s. l.], v. 1–3, p. 425–446, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.11078-5>

CHEN, Wenbo *et al.* Thermo-Responsive Cellulose-Based Material with Switchable Wettability for Controllable Oil/Water Separation. **Polymers 2018, Vol. 10, Page 592**, [s. l.], v. 10, n. 6, p. 592, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/POLYM10060592>. Acesso em: 24 set. 2021.

CHEN, Yun *et al.* Pea starch-based composite films with pea hull fibers and pea hull fiber-derived nanowhiskers. **Polymer Engineering & Science**, [s. l.], v. 49, n. 2, p. 369–378, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/PEN.21290>. Acesso em: 15 mar. 2022.

CHENG, Geng *et al.* Comparison of mechanical reinforcement effects of cellulose nanocrystal, cellulose nanofiber, and microfibrillated cellulose in starch composites. **Polymer Composites**, [s. l.], v. 40, n. S1, p. E365–E372, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/PC.24685>. Acesso em: 13 mar. 2022.

CHIOFALO, B. *et al.* Administration of olive cake for ewe feeding: effect on

milk yield and composition. **Small Ruminant Research**, [s. l.], v. 55, n. 1–3, p. 169–176, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.SMALLRUMRES.2003.12.011>

CINTRA, Lorena Cardoso *et al.* The boosting effect of recombinant hemicellulases on the enzymatic hydrolysis of steam-treated sugarcane bagasse. **Enzyme and Microbial Technology**, [s. l.], v. 133, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.ENZMICTEC.2019.109447>

CLODOVEO, Maria Lisa *et al.* Mechanical strategies to increase nutritional and sensory quality of virgin olive oil by modulating the endogenous enzyme activities. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, [s. l.], v. 13, n. 2, p. 135–154, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12054>

COELHO, Caroline Corrêa de Souza *et al.* Cellulose nanocrystals from grape pomace and their use for the development of starch-based nanocomposite films. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 159, p. 1048–1061, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2020.05.046>

COLLAZO-BIGLIARDI, Sofia; ORTEGA-TORO, Rodrigo; CHIRALT BOIX, Amparo. Isolation and characterisation of microcrystalline cellulose and cellulose nanocrystals from coffee husk and comparative study with rice husk. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 191, p. 205–215, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2018.03.022>

CONTRERAS, María del Mar *et al.* Olive-derived biomass as a renewable source of value-added products. **Process Biochemistry**, [s. l.], v. 97, p. 43–56, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.PROCBIO.2020.06.013>

COSTA, Eveline S. *et al.* Use of Lignins from Sugarcane Bagasse for Assembling Microparticles Loaded with *Azadirachta indica* Extracts for Use as Neem-Based Organic Insecticides. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, [s. l.], v. 28, n. 1, p. 126–135, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.5935/0103-5053.20160155>. Acesso em: 24 set. 2021.

CUI, Li *et al.* Effect of commercial cellulases and refining on kraft pulp properties: Correlations between treatment impacts and enzymatic activity components. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 115, p. 193–199, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2014.08.076>

DA MATTA, Manoel D. *et al.* Propriedades de barreira e solubilidade de filmes de amido de ervilha associado com goma xantana e glicerol. **Polímeros**, [s. l.], v. 21, n. 1, p. 67–72, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0104-14282011005000011>. Acesso em: 9 jan. 2022.

DA ROSA ZAVAREZE, Elessandra. Shanise Lisie Mello el HALAL Annie Campello TELLES Carlos PRENTICE-HERNÁNDEZ Filmes biodegradáveis à base de proteínas miofibrilares de pescado Biodegradable films based on myofibrillar proteins of fish. [s. l.], p. 53–57, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1981-67232012005000038>. Acesso em: 15 mar. 2022.

DA SILVA, Luiz Fernando de Oliveira *et al.* Variação na qualidade do azeite em cultivares de oliveira. **Bragantia**, [s. l.], v. 71, n. 2, p. 202–209, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0006-87052012000200008>. Acesso em: 4 mar. 2022.

DE CARVALHO, Kelly C.Coelho *et al.* Polyhydroxyalkanoates and Their Nanobiocomposites With Cellulose Nanocrystals. **Design and Applications of Nanostructured Polymer Blends and Nanocomposite Systems**, [s. l.], p. 261–285, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-39408-6.00012-1>

DE LÉIS, Cristiane Maria *et al.* Environmental and energy analysis of biopolymer film based on cassava starch in Brazil. **Journal of Cleaner Production**, [s. l.], v. 143, p. 76–89, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.JCLEPRO.2016.12.147>

DE MESQUITA, João P. *et al.* Bio-based nanocomposites obtained through covalent linkage between chitosan and cellulose nanocrystals. **Carbohydrate polymers**, [s. l.], v. 90, n. 1, p. 210–217, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2012.05.025>. Acesso em: 14 mar. 2022.

DE MORAES CRIZEL, Tainara *et al.* Active food packaging prepared with chitosan and olive pomace. **Food Hydrocolloids**, [s. l.], v. 74, p. 139–150, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.FOODHYD.2017.08.007>

DENCE, C. W.; LIN, S. Y. Introduction. [s. l.], p. 3–19, 1992. Disponível em: [https://doi.org/10.1007/978-3-642-74065-7\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-642-74065-7_1)

DISNER, Geonildo Rodrigo; CESTARI, Marta Margarete. NANOCIÊNCIA & NANOTECNOLOGIA. **Evidência**, [s. l.], v. 16, n. 1, p. 71–76, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.18593/eba.v16i1.10660>. Acesso em: 14 mar. 2022.

DOBREV, Georgi *et al.* Purification and characterization of endoxylanase XIn-1 from *Aspergillus niger* B03. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 25, n. 12, p. 2095–2102, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/S11274-009-0112-5>

DOMÉNECH, Pablo *et al.* Analytical Characterization of Water-Soluble Constituents in Olive-Derived By-Products. **Foods**, [s. l.], v. 10, n. 6, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/foods10061299>

ELGHARBI, Fatma *et al.* Expression of an *Aspergillus niger* xylanase in yeast: Application in breadmaking and in vitro digestion. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 79, p. 103–109, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2015.04.053>

FABIOLA RODRÍGUEZ-ZÚÑIGA, Ursula *et al.* Produção de celulases por *Aspergillus niger* por fermentação em estado sólido *Aspergillus niger* production of cellulases by solid-state fermentation. [s. l.],

FANG, J. M. *et al.* The preparation and characterisation of a series of chemically modified potato starches. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 47, n. 3, p. 245–252, 2002. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(01\)00187-4](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(01)00187-4)

FENGEL, D; WEGENER, G. **Fengel, D. and Wegener, G. (1989) Wood—Chemistry, Ultrastructure, Reactions. 2nd Edition, Walter de Gruyter, Berlin. - References - Scientific Research Publishing.** [S. l.], [s. d.]. Disponível em: [https://www.scirp.org/\(S\(czeh2tfqyw2orz553k1w0r45\)\)/reference/ReferencesPapers.aspx?ReferenceID=1634251](https://www.scirp.org/(S(czeh2tfqyw2orz553k1w0r45))/reference/ReferencesPapers.aspx?ReferenceID=1634251). Acesso em: 21 mar. 2022.

FERNANDES, Kátia F.; LIMA, Claudinei S.; LOPES, Flavio M. Técnicas de Imobilização de Enzimas. **Revista Processos Químicos**, [s. l.], v. 4, n. 7, p. 53–58, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.19142/RPQ.V4I7.107>

FERNANDES, Maria C. *et al.* Bioethanol production from extracted olive pomace: dilute acid hydrolysis. **Bioethanol**, [s. l.], v. 2, n. 1, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1515/bioeth-2016-0007>

FORNARI JUNIOR, Celso Carlino Maria; OLIVEIRA, Rosilene Aparecida; SANTOS, André Mendonça. EXTRAÇÃO DE SOLÚVEIS DO MESOCARPO DE COCO VERDE UTILIZANDO SOLVENTE E SUCESSIVAS EXTRAÇÕES.



**Engevista**, [s. l.], v. 18, n. 1, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.22409/engevista.v18i1.685>

FRANCHETTI, Sandra Mara Martins; MARCONATO, José Carlos. Polímeros biodegradáveis - uma solução parcial para diminuir a quantidade dos resíduos plásticos. **Química Nova**, [s. l.], v. 29, n. 4, p. 811–816, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422006000400031>. Acesso em: 14 mar. 2022.

FURLANI, Izadora L. *et al.* Imobilização enzimática: conceito e efeitos na proteólise. **Química Nova**, [s. l.], v. 43, n. 4, p. 463–473, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170525>. Acesso em: 15 mar. 2022.

GALANAKIS, Charis M.; TORNBERG, Eva; GEKAS, Vassilis. Clarification of high-added value products from olive mill wastewater. **Journal of Food Engineering**, [s. l.], v. 99, n. 2, p. 190–197, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.JFOODENG.2010.02.018>

GEYER, Roland; JAMBECK, Jenna R.; LAW, Kara Lavender. Production, use, and fate of all plastics ever made. **Science Advances**, [s. l.], v. 3, n. 7, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1126/SCIADV.1700782>

GOPAKUMAR, Deepu A. *et al.* Nanomaterials-State of Art, New Challenges, and Opportunities. **Nanoscale Materials in Water Purification**, [s. l.], p. 1–24, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813926-4.00001-X>

GREGORY, Abigail; BOLWELL, G.Paul. Hemicelluloses. **Comprehensive Natural Products Chemistry**, [s. l.], p. 599–615, 1999. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-091283-7.00084-9>

HEINZE, T.; LIEBERT, T. Celluloses and Polyoses/Hemicelluloses. **Polymer Science: A Comprehensive Reference, 10 Volume Set**, [s. l.], v. 10, p. 83–152, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53349-4.00255-7>

HENRIKSSON, M. *et al.* An environmentally friendly method for enzyme-assisted preparation of microfibrillated cellulose (MFC) nanofibers. **European Polymer Journal**, [s. l.], v. 43, n. 8, p. 3434–3441, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.EURPOLYMJ.2007.05.038>

HODAIFA, Gassan *et al.* Kinetic and thermodynamic parameters of iron adsorption onto olive stones. **Industrial Crops and Products**, [s. l.], v. 49, p. 526–534, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.INDCROP.2013.05.039>

HU, Guifang; CHEN, Jingyuan; GAO, Jianping. Preparation and characteristics of oxidized potato starch films. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 76, n. 2, p. 291–298, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2008.10.032>

IONIC ADSORPTION - AN OVERVIEW | SCIEDIRECT TOPICS. [S. l.], [s. d.]. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/topics/chemical-engineering/ionic-adsorption>. Acesso em: 15 mar. 2022.

JC, C S; N, George; SK, Narayanankutty. Isolation and characterization of cellulose nanofibrils from arecanut husk fibre. **Carbohydrate polymers**, [s. l.], v. 142, p. 158–166, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2016.01.015>. Acesso em: 17 out. 2021.

JESIONOWSKI, Teofil; ZDARTA, Jakub; KRAJEWSKA, Barbara. Enzyme immobilization by adsorption: A review. **Adsorption**, [s. l.], v. 20, n. 5–6, p. 801–821, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/S10450-014-9623-Y/FIGURES/5>. Acesso em: 15 mar. 2022.

JG, Cordero *et al.* Benefit of Oleuropein Aglycone for Alzheimer's Disease by Promoting Autophagy. **Oxidative medicine and cellular longevity**, [s. l.], v. 2018, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2018/5010741>. Acesso em: 25 jul. 2021.

JIANG, Li qun *et al.* Impact of ball-milling and ionic liquid pretreatments on pyrolysis kinetics and behaviors of crystalline cellulose. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 305, p. 123044, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2020.123044>

JONOOBI, Mehdi *et al.* Mechanical properties of cellulose nanofiber (CNF) reinforced polylactic acid (PLA) prepared by twin screw extrusion. **Composites Science and Technology**, [s. l.], v. 70, n. 12, p. 1742–1747, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.COMPSCITECH.2010.07.005>

KHALIFA, Ibrahim *et al.* Improving the shelf-life stability of apple and strawberry fruits applying chitosan-incorporated olive oil processing residues coating. **Food Packaging and Shelf Life**, [s. l.], v. 9, p. 10–19, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.FPSL.2016.05.006>

KHAN, Mohammad Jahir; HUSAIN, Qayyum; AZAM, Ameer. Immobilization of porcine pancreatic  $\alpha$ -amylase on magnetic Fe 2O<sub>3</sub> nanoparticles: Applications to the

hydrolysis of starch. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, [s. l.], v. 17, n. 2, p. 377–384, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/S12257-011-0105-8>

KIM, Jong-Yea *et al.* Humidity stability of tapioca starch-pullulan composite films. **Food hydrocolloids**, [s. l.], v. 41, p. 140–145, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.04.008>. Acesso em: 21 mar. 2022.

KLEMM, Dieter *et al.* Cellulose: Fascinating biopolymer and sustainable raw material. **Angewandte Chemie - International Edition**, [s. l.], v. 44, n. 22, p. 3358–3393, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/ANIE.200460587>

KRIS-ETHERTON, Penny M. *et al.* High-monounsaturated fatty acid diets lower both plasma cholesterol and triacylglycerol concentrations. **The American journal of clinical nutrition**, [s. l.], v. 70, n. 6, p. 1009–1015, 1999. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/AJCN/70.6.1009>. Acesso em: 14 mar. 2022.

KRISTANTO, Jonas; AZIS, Muhammad Mufti; PURWONO, Suryo. Multi-distribution activation energy model on slow pyrolysis of cellulose and lignin in TGA/DSC. **Heliyon**, [s. l.], v. 7, n. 7, p. e07669, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.HELIYON.2021.E07669>

KUMAR SHARMA, Rakesh; SINGH ARORA, Daljit. Fungal degradation of lignocellulosic residues: An aspect of improved nutritive quality Bioactive molecules from medicinal plants View project Microbial electrochemical system View project Fungal degradation of lignocellulosic residues: An aspect of improved nutritive quality. **Article in Critical Reviews in Microbiology**, [s. l.], 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.3109/1040841X.2013.791247>. Acesso em: 14 mar. 2022.

Liang, Zhang *et al.* Developing hydroxypropyl methylcellulose/hydroxypropyl starch blends for use as capsule materials. **Carbohydrate polymers**, [s. l.], v. 98, n. 1, p. 73–79, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2013.05.070>. Acesso em: 17 out. 2021.

LAGUERRE, M.; LECOMTE, J.; VILLENEUVE, P. Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: existing methods, new trends and challenges. **Progress in lipid research**, [s. l.], v. 46, n. 5, p. 244–282, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.PLIPRES.2007.05.002>. Acesso em: 14 mar. 2022.

LAMMI, Sarah *et al.* Dry fractionation of olive pomace for the development of

food packaging biocomposites. **Industrial Crops and Products**, [s. l.], v. 120, p. 250–261, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.INDCROP.2018.04.052>

LARSEN, Lone Frost; JESPERSEN, Jørgen; MARCKMANN, Peter. Are olive oil diets antithrombotic? Diets enriched with olive, rapeseed, or sunflower oil affect postprandial factor VII differently. **American Journal of Clinical Nutrition**, [s. l.], v. 70, n. 6, p. 976–982, 1999. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/AJCN/70.6.976>

LAVOINE, Nathalie *et al.* Microfibrillated cellulose - Its barrier properties and applications in cellulosic materials: A review. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 90, n. 2, p. 735–764, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2012.05.026>

LAVORATTI, Alessandra. UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIAS PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE PROCESSOS E TECNOLOGIAS DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE COMPÓSITOS POLIMÉRICOS POLIÉSTER/NANOCELULOSE. [s. l.], 2015.

LECETA, Itsaso *et al.* Environmental assessment of chitosan-based films. **Journal of Cleaner Production**, [s. l.], v. 41, p. 312–318, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.JCLEPRO.2012.09.049>

LEITE, Paulina *et al.* Ultrasounds pretreatment of olive pomace to improve xylanase and cellulase production by solid-state fermentation. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 214, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.05.028>

LI, Tian *et al.* Developing fibrillated cellulose as a sustainable technological material. **Nature** |, [s. l.], v. 590, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41586-020-03167-7>. Acesso em: 16 mar. 2022.

LIAO, Hanpeng *et al.* Functional diversity and properties of multiple xylanases from *Penicillium oxalicum* GZ-2. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 5, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/SREP12631>. Acesso em: 14 mar. 2022.

LUCHESE, Cláudia Leites; SPADA, Jordana Corralo; TESSARO, Isabel Cristina. Starch content affects physicochemical properties of corn and cassava starch-based films. **Industrial Crops and Products**, [s. l.], v. 109, p. 619–626, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.INDCROP.2017.09.020>

LYND, Lee R. *et al.* Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. **Microbiology and molecular biology reviews : MMBR**, [s. l.], v. 66, n. 3, p. 506–577, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/MMBR.66.3.506-577.2002>. Acesso em: 14 mar. 2022.

Meng, Li *et al.* Preparation and characterization of cellulose nanofibers from de-pectinated sugar beet pulp. **Carbohydrate polymers**, [s. l.], v. 102, n. 1, p. 136–143, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2013.11.021>. Acesso em: 17 out. 2021.

MACHADO DE CASTRO, Aline; PEREIRA, Nei. PRODUÇÃO, PROPRIEDADES E APLICAÇÃO DE CELULASES NA HIDRÓLISE DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS. **Quim. Nova**, [s. l.], v. 33, n. 1, p. 181–188, 2010.

MADEIRA, Jose Valdo *et al.* Agro-Industrial Residues and Microbial Enzymes: An Overview on the Eco-Friendly Bioconversion into High Value-Added Products. **Biotechnology of Microbial Enzymes: Production, Biocatalysis and Industrial Applications**, [s. l.], p. 475–511, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803725-6.00018-2>

MALHERBI, Naiane Miriam *et al.* Corn starch and gelatin-based films added with guabiroba pulp for application in food packaging. **Food Packaging and Shelf Life**, [s. l.], v. 19, p. 140–146, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.FPSL.2018.12.008>

MALI, Suzana *et al.* Mechanical and thermal properties of yam starch films. **Food Hydrocolloids**, [s. l.], v. 19, n. 1, p. 157–164, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.FOODHYD.2004.05.002>

MALI, Suzana; GROSSMANN, Maria Victória Eiras; YAMASHITA, Fábio. Starch films: production, properties and potential of utilization. **Semina: Ciências Agrárias**, [s. l.], v. 31, n. 1, p. 137–156, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2010v31n1p137>. Acesso em: 15 mar. 2022.

MANIGLIA, Bianca Chierigato *et al.* Production of active cassava starch films; effect of adding a biosurfactant or synthetic surfactant. **Reactive and Functional Polymers**, [s. l.], v. 144, p. 104368, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.REACTFUNCTPOLYM.2019.104368>

MARAN, J. Prakash *et al.* Development of model for barrier and optical

properties of tapioca starch based edible films. **Carbohydrate polymers**, [s. l.], v. 92, n. 2, p. 1335–1347, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2012.09.069>. Acesso em: 21 mar. 2022.

MARQUES, Geovana. UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ GEOVANA SILVA MARQUES. [s. l.], 2018.

MARTINS, Mariana Pereira *et al.* Application of Cellulose Nanofibrils Isolated from an Agroindustrial Residue of Peach Palm in Cassava Starch Films. **Food Biophysics**, [s. l.], v. 15, n. 3, p. 323–334, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/S11483-020-09626-Y>

MARTINS, Mariana Pereira. **DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE FILME DE FÉCULA DE MANDIOCA (Manihot esculenta) REFORÇADO COM NANOCELULOSE EXTRAÍDA DE RESÍDUO DE PUPUNHA (Bactris gasipaes Kunth)**. 2017. - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2017. Disponível em: [https://acervodigital.ufpr.br/bitstream/handle/1884/52220/R - D - MARIANA PEREIRA MARTINS.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://acervodigital.ufpr.br/bitstream/handle/1884/52220/R-D-MARIANA-PEREIRA-MARTINS.pdf?sequence=1&isAllowed=y). Acesso em: 23 fev. 2022.

MARTOÏA, F. *et al.* On the origins of the elasticity of cellulose nanofiber nanocomposites and nanopapers: a micromechanical approach. **RSC Advances**, [s. l.], v. 6, n. 53, p. 47258–47271, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/C6RA07176G>. Acesso em: 20 jan. 2022.

MEDEIROS, R.M.L. *et al.* Destinação e Reaproveitamento de Subprodutos da Extração Olivícola. **Scientia Agraria Paranaensis**, [s. l.], v. 15, n. 2, p. 100–108, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.18188/1983-1471/sap.v15n2p100-108>

MEDOUNI-HAROUNE, Lamia *et al.* Bioconversion of Olive Pomace by Submerged Cultivation of *Streptomyces* sp. S1M3l. **Proceedings of the National Academy of Sciences India Section B - Biological Sciences**, [s. l.], v. 88, n. 4, p. 1425–1433, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/S40011-017-0880-X>

MENON, Vishnu; RAO, Mala. Trends in bioconversion of lignocellulose: Biofuels, platform chemicals & biorefinery concept. **Progress in Energy and Combustion Science**, [s. l.], v. 38, n. 4, p. 522–550, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.PECS.2012.02.002>

MERCANTE, Luiza A. *et al.* Electrospun nanofibers and their applications: advances in the last decade. **Quimica Nova**, [s. l.], v. 44, n. 6, p. 717–736, 2021.

Disponível em: <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170721>

MIKKONEN, Kirsi S. Green Chemistry CRITICAL REVIEW Strategies for structuring diverse emulsion systems by using wood lignocellulose-derived stabilizers. [s. l.], 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/c9gc04457d>

MIRANDA, Isabel *et al.* Valorization of lignocellulosic residues from the olive oil industry by production of lignin, glucose and functional sugars. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 292, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121936>

MIRANDA, Vinícius R.; CARVALHO, Antonio J.F. Blendas compatíveis de amido termoplástico e polietileno de baixa densidade compatibilizadas com ácido cítrico. **Polímeros**, [s. l.], v. 21, n. 5, p. 353–360, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0104-14282011005000067>. Acesso em: 15 mar. 2022.

MISHRA, Pawan Kumar; GREGOR, Tomas; WIMMER, Rupert. BSG for cellulose nanofibres. **BioResources**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 107–116, 2017.

MISSION, Mailin *et al.* Manipulation of nanofiber-based  $\beta$ -galactosidase nanoenvironment for enhancement of galacto-oligosaccharide production. **Journal of Biotechnology**, [s. l.], v. 222, p. 56–64, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.JBIOTEC.2016.02.014>

MOHANTY, A.K., MISRA, M. AND HINRICHSEN, G. (2000) BIOFIBRES, BIODEGRADABLE POLYMERS AND BIOCOSCOMPOSITES AN OVER-VIEW. MACROMOLECULAR MATERIALS AND ENGINEERING, 276-277, 1-24. - REFERENCES - SCIENTIFIC RESEARCH PUBLISHING. [S. l.], [s. d.]. Disponível em:

[https://www.scirp.org/\(S\(351jmbntvnsjt1aadkposzje\)\)/reference/referencespapers.aspx?referenceid=1692084](https://www.scirp.org/(S(351jmbntvnsjt1aadkposzje))/reference/referencespapers.aspx?referenceid=1692084). Acesso em: 14 mar. 2022.

MONTERO, Belén *et al.* Effect of nanocellulose as a filler on biodegradable thermoplastic starch films from tuber, cereal and legume. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 157, p. 1094–1104, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2016.10.073>

MORÁN, Juan I. *et al.* Extraction of cellulose and preparation of nanocellulose from sisal fibers. **Cellulose** 2007 15:1, [s. l.], v. 15, n. 1, p. 149–159, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/S10570-007-9145-9>. Acesso em: 17 out.

2021.

MOREIRA, L. R.S.; FILHO, E. X.F. Insights into the mechanism of enzymatic hydrolysis of xylan. **Applied microbiology and biotechnology**, [s. l.], v. 100, n. 12, p. 5205–5214, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/S00253-016-7555-Z>. Acesso em: 14 mar. 2022.

NACARID, Delgado. (PDF) **PROPIEDADES TENSOACTIVAS DE LA LIGNINA EXTRAÍDA DEL “LICOR NEGRO” MODIFICADA POR REACCIONES ASISTIDAS POR MICROONDAS**. [S. l.], [s. d.]. Disponível em: [https://www.researchgate.net/publication/318505946\\_PROPIEDADES\\_TENSOACTIVAS\\_DE\\_LA\\_LIGNINA\\_EXTRAI DA\\_DEL\\_LICOR\\_NEGRO\\_MODIFICADA\\_POR\\_REACCIONES\\_ASISTIDAS\\_POR\\_MICROONDAS](https://www.researchgate.net/publication/318505946_PROPIEDADES_TENSOACTIVAS_DE_LA_LIGNINA_EXTRAI DA_DEL_LICOR_NEGRO_MODIFICADA_POR_REACCIONES_ASISTIDAS_POR_MICROONDAS). Acesso em: 17 out. 2021.

OLIVEIRA, Felisbela *et al.* Lipase production by solid-state fermentation of olive pomace in tray-type and pressurized bioreactors. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, [s. l.], v. 93, n. 5, p. 1312–1319, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/JCTB.5492>. Acesso em: 25 jul. 2021.

OLIVEIRA, Adelson Francisco de *et al.* PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DOS PRIMEIROS AZEITES DE OLIVA BRASILEIROS EXTRAÍDOS EM MARIA DA FÉ, MINAS GERAIS. **Scientia Agraria**, [s. l.], v. 11, n. 3, p. 255–261, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.5380/RSA.V11I3.17511>. Acesso em: 4 mar. 2022.

OLIVEIRA DE SOUZA, Carolina; SILVA, Luciana Tosta; DRUZIAN, Janice Izabel. ESTUDO COMPARATIVO DA CARACTERIZAÇÃO DE FILMES BIODEGRADÁVEIS DE AMIDO DE MANDIOCA CONTENDO POLPAS DE MANGA E DE ACEROLA. **Quim. Nova**, [s. l.], v. 35, n. 2, p. 262–267, 2012.

ORRABALIS, Camilo *et al.* Characterization of Nanocellulose Obtained from *Cereus Forbesii* (a South American cactus). **Materials Research**, [s. l.], v. 22, n. 6, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1980-5373-MR-2019-0243>. Acesso em: 17 out. 2021.

PÄÄKKO, M. *et al.* Enzymatic hydrolysis combined with mechanical shearing and high-pressure homogenization for nanoscale cellulose fibrils and strong gels. **Biomacromolecules**, [s. l.], v. 8, n. 6, p. 1934–1941, 2007. Disponível em: [https://doi.org/10.1021/BM061215P/ASSET/IMAGES/BM061215P.SOCIAL.JPEG\\_V03](https://doi.org/10.1021/BM061215P/ASSET/IMAGES/BM061215P.SOCIAL.JPEG_V03). Acesso em: 14 mar. 2022.



PACHECO-TORGAL, F; JALALI, Said. Nanotechnology: Advantages and drawbacks in the field of construction and building materials. **CONSTRUCTION & BUILDING MATERIALS**, [s. l.], 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2010.07.009>

PADALINO, Lucia *et al.* Use of olive oil industrial by-product for pasta enrichment. **Antioxidants**, [s. l.], v. 7, n. 4, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ANTIOX7040059>

PAGNO, Carlos H. *et al.* Development of active biofilms of quinoa (*Chenopodium quinoa* W.) starch containing gold nanoparticles and evaluation of antimicrobial activity. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 173, p. 755–762, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2014.10.068>

PELLISSARI, Franciele Maria *et al.* Nanocomposites based on banana starch reinforced with cellulose nanofibers isolated from banana peels. **Journal of colloid and interface science**, [s. l.], v. 505, p. 154–167, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.JCIS.2017.05.106>. Acesso em: 23 fev. 2022.

POETA, Patrícia *et al.* Selection, engineering, and expression of microbial enzymes. **Enzymes in Human and Animal Nutrition: Principles and Perspectives**, [s. l.], p. 1–29, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-805419-2.00001-0>

POLIZELI, M. L.T.M. *et al.* Xylanases from fungi: properties and industrial applications. **Web of Science**, [s. l.], v. 67, n. 5, p. 577–591, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/S00253-005-1904-7>. Acesso em: 14 mar. 2022.

POP, Oana L. *et al.* Edible Films and Coatings Functionalization by Probiotic Incorporation: A Review. **Polymers 2020, Vol. 12, Page 12**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 12, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/POLYM12010012>. Acesso em: 28 mar. 2022.

PRASAD, P. *et al.* Miscibility, thermal, and mechanical studies of hydroxypropyl methylcellulose/pullulan blends. **Journal of Applied Polymer Science**, [s. l.], v. 110, n. 1, p. 444–452, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/APP.28575>. Acesso em: 17 out. 2021.

QIN, Yang *et al.* Characterization of starch nanoparticles prepared by nanoprecipitation: Influence of amylose content and starch type. **Industrial Crops**

**and Products**, [s. l.], v. 87, p. 182–190, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.INDCROP.2016.04.038>

R, Kizil; J, Irudayaraj; K, Seetharaman. Characterization of irradiated starches by using FT-Raman and FTIR spectroscopy. **Journal of agricultural and food chemistry**, [s. l.], v. 50, n. 14, p. 3912–3918, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/JF011652P>. Acesso em: 17 out. 2021.

RATNER, Buddy D.; HOFFMAN, Allan S. Non-Fouling Surfaces. **Biomaterials Science: An Introduction to Materials: Third Edition**, [s. l.], p. 241–247, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-087780-8.00025-5>

REALINI, Carolina E.; MARCOS, Begonya. Active and intelligent packaging systems for a modern society. **Meat Science**, [s. l.], v. 98, n. 3, p. 404–419, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.MEATSCI.2014.06.031>

RIBEIRO, Tânia B. *et al.* Total and Sustainable Valorisation of Olive Pomace Using a Fractionation Approach. **Applied Sciences 2020, Vol. 10, Page 6785**, [s. l.], v. 10, n. 19, p. 6785, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/APP10196785>. Acesso em: 11 ago. 2021.

ROBL, Diogo *et al.* Endophytic Actinomycetes as Potential Producers of Hemicellulases and Related Enzymes for Plant Biomass Degradation. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, [s. l.], v. 62, p. 19180337, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1678-4324-2019180337>. Acesso em: 14 mar. 2022.

ROMERO-GARCÍA, J. M. *et al.* Biorefinery based on olive biomass. State of the art and future trends. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 159, p. 421–432, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2014.03.062>

ROY, Kripa *et al.* Development and characterization of nano starch-based composite films from mung bean (*Vigna radiata*). **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 144, p. 242–251, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2019.12.113>

RUGGERI, Bernardo *et al.* The selection of pretreatment options for anaerobic digestion (AD): A case study in olive oil waste production. **Chemical Engineering Journal**, [s. l.], v. 259, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cej.2014.08.035>

RUIZ-MÉNDEZ, M. V. *et al.* Acidification of Alperujo paste prevents off-odors during their storage in open air. **JAOCs, Journal of the American Oil Chemists'**

**Society**, [s. l.], v. 90, n. 3, p. 401–406, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/S11746-012-2172-1>

SÁ, Nádia Maria dos Santos Matos. Utilização da fibra poda do cajueiro como fonte de lignina e nanocristais de celulose para incorporação em filmes de celulose bacteriana. [s. l.], 2020. Disponível em: <http://www.repositorio.ufc.br/handle/riufc/51663>. Acesso em: 23 fev. 2022.

SAHU, Parul; GUPTA, M. K. Sisal (Agave sisalana) fibre and its polymer-based composites: A review on current developments: <https://doi.org/10.1177/0731684417725584>, [s. l.], v. 36, n. 24, p. 1759–1780, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1177/0731684417725584>. Acesso em: 21 mar. 2022.

SALAM, Abdus *et al.* Crosslinked hemicellulose citrate-chitosan aerogel foams. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 84, n. 4, p. 1221–1229, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2011.01.008>

SAMUEL, Oluyamo Sunday; ADEFUSIKA, Adekoya Mathew. Influence of Size Classifications on the Structural and Solid-State Characterization of Cellulose Materials. **Cellulose**, [s. l.], 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.5772/INTECHOPEN.82849>. Acesso em: 14 mar. 2022.

SÁNCHEZ, Carmen. Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. **Biotechnology Advances**, [s. l.], v. 27, n. 2, p. 185–194, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.BIOTECHADV.2008.11.001>

SANTANA, Jamille Santos *et al.* Cassava starch-based nanocomposites reinforced with cellulose nanofibers extracted from sisal. **J. Appl. Polym. Sci**, [s. l.], p. 44637, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/app.44637>

SANTANA, Jamille Santos *et al.* Cassava starch-based nanocomposites reinforced with cellulose nanofibers extracted from sisal. **Journal of Applied Polymer Science**, [s. l.], v. 134, n. 12, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/APP.44637>. Acesso em: 9 jan. 2022.

SANTOS, Barbara Matias Moreira dos; PIZATO, Sandriane; CORTEZ-VEGA, William Renzo. Natural edible films and coatings applied in food: a bibliographic review. **Research, Society and Development**, [s. l.], v. 9, n. 9, p. e578997613–e578997613, 2020. Disponível em:

<https://doi.org/10.33448/RSD-V9I9.7613>. Acesso em: 28 mar. 2022.

SEGATO, Fernando *et al.* Genomics review of holocellulose deconstruction by aspergilli. **Microbiology and molecular biology reviews : MMBR**, [s. l.], v. 78, n. 4, p. 588–613, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/MMBR.00019-14>. Acesso em: 14 mar. 2022.

SELIGRA, Paula González *et al.* Biodegradable and non-retrogradable eco-films based on starch–glycerol with citric acid as crosslinking agent. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 138, p. 66–74, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2015.11.041>

SILVA, Rafael *et al.* Aplicações de fibras lignocelulósicas na química de polímeros e em compósitos. **Química Nova**, [s. l.], v. 32, n. 3, p. 661–671, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422009000300010>. Acesso em: 4 mar. 2022.

SILVEIRA, Maíra Patricio *et al.* Development of active cassava starch cellulose nanofiber-based films incorporated with natural antimicrobial tea tree essential oil. **Journal of Applied Polymer Science**, [s. l.], v. 137, n. 21, p. 48726, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/APP.48726>. Acesso em: 23 fev. 2022.

SILVESTRE, Isabella S.; BERGAMASCO, Rita de Cássia. Preparação e Caracterização de Nanofibras de Celulose a partir de Bagaço de Mandioca. **Revista Processos Químicos**, [s. l.], v. 11, n. 22, p. 95–100, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.19142/RPQ.V11I22.414>. Acesso em: 17 out. 2021.

SIMONATO, Barbara *et al.* Pasta fortification with olive pomace: Effects on the technological characteristics and nutritional properties. **LWT**, [s. l.], v. 114, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2019.108368>

SLUITER, A *et al.* Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass: Laboratory Analytical Procedure (LAP) (Revised July 2011). [s. l.], 2008. Disponível em: [http://www.nrel.gov/biomass/analytical\\_procedures.html](http://www.nrel.gov/biomass/analytical_procedures.html). Acesso em: 17 out. 2021.

SOCRATES, G. Infrared and Raman characteristic group frequencies. Tables and charts. **Journal of Raman Spectroscopy**, [s. l.], p. 347, 2001. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1002/jrs.1238>. Acesso em: 21 mar. 2022.

SOUZA, Roberta; ANDRADE, Cristina. **Investigação dos Processos de**

**Gelatinização e Extrusão de Amido de Milho.** [S. l.], 2000. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/po/a/wzcqGt865V6Fxy3DHGGMywN/?format=pdf&lang=pt>. Acesso em: 15 mar. 2022.

SOZER, Nesli; KOKINI, Jozef L. Nanotechnology and its applications in the food sector. **Trends in biotechnology**, [s. l.], v. 27, n. 2, p. 82–89, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.TIBTECH.2008.10.010>. Acesso em: 15 mar. 2022.

SQUINCA, Paula *et al.* Nanocellulose Production in Future Biorefineries: An Integrated Approach Using Tailor-Made Enzymes. **ACS Sustainable Chemistry and Engineering**, [s. l.], v. 8, n. 5, p. 2277–2286, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/ACSSUSCHEMENG.9B06790>

SUEIRO, Ana Claudia; FARIA-TISCHER, Paula C S; LONNI C E SUZANA MALI, Audrey A S G. FILMES BIODEGRADÁVEIS DE AMIDO DE MANDIOCA, PULULANA E CELULOSE BACTERIANA. **Quim. Nova**, [s. l.], v. 39, n. 9, p. 1059–1064, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.5935/0100-4042.20160118>. Acesso em: 15 mar. 2022.

TIAN, Yu *et al.* High-Performance Starch Films Reinforced With Microcrystalline Cellulose Made From Eucalyptus Pulp via Ball Milling and Mercerization. **Starch - Stärke**, [s. l.], v. 71, n. 3–4, p. 1800218, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/STAR.201800218>. Acesso em: 23 fev. 2022.

TIAN, Zhongjian *et al.* Dilute sulfuric acid hydrolysis of Pennisetum (sp.) Hemicellulose. **BioResources**, [s. l.], v. 12, n. 2, p. 2609–2617, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.15376/BIORES.12.2.2609-2617>

TIBOLLA, H. *et al.* Banana starch nanocomposite with cellulose nanofibers isolated from banana peel by enzymatic treatment: In vitro cytotoxicity assessment. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 207, p. 169–179, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2018.11.079>

TIBOLLA, Heloisa; PELISSARI, Franciele Maria; MENEGALLI, Florencia Cecilia. Cellulose nanofibers produced from banana peel by chemical and enzymatic treatment. **LWT - Food Science and Technology**, [s. l.], v. 59, n. 2P2, p. 1311–1318, 2014a. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2014.04.011>

TIBOLLA, Heloisa; PELISSARI, Franciele Maria; MENEGALLI, Florencia Cecilia. Cellulose nanofibers produced from banana peel by chemical and enzymatic

treatment. **LWT - Food Science and Technology**, [s. l.], v. 59, n. 2, p. 1311–1318, 2014b. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2014.04.011>

TORRES, C. E. *et al.* Enzymatic approaches in paper industry for pulp refining and biofilm control. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 96, n. 2, p. 327–344, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/S00253-012-4345-0>

TRAVALINI, Ana Paula *et al.* Cassava starch films reinforced with lignocellulose nanofibers from cassava bagasse. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 139, p. 1151–1161, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2019.08.115>

VASILEVA, Nastya *et al.* Immobilization of  $\beta$ -galactosidase on modified polypropilene membranes. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 51, n. 5, p. 710–719, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2012.07.032>

VIEGAS, Caroline *et al.* *Ciência Rural*, v.44, n.10, out. [s. l.], n. 10, p. 1874–1879, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20131139>. Acesso em: 14 mar. 2022.

VOLPATO, G.; RODRIGUES, R.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Use of Enzymes in the Production of Semi-Synthetic Penicillins and Cephalosporins: Drawbacks and Perspectives. **Current Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 17, n. 32, p. 3855–3873, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.2174/092986710793205435>

WANG, Yajun; CARUSO, Frank. Mesoporous silica spheres as supports for enzyme immobilization and encapsulation. **Chemistry of Materials**, [s. l.], v. 17, n. 5, p. 953–961, 2005. Disponível em: [https://doi.org/10.1021/CM0483137/ASSET/IMAGES/CM0483137.SOCIAL.JPEG\\_V03](https://doi.org/10.1021/CM0483137/ASSET/IMAGES/CM0483137.SOCIAL.JPEG_V03). Acesso em: 15 mar. 2022.

WILPISZEWSKA, Katarzyna; CZECH, Zbigniew. Citric acid modified potato starch films containing microcrystalline cellulose reinforcement - Properties and application. **Starch/Staerke**, [s. l.], v. 66, n. 7–8, p. 660–667, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/STAR.201300093>

WREGGE, MARCOS SILVEIRA *et al.* DISTRIBUIÇÃO POTENCIAL DE OLIVEIRAS NO BRASIL E NO MUNDO. **Revista Brasileira de Fruticultura**, [s. l.], v. 37, n. 3, p. 656–666, 2015. Disponível em:

<https://doi.org/10.1590/0100-2945-174/14>. Acesso em: 25 jul. 2021.

WU, Lin Mei *et al.* Fourier transform infrared spectroscopy analysis for hydrothermal transformation of microcrystalline cellulose on montmorillonite. **Applied Clay Science**, [s. l.], v. 95, p. 74–82, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.CLAY.2014.03.014>

XU, Feng *et al.* Qualitative and quantitative analysis of lignocellulosic biomass Qualitative and quantitative analysis of lignocellulosic biomass using infrared techniques: A mini-review using infrared techniques: A mini-review “Qualitative and quantitative analysis of lignocellulosic biomass using infrared techniques: A mini-review” (2013). Publications from USDA-ARS / UNL Faculty Qualitative and quantitative analysis of lignocellulosic biomass using infrared techniques: A mini-review. [s. l.], 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2012.12.019>. Acesso em: 24 set. 2021.

XU, Yuan; ATRENS, Aleks; STOKES, Jason R. A review of nanocrystalline cellulose suspensions: Rheology, liquid crystal ordering and colloidal phase behaviour. **Advances in Colloid and Interface Science**, [s. l.], v. 275, p. 102076, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.CIS.2019.102076>

YANG, Yan *et al.* Environmentally Friendly Processing of Transparent Optical Ceramics. **Green and Sustainable Manufacturing of Advanced Materials**, [s. l.], p. 497–548, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-411497-5.00018-7>

ZHANG, Yi Heng Percival; LYND, Lee R. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: Noncomplexed cellulase systems. **Biotechnology and Bioengineering**, [s. l.], v. 88, n. 7, p. 797–824, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/BIT.20282>

ZIMBARDI, Ana L.R.L. *et al.* Optimization of  $\beta$ -Glucosidase,  $\beta$ -Xylosidase and Xylanase Production by *Colletotrichum graminicola* under solid-state fermentation and application in raw sugarcane trash saccharification. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 14, n. 2, p. 2875–2902, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/IJMS14022875>

ZINK, Trevor; GEYER, Roland. Circular Economy Rebound. **Journal of Industrial Ecology**, [s. l.], v. 21, n. 3, p. 593–602, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/JIEC.12545>

## **9. APÊNDICE**

### **9.1. Hidrólise enzimática**

A determinação da atividade enzimática, bem como das condições ideais de hidrólise permitem o conhecimento sobre as propriedades da enzima e a previsão da quantidade de produto obtido ao final do processo. As figuras abaixo (FIG 33) mostram as curvas de calibração utilizadas para a determinação da atividade de hemicelulase (xilanase) e de celulase (endoglucanase) no preparo comercial (Pentopan mono BG).



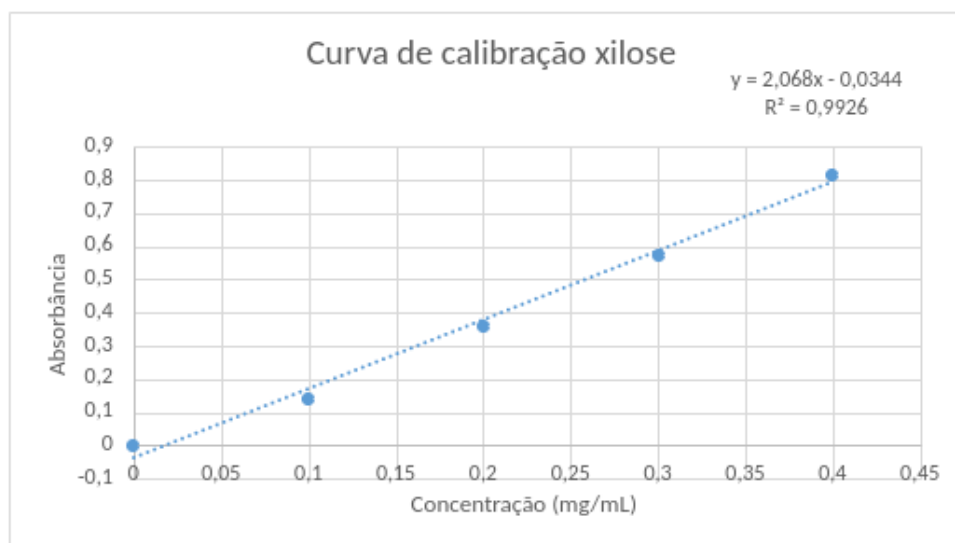


Figura 33: Curva de calibração da xilose

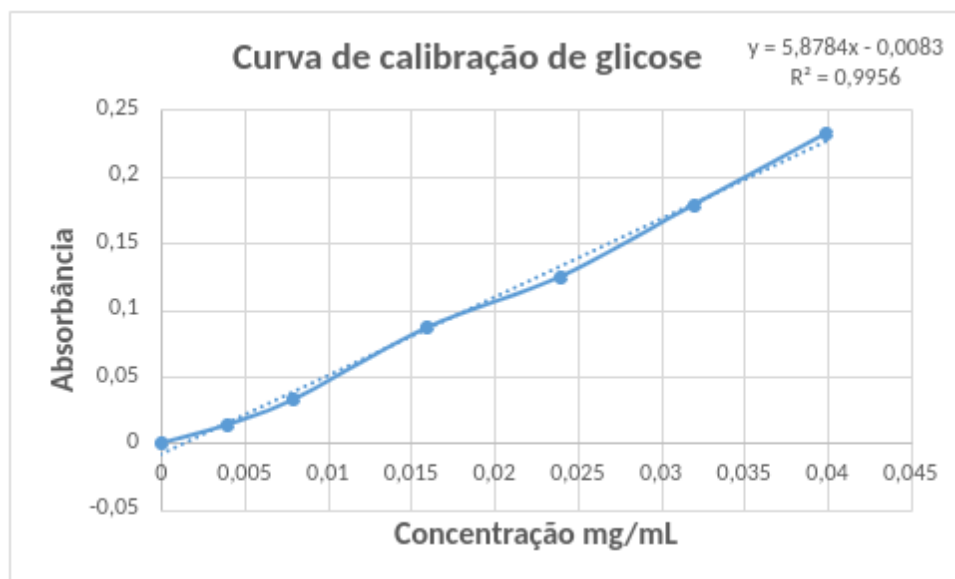


Figura 34: Curva de calibração de glicose