



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

ELÍGENES SAMPAIO DO NASCIMENTO

**FILMES NANOCOMPÓSITOS À BASE DE CELULOSE BACTERIANA E
NANOCRISTAIS DE CELULOSE**

FORTALEZA
2018

ELIGENES SAMPAIO DO NASCIMENTO

FILMES NANOCOMPÓSITOS À BASE DE CELULOSE BACTERIANA E
NANOCRISTAIS DE CELULOSE

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Engenharia Química. Área de Concentração: Processos Químicos e Bioquímicos.

Orientadora: Dra. Morsyleide de Freitas Rosa

Coorientadora: Dra. Henriette Monteiro Cordeiro de Azeredo

FORTALEZA
2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a)
autor(a)

- D66f Nascimento, Eligenes Sampaio do.
Filmes nanocompósitos à base de celulose bacteriana e nanocristais de celulose /
Eligenes Sampaio do Nascimento. – 2018.
50 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Tecnologia,
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Fortaleza, 2018.
Orientação: Profa. Dra. Morsyleide de Freitas Rosa.
Coorientação: Profa. Dra. Henriette Monteiro Cordeiro de Azeredo.
1. Embalagens biodegradáveis. 2. celulose bacteriana. 3. embalagens alimentares.
4. all cellulose composite. I. Título.

CDD 660

ELIGENES SAMPAIO DO NASCIMENTO

FILMES NANOCOMPÓSITOS À BASE DE CELULOSE BACTERIANA E
NANOCRISTAIS DE CELULOSE

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Engenharia Química. Área de Concentração: Processos Químicos e Bioquímicos.

Aprovada em: 12 de Março de 2018

BANCA EXAMINADORA

Dra. Morsyleide de Freitas Rosa (orientadora)
Embrapa Agroindústria Tropical

Dra. Fabia Karine Andrade
Universidade Federal do Ceará - UFC

Dr. Edy Sousa de Brito
Embrapa Agroindústria Tropical

Dr. Men de Sá Moreira de Souza Filho
Embrapa Agroindústria Tropical

Dr. Bartolomeu Warlene Silva de Souza
Universidade Federal do Ceará - UFC

A Deus

Ao meu esposo Edney

À minha mãe Raquel

AGRADECIMENTOS

Agradeço a DEUS, por me abençoar, me guiar e me capacitar para mais essa conquista;

Ao meu querido esposo Edney, por sonhar meus sonhos junto comigo e compreender cada segundo que passei ausente dedicado aos meus estudos;

À minha mãe Raquel, minha amiga e parceira, que sempre me incentivou em minhas escolhas e que me ensinou a dar o verdadeiro valor à vida;

À Dra. Morsyleide, um exemplo de ser humano, pela paciência e compreensão, e por todos os ensinamentos que levarei para a vida. Muito obrigada por sua orientação e pelo voto de confiança!

À Dra. Henriette pela co-orientação, paciência e dedicação no desenvolvimento deste trabalho;

Ao Dr. Mén de Sá e à Dra. Fábila pelos sábios conselhos e ajudas nos momentos em que mais precisava, trazendo sempre boas ideias para o crescimento do trabalho;

Ao amigo Helder e amiga Janaína pelo compartilhamento dos momentos de estudo, alegrias, angústias e principalmente pela amizade construída e consolidada, durante nosso doutorado sanduíche;

Aos amigos, Anabela, Paulo Ivo, Augusto Castro e Maria Emília por se tronarem minha família e me ajudar em momentos tão especiais e saudosos da minha vida em Portugal;

Aos amigos de laboratório da Universidade do Minho e Laboratório Internacional Ibérico de Nanotecnologia – INL;

À Dra. Catarina Gonçalves, ao Dr. Miguel Cerqueira, ao Prof. Dr. Miguel Gama e Ms. Beatriz Pereira pelo apoio e amizade durante o doutorado sanduíche em Portugal;

À Lilian e ao Adriano, pela amizade e grande dedicação no dia-a-dia do laboratório, em cada análise, em cada equipamento, colaborando e cuidando, sempre, para que tudo acontecesse da melhor forma;

Aos amigos do LTB: Pedro Melo, Jessica Almeida, Yana Luck, Marque Neto, Nayane, Halisson, Nágila, Vivi, Halisson, Menta, Gaby, Niédja, André pelos momentos compartilhados no dia a dia;

À equipe do laboratório de Microbiologia de Alimentos da Embrapa, na pessoa da Dra. Fatima Borges;

*À Embrapa Agroindústria Tropical pelo apoio técnico e infra-estrutura;
Ao CNPq, CAPES e Funcap pelo apoio financeiro.*

“Não sabendo que era impossível, ela foi lá e fez”

Jean Cocteau

RESUMO

Um dos problemas ambientais mais graves que a sociedade atual enfrenta é a poluição causada, principalmente, por embalagens para alimentos produzidas de fontes não biodegradáveis. Nesse sentido, há uma atenção voltada para uso de materiais biopoliméricos na produção de sistemas nanocompósitos ambientalmente corretos, como, por exemplo, a celulose bacteriana. A celulose bacteriana (CB) é atóxica, biocompatível, biodegradável, além de possuir uma rede tridimensional naturalmente nanométrica, que lhe confere alta cristalinidade e resistência mecânica, propriedades que qualificam a CB como um material promissor para aplicação em nanocompósitos. O objetivo deste estudo foi, a partir de uma abordagem de desintegração da celulose bacteriana, elaborar filmes nanocompósitos *all cellulose* por meio de rotas de desintegração química e física para obtenção de nanocristais e nanofibrilas, respectivamente. Adicionalmente, avaliou-se o emprego dos nanocristais na suspensão filmogênica para produção dos filmes, bem como, o emprego do ultrassom na sua dispersão. Os filmes foram caracterizados química, física e morfologicamente, bem como quanto à sua citotoxicidade *in vitro* considerando uma futura aplicação em embalagens de alimentos. O processo de obtenção das nanofibras apresentou um rendimento de 89%. As nanofibras apresentaram um alto índice de cristalinidade (84%), boa estabilidade de suspensão (Zeta = -58 mV) morfologia característica de CB, com 41% de redução na largura das nanofibras (40 nm). Os filmes *all cellulose composite* apresentaram-se opacos e de aparência amarelada, hidrofílicos, insolúveis em água - com matéria insolúvel variando de 88 a 93% - alta cristalinidade (média de índice de cristalinidade = 84%), boa estabilidade térmica, resistentes, rígidos, com pouca deformação e não tóxicos para células Caco-2. Os resultados obtidos mostraram que é possível combinar oxidação mediada pelo radical TEMPO e misturador de alta rotação para obter nanofibras de celulose, bem como, a partir da celulose bacteriana oxidada nanofibrilada (CBOXNF) produzir filmes com características excepcionais sem adição de nanocristais de celulose, podendo reduzir os custos de produção, tornando-se um material ainda mais atrativo.

Palavras-chave: embalagens biodegradáveis, celulose bacteriana, embalagens alimentares, *all cellulose composite*

ABSTRACT

One of the most serious environmental problems facing society today is pollution mainly caused by packaging for food produced from non-biodegradable sources. In this sense, attention is focused on the use of biopolymer materials in the production of environmentally correct nanocomposite systems, such as bacterial cellulose. The bacterial cellulose (CB) is non-toxic, biocompatible, biodegradable, and has a naturally nanosized three-dimensional network, which gives it high crystallinity and mechanical resistance, properties that qualify CB as a promising material for application in nanocomposites. The objective of this study was to develop nanocomposite films of all cellulose by means of chemical and physical disintegration routes to obtain nanocrystals and nanofibrils, respectively, from a bacterial cellulose disintegration approach. Additionally, the use of nanocrystals in the film-forming suspension for film production was evaluated, as well as the use of ultrasound in their dispersion. The films were characterized chemically, physically and morphologically, as well as their *in vitro* cytotoxicity considering a future application in food packaging. The nanofibers presented a high crystallinity index (84%), good suspension stability (Zeta = -58 mV), characteristic morphology of CB, with a 41% reduction in width of the nanofibers (40 nm). The all cellulose composite films were opaque and yellowish-looking, hydrophilic, insoluble in water - insoluble matter ranging from 88 to 93% - high crystallinity (mean crystallinity index = 84%), good thermal stability, resistant, rigid, with little deformation and non-toxic to Caco-2 cells. The results showed that it is possible to combine TEMPO radical-mediated oxidation and high-rotation mixer to obtain cellulose nanofibers, as well as, from nanofibrillated oxidized bacterial cellulose (CBOXNF), to produce films with exceptional characteristics without the addition of cellulose nanocrystals, which can reduce production costs, making it an even more attractive material.

Keywords: biodegradable packaging, bacterial cellulose, food packaging, *all cellulose composite*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Estrutura da parede celular da celulose vegetal	21
Figura 2 -	Estrutura hierárquica da formação da CB	24
Figura 3 -	Estruturas cristalinas da celulose nativa.A) Apresenta a estrutura triclinica da celulose I α e B) Apresenta a estrutura monoclinica da celulose I β	26
Figura 4 -	Sobremesa comercializada a base de CB conhecida com nata de côco	27
Figura 5 -	Nanoestruturas obtidas por desintegração da CB por processo químico e/ou físico	28
Figura 6 -	À esquerda: representação de como são os aglomerados de NCC. À direita: nanocristais dispersos após tratamento da suspensão com ultrassom	31
Figura 7 -	Mecanismo de ação da oxidação regioseletiva de hidroxilas primárias do carbono C6, em grupos carboxilatos por oxidação TEMPO/ NaBr/NaClO em pH 10 11	33
Figura 8 -	Esquema de obtenção da CBOXNF a partir da CB oxidada a TEMPO utilizando homogeneizador de alta rotação	40
Figura 9 -	Curva de titulação condutimétrica de CB oxidada a TEMPO ...	42
Figura 10 -	Esquema de obtenção dos filmes all cellulose composite a partir de CB desintegrada	45
Figura 11 -	Esquema das principais tarefas realizadas na terceira etapa nos filmes all cellulose composite ultrassonicados	49
Figura 12 -	Esquema resumo das principais tarefas realizadas na obtenção dos filmes all cellulose composite	54
Figura 13 -	Curvas termogravimétrica (A) e curvas derivadas (B) correspondentes à análise térmica da celulose bacteriana (CB) sem modificação química, celulose bacteriana oxidada a TEMPO (CBOX) e celulose bacteriana oxidada nanofibrilada (CBOXNF)	58
Figura 14 -	Espectros de FTIR da celulose bacteriana (CB) sem modificação química, celulose bacteriana oxidada a TEMPO (CBOX) e celulose bacteriana oxidada nanofibrilada (CBOXNF)	59

Figura 15 - Difratoogramas de Raios-X correspondentes aos picos cristalinos da celulose bacteriana (CB) sem modificação química, celulose bacteriana oxidada a TEMPO (CBOX) e celulose bacteriana oxidada nanofibrilada (CBOXNF) e seus respectivos índices de cristalinidade	60
Figura 16 - Micrografias representando a morfologia da celulose bacteriana sem modificação química (CB), celulose bacteriana e celulose bacteriana oxidada nanofibrilada (CBOXNF)	62
Figura 17 - Caracterização dos nanocristais de CB. A) curvas TG e DTG da análise termogravimétrica B) Difratoogramas de Raios-X C) Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier - FTIR D) Microscopia eletrônica de transmissão – MET	64
Figura 18 - Difratoogramas de Raios-X de all cellulose composite A) sem uso do ultrassom: ACC 0%, ACC 2,5%, ACC 5% e ACC 7,5%, (B) com uso do ultrassom: ACCU 0%, ACCU 2,5%, ACCU 5% e ACCU 7,5% e (C) celulose bacteriana íntegra	66
Figura 19 - Espectros FTIR dos filmes all cellulose composite (A) sem uso do ultrassom: ACC 0%, ACC 2,5%, ACC 5% e ACC 7,5%, (B) com uso do ultrassom: ACCU 0%, ACCU 2,5%, ACCU 5% e ACCU 7,5% e (C) celulose bacteriana íntegra	67
Figura 20 - Curvas termogravimétricas (TG) e curvas derivadas (DTG) para filmes all cellulose composite (A) sem uso do ultrassom: ACC 0%, ACC 2,5%, ACC 5% e ACC 7,5%, (B) com uso do ultrassom: ACCU 0%, ACCU 2,5%, ACCU 5% e ACCU 7,5% e (C) celulose bacteriana íntegra	68
Figura 21- Imagens de microscopia eletrônica de varredura dos filmes all cellulose composite. A1 - ACC 0%, A2 – ACC 2,5%, A3 – ACC 5%, A4 – ACC 7,5% e B1 – ACCU 0%, B2 – ACCU 2,5%, B3 – ACCU 5%, B4 – ACCU 7,5%. Todas a imagens possuem ampliação de 10000x	71
Figura 22 - Filmes ACCU com 0, 2,5, 5 e 7,5 % de nanocristais de CB ...	71
Figura 23 - Filmes ACCU antes da análise de solubilidade (A) e depois de 24 horas, sob agitação e imersos em água (B)	73

- Figura 24 - Representação das medidas de ângulo de contato em filmes all cellulose composite ultrassonicados ACCU 0%, ACCU 2,5%, ACCU 5%, ACCU 7,5% no momento em que a gota toca a superfície do filmes 75
- Figura 25- Porcentagem de viabilidade celular em relação às células (Caco-2) cultivadas em meio de cultura avaliado através do teste de Presto Blue após 24h e 48 h de incubação com filmes de celulose com sonicação em diferentes concentrações (0,5mg/mL e 2,0 mg/mL). O DMSO (30%) foi usado como controle positivo 77

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Características dos ACC obtidos a partir de diferentes métodos, solventes e fontes de celulose 37
- Tabela 2 - Temperatura de degradação inicial (Tonset) e temperatura máxima de degradação (T_{máx}), percentuais de perda de massa e cinzas da CB, CBOX e CBOXNF..... 58
- Tabela 3 - Média das Temperaturas de degradação inicial (Tonset) temperaturas máxima de degradação (T_{max}), percentuais de perda de massa e cinzas dos filmes all cellulose composite sem uso do ultrassom: ACC 0%, ACC 2,5%, ACC 5% e ACC 7,5%, com uso do ultrassom: ACC 0%, ACC 2,5%, ACC 5% e ACC 7,5%, com uso do ultrassom: ACCU 0%, ACCU 2,5%, ACCU 5% e ACCU 7,5% e celulose bacteriana íntegra68
- Tabela 4 - Propriedades de all cellulose composite sem sonicação (ACC 0%, ACC 2,5%, ACC 5%, ACC 7,5%) e com sonicação (ACCU 0%, ACCU 2,5%, ACCU 5%, ACCU 7,5%). σ (resistência à tração), ϵ (alongação a ruptura), Y (módulo de elasticidade)68
- Tabela 5 - Permeabilidade ao vapor de água (PVA), Percentual de matéria insolúvel (MI), ângulo de contato (AC) e opacidade (Y) em filmes ACCU0%, ACCU 2,5%, ACCU 5%, ACCU 7,5%72

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	OBJETIVOS	20
2.1	Objetivo Geral	20
2.2	Objetivos Específicos	20
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
3.1	Celulose	21
3.2	Celulose Bacteriana	22
3.2.1	<i>Definição</i>	22
3.2.2	<i>Síntese</i>	22
3.2.3	<i>Aplicações da Celulose Bacteriana</i>	26
3.3	Nanocelulose	28
3.3.1	<i>Celulose Nanocristalina</i>	29
3.3.2	<i>Celulose Nanofibrilada</i>	31
3.3.2.1	<i>Oxidação mediada pelo radical TEMPO</i>	32
3.4.	Nanocompósito	34
3.4.1	<i>All-Cellulose Composite</i>	35
3.5	Embalagens	38
4	METODOLOGIA	40
4.1	Materiais	40
4.2	Métodos	41
4.2.1	<i>Preparação das películas de CB</i>	41
4.2.2	<i>Oxidação mediada por TEMPO</i>	41
4.2.2.1	<i>Determinação do conteúdo de carboxilato na CBOx</i>	41
4.2.2.2	<i>Nanofibrilação da CBOx</i>	42
4.2.2.3	<i>Rendimento do processo de obtenção das nanofibras de CB</i> ...	43
4.2.2.4	<i>Liofilização e Redispersão da CBOXNF</i>	43
4.3	Caracterização da CB, CBOX E COXNF	43
4.3.1	<i>Análise Termogravimétrica (TGA)</i>	43
4.3.2	<i>Espectroscopia no Infravermelho por transformada de Fourier</i>	43
4.3.3	<i>Difração de Raios-X</i>	44
4.3.4	<i>Potencial Zeta</i>	44

4.3.5	Análise Turbidimétrica	44
4.3.6	Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) e Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	45
4.4	Obtenção e Rendimento dos Nanocristais de Celulose Bacteriana (NCCB)	45
4.5	Preparação dos Filmes All Cellulose Composite	46
4.6	Caracterização dos NCCB e Filmes All Cellulose Composite	47
4.6.1	NCCB	47
4.6.2	Filmes all cellulose composite	47
4.6.2.1.	<i>Difração de raios X (XRD)</i>	48
4.6.2.2	<i>Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier – FTIR</i>	48
4.6.2.3	<i>Análise Termogravimétrica</i>	48
4.6.2.4	<i>Propriedades Mecânicas</i>	48
4.6.2.5	<i>Microscopia Eletrônica de Varredura – MEV</i>	49
4.6.2.6	<i>Permeabilidade ao vapor de água (PVA)</i>	50
4.6.2.7	<i>Solubilidade em água</i>	50
4.6.2.8	<i>Hidrofobicidade de superfície</i>	51
4.6.2.9	<i>Cor e Opacidade</i>	51
4.7	Avaliação de Citotoxicidade Utilizando Células Epiteliais Intestinais	51
4.7.1	Cultura celular	51
4.7.2	Citotoxicidade - viabilidade celular através do ensaio de resazurina	52
4.8	Análise Estatística	53
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
5.1	Quantificação de Carboxilato na CB Oxidada a TEMPO	55
5.2	Rendimento do Processo de Obtenção das Nanofibras de CB	55
5.3	Caracterização CB, CBOX, CBOXNF E CBOXNFL	56
5.3.1	Potencial Zeta	56
5.3.2	Análise Termogravimétrica – TGA	57

5.3.3	<i>Espectroscopia no Infravermelho por transformada de Fourier</i>	59
5.3.4	<i>Difração de Raios-X</i>	59
5.3.5	<i>Microscopia Eletrônica de varredura (MEV) e Microscopia eletrônica de transmissão (MET)</i>	61
5.3.6	<i>Caracterização e Rendimento dos Nanocristais de CB ..</i>	62
5.4.	<i>Caracterizações dos Filmes ACC E ACCU</i>	65
5.4.1	<i>Difração de Raios-X</i>	65
5.4.2	<i>Espectroscopia no Infra-vermelho por transformadada de Fourier – FTIR</i>	66
5.4.3	<i>Análise Termogravimétrica – TGA</i>	67
5.4.4	<i>Propriedades Mecânicas</i>	68
5.4.5	<i>Microscopia Eletrônica de Varredura – MEV.....</i>	70
5.5	<i>Caracterização dos Filmes All Cellulose Composite Ultrassonicados</i>	71
5.5.1	<i>Permeabilidade ao vapor de água (PVA)</i>	71
5.5.2	<i>Solubilidade em água</i>	73
5.5.3	<i>Ângulo de Contato (AC) e Opacidade</i>	74
5.6	<i>Avaliação da Citotoxicidade</i>	75
5.6.1	<i>Viabilidade celular através do ensaio de resazurina</i>	75
6	CONCLUSÕES	78
	REFERÊNCIAS	80

1 INTRODUÇÃO

A tecnologia de embalagem desempenha um papel preponderante na indústria alimentar, onde o desenvolvimento de novos sistemas com características biodegradáveis representa uma vantagem científica e tecnológica francamente competitiva. Produtos naturais e funcionais têm sido, cada vez mais, uma exigência do consumidor nas últimas décadas e direcionam a indústria atual a buscar novas alternativas tecnológicas para reduzir a geração de lixo não biodegradável, grande parte do qual resulta do descarte de embalagens de alimentos, geralmente produzidas a partir de polímeros derivados de petróleo (AZEREDO; ROSA; MATTOSO, 2017). Nesse contexto, a celulose bacteriana (CB), descoberta há dois séculos, tem atraído cada vez mais a atenção de pesquisadores em campos acadêmicos e industriais (CACICEDO et al., 2016).

A CB é um tipo de celulose que apresenta morfologia naturalmente nanométrica produzida por bactérias do gênero *Komagataeibacter* (antigo *Gluconacetobacter*), *Agrobacterium*, *Rizobium* e *Sarcina* a partir da fermentação de meios ricos em açúcar e nitrogênio orgânico (RUKA; SIMON; DEAN, 2014; YAMADA et al., 2012a, 2012b). É sintetizada em forma de uma rede tridimensional composta por cadeias glicosídicas lineares ligadas por pontes de hidrogênio intra e intermoleculares, organizadas em nanofibras com 40-70 nm de diâmetro (ESA; TASIRIN; RAHMAN, 2014; RUKA; SIMON; DEAN, 2014; UL-ISLAM; KHAN; PARK, 2012). A CB tem como características uma área superficial elevada, alto índice de cristalinidade, alta resistência à tração, alto grau de polimerização, boa estabilidade térmica e alta capacidade de retenção de água, é atóxica, não alergênica, biodegradável e biocompatível, permitindo sua aplicação em diferentes segmentos, incluindo indústria têxtil, indústria alimentícia, aparelhos eletroacústicos, biomedicina, odontologia, e como reforço na indústria de papel. (CACICEDO et al., 2016; KINGKAEW et al., 2014; QIU; NETRAVALI, 2014; SANTOS et al., 2014; SHI et al., 2014).

O método majoritário de obtenção da CB é em forma de uma película gelatinosa; por isso, a deseintegração e/ou modificação, química ou física, para obtenção nanoestruturas, agrega versatilidade e expande ainda mais o leque de

aplicações da CB (HU et al., 2014; LIN et al., 2015; RAMBABU et al., 2016; SONI et al., 2016).

Uma possibilidade de aplicação da CB desintegrada é o *all cellulose composite*. Uma nova classe de biocompósitos à base de celulose que utiliza celulose tanto na matriz como para reforço e são designados como compósitos de polímero único baseados em celulose. É um material que apresenta forte interação química na interface reforço-matriz e, conseqüentemente, propriedades mecânicas superiores (HUBER et al., 2012)

Assim, o objetivo deste estudo foi estabelecer uma metodologia para desintegrar celulose bacteriana usando uma combinação de oxidação mediada pelo radical 2,2,6,6-tetrametil-1-piperidinoxilo (TEMPO) e misturador de alta rotação para obtenção de celulose nanofibrilada para possíveis aplicações em embalagens para alimentos, bem como produzir filmes *all cellulose composite* utilizando celulose bacteriana nanofibrilada como matriz e nanocristais de celulose bacteriana como carga, avaliar o emprego do ultrassom na dispersão das nanoestruturas, avaliar a citotoxicidade dos filmes obtidos, além de avaliar as características químicas, morfológicas, mecânicas, de transporte, ópticas e hidrofóbicas dos filmes obtidos.

2 OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Obter filmes *all cellulose composite* a partir da desintegração de celulose bacteriana.

2.2. Objetivos específicos

- Estabelecer rota para obtenção de celulose bacteriana nanofibrilada a partir da combinação de oxidação mediada a TEMPO e homogeneizador de alta rotação.
- Avaliar o emprego do ultrassom na dispersão dos nanocristais na suspensão filmogênica.
- Caracterizar os filmes *all cellulose composite* quanto a características químicas, físicas, morfológicas e avaliar a citotoxicidade.

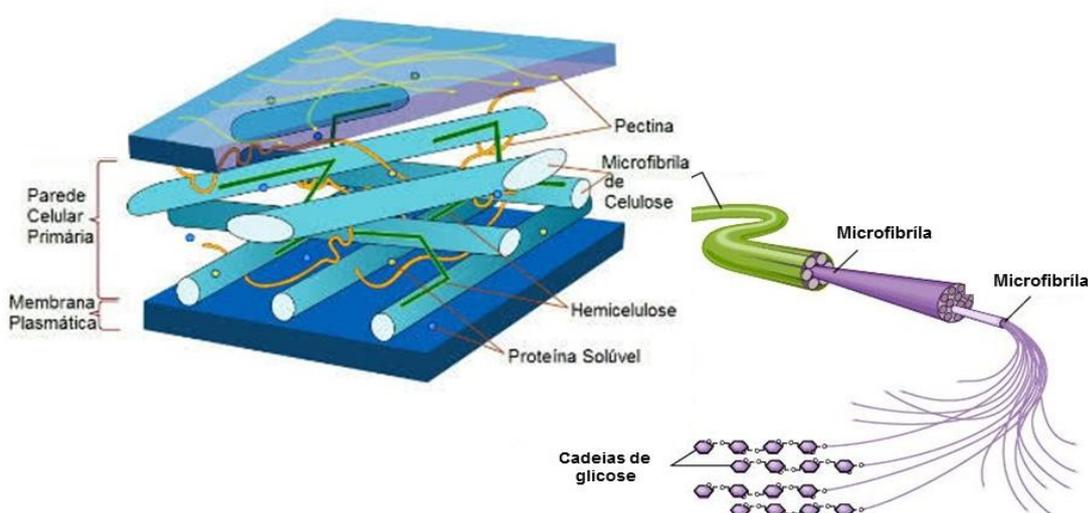
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Celulose

Celulose é o principal polímero da terra e possui uma grande importância na economia mundial (KESHK, 2014). No Brasil, desde os anos 60, é constante o crescimento da produção de celulose, atingindo, em 2016, volume de produção na ordem de $1,8 \times 10^{12}$ ton. (FUNCHAL, 2014; SERRO, 2016). O estudo sistemático da química da celulose foi primeiramente realizado pelo francês Anselm Payen, de 1837 a 1842, quando descobriu que todas as plantas jovens possuem uma substância fibrosa com uma substância química que a academia francesa denominou de celulose (SUHAS et al., 2016).

Caracterizada como homopolímero de alta massa molar, a celulose é formada por ligações do tipo β -1,4 de unidade de D-glicose deslocada 180° com relação a seus vizinhos, e o segmento de repetição é frequentemente considerado um dímero de glicose, denominado de celobiose. Essas ligações formam fibras compactas que constituem a parede celular (Figura 1) dos vegetais, juntamente com lignina, hemicelulose.

Figura 1 - Estrutura da parede celular da celulose vegetal.



Fonte: www.todamateria.com.br/paredecelular

As fontes predominantes de celulose incluem madeira e algodão; entretanto, a celulose pode também ser obtida de diferentes partes de plantas,

algas, invertebrados e bactérias. Quando produzida unicamente por bactérias, a celulose é denominada celulose bacteriana (CB).

3.2. Celulose Bacteriana

3.2.1. Definição

Descoberta pela primeira vez há dois séculos por Brown (BROWN, 1886), a CB vem sendo bastante explorada nas últimas décadas pela comunidade científica (CACICEDO et al., 2016). Com a mesma fórmula química ($C_6H_{10}O_5$) da celulose extraída de plantas, a CB é produzida através de fermentação oxidativa de meio rico em nutrientes, por bactérias do gênero *Agrobacterium*, *Rhizobium*, *Sarcina* e *Komagataeibacter* (antiga *Glucnacetobacter*) este último é o principal gênero produtor (ESA; TASIRIN; RAHMAN, 2014). O processo de obtenção através de fermentação a diferencia da celulose vegetal (CV) principalmente por ser obtida pura, livre de lignina, hemiceluloses e outros componentes constituintes da parede celular das plantas.

A CB possui excelentes propriedades mecânicas e organolépticas que permitem suas aplicações tanto na área alimentar, como aditivo, bem como componentes de embalagens para alimentos (PADRÃO et al., 2016; SHI et al., 2014). Visando as aplicações em que a CB pode ser inserida, muitos estudos, atualmente, buscam a diminuição dos custos de produção e aumento do rendimento da CB através do uso de meios alternativos ao meio sintético utilizado (BAE; SHODA, 2004; BUDHIONO et al., 1999; CARREIRA, 2010; KESHK; SAMESHIMA, 2005).

3.2.2. Síntese

As propriedades estruturais da CB são fortemente influenciadas pela nanoestrutura do material, característica que está diretamente ligada ao tipo de bactéria utilizada na fermentação (ZENG; LAROMAINE; ROIG, 2014). As bactérias produtoras de CB comumente utilizadas são da família *Acetobacteraceae* e, em particular, pertencem ao gênero *Komagataeibacter*, *Agrobacterium*, *Rhizobium* e *Sarcina* (CAMPANO et al., 2016; KUMBHAR; RAJWADE; PAKNIKAR, 2015; RUKA; SIMON; DEAN, 2014; TSOUKO et al., 2015). Entretanto, os principais produtores de celulose pertencem ao gênero

Komagataeibacter, recentemente criado por reclassificação do gênero *Gluconacetobacter* com base na filogenia da sequência rRNA 16S e nas características fenotípicas, ecológicas e quimiotaxinômicas (YAMADA, 2014).

Essas bactérias são Gram-negativas e possuem crescimento em faixa de pH de 2 a 6, com temperatura variando entre 28 e 30°C, vivem principalmente em frutas e vegetais em decomposição, e são capazes de converter fontes comuns de carbono como glicose, glicerol, sacarose, frutose, manitol, entre outros em celulose em poucos dias, além de serem estritamente aeróbicas e não fotossintéticas (CACICEDO et al., 2016). Quimicamente a CB possui composição igual à celulose extraída de plantas. Ambas são um polímero linear de unidades de β -D- glucopiranosose ligadas entre si por ligações glicosídicas β -1,4; entretanto, em termos estruturais, as cadeias poliméricas de CB são mais curtas e mais ordenadas espacialmente que a CV pelo que sua cristalinidade é mais elevada.

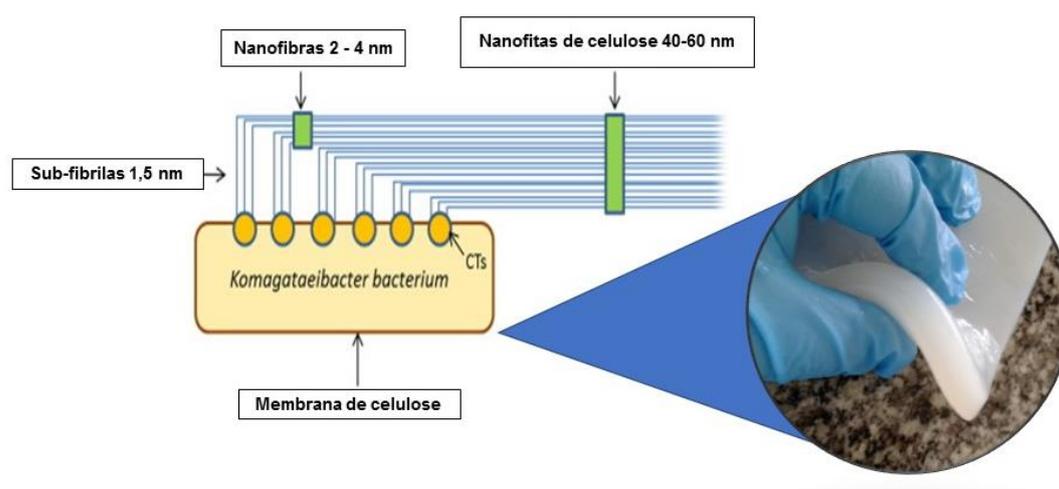
A CB pode ser produzida por processo fermentativo estático ou agitado. A fermentação estática leva à produção de uma película de aspecto gelatinoso que flutua na superfície do meio de cultura, enquanto o processo de fermentação agitado a CB apresenta-se em forma de esferas (ANDRADE et al., 2010). Em um processo, a melhor forma de produção, a ser estabelecida, dependerá da aplicação que será dada às membranas de CB.

A CB desempenha um papel muito importante para a bactéria, pois funciona como mecanismo de flotação, permitindo ao micro-organismo permanecer em uma interface ar/liquido para obter oxigênio com maior facilidade para seu metabolismo, além de prevenir a desidratação do substrato devido ao seu caráter higroscópico (DONINI et al., 2010). A película funciona também como proteção contra a radiação UV, metais pesados, melhora o transporte de nutrientes e ajuda na adesão celular durante interações simbióticas (BUDHIONO et al., 1999).

Nos micro-organismos, a celulose é secretada em duas etapas intermediárias. A primeira é a formação das cadeias de 1,4 β -glicano e a segunda é a montagem e cristalização das cadeias. O processo de formação das cadeias de celulose ocorre entre as membranas interna e citoplasmática das células

(BOLDRIN, 2015). A bactéria possui enzimas capazes de ligar moléculas individuais de glicose entre si, formando longas cadeias de celulose. Estas cadeias são expelidas da célula através de 100 poros especializados, existentes na sua membrana celular. Essas cadeias agrupam-se através de ligações do tipo pontes de hidrogênio, em conjunto com 37 unidades que formam subfibrilas de 1,5 nm. Estas subfibrilas são montadas em nanofibrilas de aproximadamente 2 a 4 nm de diâmetro, compostas por 10-250 cadeias poliméricas únicas. Essas cadeias poliméricas possuem comprimento de 1-9 nm e podem conter de 18000 até 20 000 unidades de glicose organizadas em nanofitas de 40 a 80 nm de largura. As fibras de celulose assim dispersas no meio de cultura formam um filme gelatinoso (Figura 2) que flutua à superfície e serve como matriz de suporte ao crescimento da população bacteriana (CACICEDO et al., 2015; KLEMM et al., 2005).

Figura 2 - Estrutura hierárquica da formação da CB



Fonte: Adaptado de Cacicedo et al 2015

As microfibrilas que compõem as fibras, resultantes do arranjo das moléculas de celulose, são constituídas de regiões cristalinas, altamente ordenadas, e amorfas, desordenadas. As regiões amorfas são resultado da má formação da estrutura devido à alteração no processo de cristalização. As regiões cristalinas são resultado da ação combinada da biopolimerização e cristalização da celulose comandada por processos enzimáticos. (DE JESUS SILVA; D'ALMEIDA, 2009).

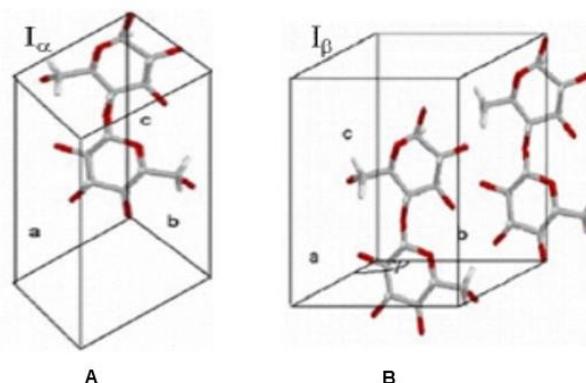
Nas regiões cristalinas existe um arranjo geométrico, com dimensões bem definidas, que se repete nos eixos principais da estrutura cristalina para formar o volume total do cristal, denominado de cela unitária. Para a celulose existe mais de uma forma polimórfica, significando que não há uma dimensão única para a cela unitária (DUFRESNE, 2012).

A forma cristalina de celulose nativa é a celulose I, que é composta por duas formas cristalinas com diferentes padrões de ligação de hidrogênio: celulose I α e celulose I β . O alomorfo I α possui estrutura cristalina triclínica (Figura 3 A), contendo somente uma cadeia por célula unitária. A forma I β possui estrutura cristalina monoclínica (Figura 3 B), com duas cadeias de celulose por célula unitária. A relação entre as duas formas diferentes de celulose I varia de acordo com a espécie. As algas e a CB são dominadas pela celulose I α e as plantas superiores, como por exemplo o algodão, são dominadas pela celulose I β (HALONEN, 2012; POLETTO; PISTOR; ZATTERA, 2013).

Existem ainda outros polimorfos de celulose (II, III₁, III₂ e IV) que se diferenciam entre si pelas redes de ligações de hidrogênio e orientações moleculares e suas obtenções dependem do tratamento - químico e/ou térmico - a que a celulose (I ou II) é submetida. Celulose III₁ e III₂ são produzidas através de tratamento com amônia das celuloses tipo I e II, respectivamente, e com a modificação da celulose II se obtém a celulose tipo IV (KLEMM et al., 2005; LAVOINE et al., 2012).

Depois da celulose I, a celulose II é a estrutura cristalina mais estudada e pode ser formada a partir da celulose I por tratamento com solução de hidróxido de sódio (merceirização) ou pela dissolução de celulose em subsequente precipitação ou regeneração. A celulose II é a mais estável e a que possui maior relevância técnica, pois é muito utilizada na fabricação de materiais como celofane, rayon e liocel, entretanto possui módulo de elasticidade menor (88GPa) do que a celulose I (138GPa) (HALONEN, 2012; MESQUITA, 2012).

Figura 3 - Estruturas cristalinas da celulose nativa. A). Apresenta a estrutura triclinica da celulose I α e B). Apresenta a estrutura monoclinica da celulose I β .



Fonte: Adaptado de Mesquita, 2012

3.2.3. Aplicações da Celulose Bacteriana

Do ponto de vista aplicativo, a CB possui um vasto espectro. Nesse contexto, muitas pesquisas científicas têm focado no desenvolvimento da engenharia ideal objetivando a produção de produtos baseados em CB. Dentre as áreas que abrangem o uso da CB encontra-se a indústria alimentar, a biomedicina, biotecnologia, indústria de papel, cosmética, entre outras (GALLEGOS et al., 2016)

Uma das primeiras aplicações de CB que se ouviu falar é a tradicional sobremesa conhecida como nata de coco. Trata-se de um produto originado nas Filipinas, mas que já é popularmente conhecido. Trata-se de um produto da fermentação direta da bactéria *Komagaitebacter xylinus* (antes *Gluconacetobacter Xylinus*), tradicionalmente, em água de coco ou suco de abacaxi, gerando um produto final muito apreciado pelo seu sabor adocicado (GAMA; GATENHOLM; KLEMM, 2013)

Figura 4 - Sobremesa comercializada a base de CB conhecida com nata de côco.



Fonte: www.filstop.com/laguna-nata-de-coco-12oz.html

Na indústria de alimentos as propriedades da CB vão além da sobremesa. Usada como ingrediente em formulações, mesmo em baixa concentrações, a CB pode aumentara estabilidade dos alimentos em uma faixa de pH, temperatura, congelamento/descongelamento, funcionando como espessante, geleificante e estabilizante além de já está bem estabelecida como fibra dietética, regulamentada e reconhecida como segura”, do inglês, “generally recognized as safe” (GRAS), aceita como tal pelo Food and Drug Admnistration (FDA) dos EUA em 1992 (SHI et al., 2014).

Em aplicações biomédicas a CB destaca-se em vários segmentos. Sua alta umidade, biocompatibilidade e atoxicidade permitem o uso das membranas em sistema de cicatrização no tratamento de feridas crônicas e queimaduras. Além de curativo a CB é estudada como um material em potencial para ser empregado em cartilagens, vasos sanguíneos artificiais, válvulas para o coração, osso, córnea e engenharia de tecidos (KESHK, 2014; ULLAH et al., 2016). Além das aplicações citadas acima, a CB é também utilizada na produção de diafragma para fones de ouvido, desenvolvidos pela Sony corporantion em parceria com Ajinomoto, indústria de papel, cosmética e produção de nanocompósitos (CHAWLA et al., 2009; KESHK, 2014; ULLAH et al., 2016).

Na área de nanocompósitos a CB destaca-se por sua alta cristalinidade que resulta em excelentes propriedades mecânicas. Essas características estão associadas à sua estrutura nanométrica organizada em nanofibrilas altamente

crystalinas, com ligações intra e intermoleculares como parte de microfibrilas maiores e fibras macroscópicas. Os domínios nanofibrilares ou nanocristalinos, geralmente referidos como nanocelulose, podem ser separados um do outro, superando as extensas e fortes ligações de hidrogênio interfibrilares com produtos químicos corrosivos agressivos, enzimas específicas e / ou forças mecânicas intensas (JIANG; HSIEH, 2013)

3.3. Nanocelulose

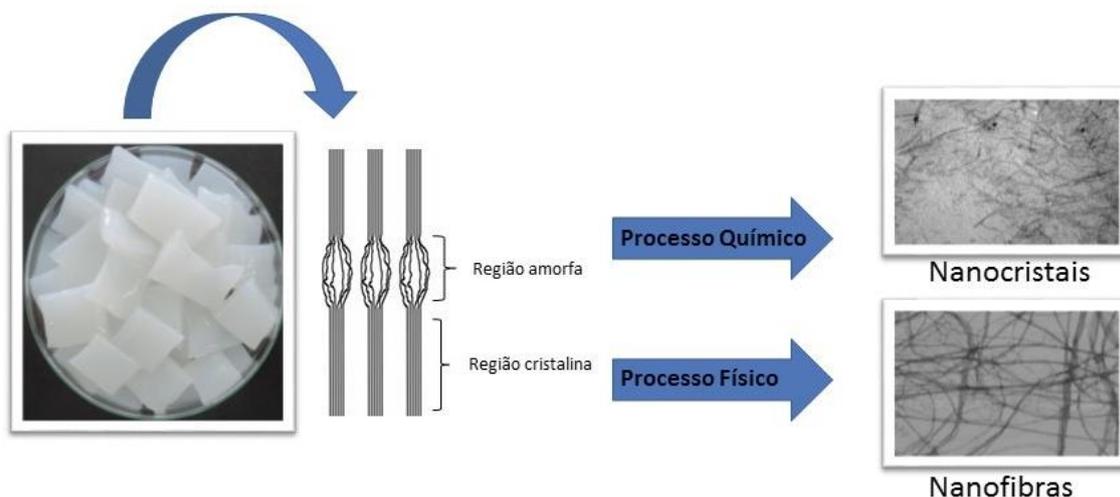
O estudo dos nanomateriais têm proporcionado grandes descobertas nos últimos anos no que diz respeito ao desenvolvimento de novos materiais sustentáveis. A descoberta de novas tecnologia de engenharia de nanomateriais têm o poder de alavancar e revolucionar sistemas industriais, abordando questões relacionadas com saúde e sustentabilidade. Um desses materiais incansavelmente estudado nos últimos anos é a celulose e suas estruturas.

O conceito de nanocelulose surgiu no contexto mundial há algum tempo e em consequência disso, novos e potentes materiais têm sido desenvolvidos com características únicas visando aplicações industriais (DAMASIO, 2015). O termo “nanocelulose” refere-se a materiais celulósicos que possuem pelo menos uma de suas dimensões na escala nanométrica. Esses materiais veem conquistando espaço nos meios acadêmicos e industriais por possuírem características como, alta estabilidade térmica, elevada relação de aspecto, ao seu efeito de reforço mecânico, suas propriedades ópticas, além de sua biodegradabilidade (FUKUZUMI et al., 2009; MOON et al., 2011; NOGI et al., 2009). Essas características permitem a aplicação da nanocelulose nos mais diversos segmentos, como nanocompósitos, tecidos absorventes, cosméticos, artigos de higiene, revestimento de papel cartão e embalagens para alimentos (FERNANDES et al., 2009; GEA et al., 2011; GHADERI et al., 2014a; PANAITESCU et al., 2016).

As nanoceluloses podem ser classificadas em duas subcategorias principais – nanocristais e nanofibras - que variam de acordo com suas dimensões, funções e métodos de preparação e que dependem, em sua maioria, da fonte e das condições de processamento (químico e/ou físico) (Figura 5). Os nanocristais (ou “whiskers” ou “nanowhiskers”) são nanopartículas em forma de

agulha produzidas por hidrólise ácida, enquanto o termo “nanofibras” (ou celulose nanofibrilada) é usado para designar nanopartículas longas e flexíveis, consistindo de domínios cristalinos e amorfos alternados (ABDUL KHALIL et al., 2014; POTULSKI et al., 2014)

Figura 5 - Nanoestruturas obtidas por desintegração da CB por processo químico e/ou físico



Fonte: Elaborada pelo autor

3.3.1. *Celulose Nanocristalina*

O recente interesse na utilização de partículas nanométricas rígidas como materiais de reforço em matrizes poliméricas, compósitos ou nanocompósitos, tem aumentado. Um bom exemplo desse tipo de partículas são os nanocristais de celulose (MONDAL, 2017).

Nanocristais de celulose são pequenas partículas em forma de hastes que consistem em segmentos de celulose em uma estrutura cristalina perfeita e que podem ser obtidos a partir de diferentes fontes celulósicas como polpa da madeira, fira de algodão, algas, tunicados e bactérias (GEORGE; SABAPATHI, 2015). A obtenção dos nanocristais é realizada quimicamente através de hidrólise ácida e enzimática. A hidrólise ácida é a mais utilizada e por isso será abordada mais detalhadamente.

O principal método de obtenção dos nanocristais de celulose (NCC) ocorre através de hidrólise ácida. Essa via de isolamento baseia-se no fato de que as regiões cristalinas da estrutura da celulose são insolúveis nas condições

em são empregados, devido à alta organização molecular da celulose em sua nanoestrutura (DE JESUS SILVA; D'ALMEIDA, 2009). Por outro lado, a desorganização natural da celulose nas regiões amorfas permite a acessibilidade dos ácidos e conseqüentemente a quebra das cadeias de celulose presentes nessa região. Durante a hidrólise, íons hidrônio penetram entre as cadeias de celulose nas regiões amorfas, clivam as ligações glicosídicas ocorrendo a liberação dos nanocristais (DURÁN et al., 2011).

Os ácidos sulfúrico e clorídrico são os ácidos mais comumente utilizados no isolamento dos NCC. A estabilidade da suspensão é especialmente influenciada pelo tipo de ácido, concentração e pelo binômio tempo/temperatura da reação (ALEMDAR; SAIN, 2008). Quando somente o ácido sulfúrico é utilizado na reação, obtêm-se suspensões coloidais altamente estáveis, com altos valores de potencial Zeta, devido à elevada quantidade de carga negativa promovida pelo processo de sulfonação da superfície dos cristais de celulose. Em contrapartida, a elevada quantidade de grupos sulfatos na superfície da celulose catalisa a reação de decomposição dos nanocristais causando uma diminuição na temperatura de degradação térmica. A hidrólise com ácido clorídrico apesar de gerar uma baixa densidade de carga e conseqüentemente uma suspensão menos estável (menores valores de Zeta, em módulo), gera nanocristais com maior estabilidade térmica devido a ausência dos grupos sulfatos na superfície (MARTÍNEZ-SANZ; LOPEZ-RUBIO; LAGARON, 2011). Por isso, tem-se estudado, na obtenção dos nanocristais, a hidrólise através de ácidos combinados (sulfúrico e clorídrico), a fim de que sejam produzidos NCC mais com suspensões mais estáveis e termicamente mais resistentes.

O processo de obtenção dos nanocristais de celulose consiste em várias etapas como preparação da matéria prima, hidrólise, centrifugação, dispersão e diálise. A dispersão é realizada através do uso do ultrassom e a aplicação deste é de fundamental importância, tanto na obtenção dos nanocristais como na boa dispersão destes em matrizes poliméricas (SANTOS et al., 2014).

Muitos estudos reportam o uso do ultrassom como pré-requisito para alcançar os resultados esperados quando essas nanopartículas são utilizadas como reforço, pois quando uma alta concentração de nanocristais é adicionada

à matriz, eles tendem a formar aglomerados (Figura 6) que provavelmente atuam como defeitos ou concentradores de estresse. Uma boa dispersão das nanopartículas os NCC podem ser distribuídos de forma mais uniforme na matriz, proporcionando as características de reforço esperadas (CAO et al., 2016)

Figura 6 - À esquerda: representação de como são os aglomerados de NCC. À direita: nanocristais dispersos após tratamento da suspensão com ultrassom.



Fonte: Elaborada pelo autor

3.3.2. Celulose Nanofibrilada

O termo "celulose nanofibrilada" (CNF) refere-se a fibras de celulose sujeitas a alguma desagregação física e/ou química em fibras de diâmetros nanométricos (menos de 100 nm) e comprimento típico de vários micrômetros que resultam em mudanças químicas e estruturais na superfície da fibra e que influenciam nas propriedades destas nanofibras em nanocompósitos (MISSOUM; BELGACEM; BRAS, 2013; RODIONOVA; ERIKSEN; GREGERSEN, 2012).

As primeiras nanofibras de celulose foram isoladas em 1983, a partir de celulose vegetal, utilizando um homogeneizador de Gaulin de alta pressão (HERRICK et al., 1983; TURBAK; SNYDER; SANDBERG, 1983). Na ocasião, foi obtida uma suspensão altamente viscosa e fibrilada, composta de nanofibrilas com 10-100 nm de diâmetro; no entanto, aplicações visando o uso desse tipo de material só surgiram 20 após sua descoberta (MISSOUM; BELGACEM; BRAS, 2013). Desde então, pesquisadores de todo o mundo buscam métodos físicos mais eficientes para obter CNF. Dentre esses métodos estão: homogeneização de alta pressão (ZIMMERMANN; BORDEANU; STRUB, 2010), moagem (ABE; YANO, 2009), ultrassom, (CHEN; YU; LIU, 2011), cryocrushing (ALEMDAR; SAIN, 2008) e misturadores de alta (UETANI; YANO, 2011) que foram testadas

em uma variedade de matérias-primas, como polpa de beterraba (HABIBI; VIGNON, 2008), palha de trigo, pele de soja (ALEMDAR; SAIN, 2008), sisal (SIQUEIRA; BRAS; DUFRESNE, 2009) e de palmeiras (BENDAHO; KADDAMI; DUFRESNE, 2010). As nanofibras possuem alta razão de aspecto e uma alta capacidade de formar géis com água (NECHYPORCHUK; BELGACEM; BRAS, 2016). Entretanto, as rotas de produção estão normalmente associadas a altos consumos de energia para a delaminação das fibras sendo necessária a combinação com processos químicos ou enzimáticos.

3.3.2.1. Oxidação mediada pelo radical TEMPO

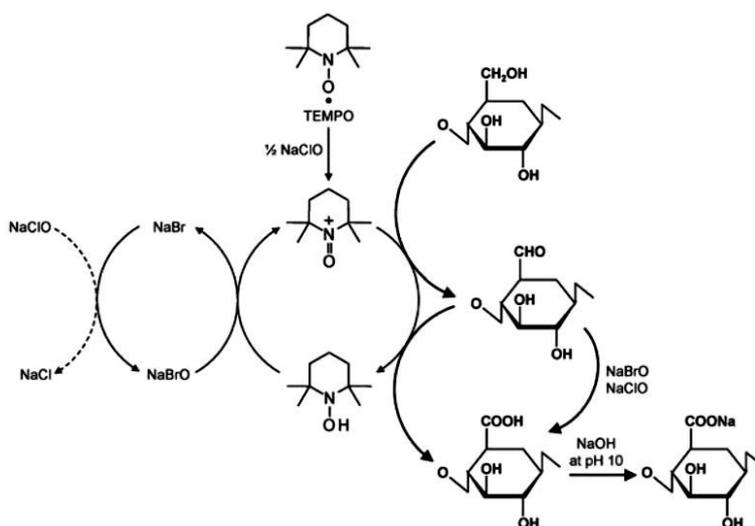
Um dos pré-tratamentos mais eficientes e amplamente utilizado para a celulose é a oxidação mediada pelo 2,2,6,6-tetrametil-1-piperidinoxilo (TEMPO), um método que modifica, seletivamente a superfície da celulose sob condições aquosas. A oxidação de carboidratos glicosídicos parcialmente protegidos e pertencentes a grupos de álcool primário foi publicada pela primeira vez por DAVIS; FLITSCH, (1993). O princípio básico deste pré-tratamento consiste na oxidação de fibras de celulose através da adição de NaClO na presença de quantidades catalíticas de TEMPO e NaBr em pH 10-11, à temperatura ambiente. O processo (Figura 7) converte grupos hidroxila ligados a um carbono primário C6 permitindo a formação de grupos carboxilatos aniônicos em altas densidades na superfície da microfibrilas (ISOGAI; SAITO; FUKUZUMI, 2011). A facilidade da desintegração é atribuída às forças repulsivas interfibrilares geradas pelos grupos carboxilatos superficiais (BÄCKSTRÖM; BOLIVAR; PALTAKARI, 2012). Essa modificação possibilita a diminuição da adesão entre as fibrilas de celulose através da prevenção de formação de pontes de hidrogênio interfibrilares e assim obter fibrilas individualizadas e sem agregação significativa (SAITO; ISOGAI, 2004; PUANGSIN et al., 2013).

A oxidação TEMPO tem sido amplamente utilizada para obter CNF de origem vegetal (FUJISAWA et al., 2012; HABIBI; CHANZY; VIGNON, 2006), pois demonstrou oferecer vantagens em comparação com a oxidação enzimática ou catalisada por metais tais como: alta taxa de reação, alta relação de conversão, alta seletividade, diminuição parcial do peso molecular dos polissacarídeos

durante o processo (se controlado), baixo custo como co-oxidante (PIERRE et al., 2017).

As nanofibras derivadas de celulose bacteriana são alternativas valiosas, seguras e biodegradáveis aos surfactantes padrões utilizados para estabilização da interface óleo/água em emulsões (PIERRE et al., 2017). Entretanto, poucos estudos relatam essa técnica para auxiliar na obtenção de nanofibras a partir de CB (CHEN et al., 2017; FENG et al., 2014; LUO et al., 2013; NGE et al., 2010). Em um trabalho desenvolvido por Jia e colaboradores (2016), esferas de CB foram desintegradas pela oxidação de TEMPO e investigadas para estabilizar emulsões alimentares, tópicas e farmacêuticas, substituindo surfactantes, que muitas vezes provocam reações irritantes (JIA et al., 2016). Em outro estudo, foi adicionada CB oxidada a TEMPO seca como um reforço para matrizes poliméricas hidrofóbicas, tal como ácido polilático (PLA) (PANAITESCU et al., 2016).

Figura 7 - Mecanismo de ação da oxidação regioseletiva de hidroxilas primárias do carbono C6, em grupos carboxilatos por oxidação TEMPO/ NaBr/NaClO em pH 10-11.



Fonte: Isogai; Saito; Fukuzumi (2011).

Devido às suas propriedades mecânicas, químicas e físicas específicas as nanofibras oxidadas a TEMPO encontraram, na última década, as mais diversas aplicações em campos que variam desde o uso como aditivos para formulações específicas ou nanoestruturadas em filmes à hidrogéis e aerogéis para aplicações avançadas em biomedicina (ISOGAI; SAITO; FUKUZUMI, 2011; PIERRE et al., 2017).

3.4. Nanocompósito

Compósitos são sistemas que apresentam em sua constituição, no mínimo, dois materiais, conhecidos como fases, que podem ser da mesma natureza, ou não. Em sua maioria, os compósitos são formados por duas fases: a fase contínua, composta pelo material mais dúctil e sendo a que apresenta uma maior proporção no compósito; e uma fase dispersa, composta, geralmente, por um material mais rígido e apresenta uma menor proporção no compósito (VALENCIA, 2017).

No material compósito a fase dispersa pode ser adicionada ao sistema com duas finalidades: a primeira é reduzir o custo do material, neste caso ela é chamada de carga de enchimento ou carga inerte; e a segunda é melhorar as propriedades do material produzido, neste caso ela é chamada de carga de reforço (DE PAOLI, 2009).

Os nanocompósitos são aqueles que possuem pelo menos uma de suas dimensões em escala nanométrica e que apresentam propriedades melhoradas, mesmo com a quantidade de nanopartículas em baixas concentrações (MEHL, 2011). Ao contrário da abordagem tradicional de compósito, em que o uso de partículas tem, muitas vezes, a função de preenchimento para reduzir os custos do produto final, a interação da matriz com as nanopartículas oferece sempre uma melhoria nas propriedades mecânicas, elétricas, ópticas e térmicas (ESTEVES; BARROS-TIMMONS; TRINDADE, 2004). Exemplos de materiais nanocompósitos são os filmes produzidos a partir dos biopolímeros.

O uso de polímeros de base natural depende de vários fatores, dentre eles custo, disponibilidade, atributos funcionais, propriedades mecânicas (força, resistência, flexibilidade), qualidade óptica (brilho e opacidade), requisitos de barreira (ao vapor de água e à gases como O₂ e CO₂), resistência à água e aceitação sensorial (MARKARIAN, 2008; VALENCIA, 2017).

O interesse em usar nanoestruturas de celulose como reforço na composição de polímeros aumentou notavelmente durante a última década, devido a propriedades como, alto módulo de elasticidade, baixo custo, cristalinidade e renovabilidade (LAVOINE et al., 2012; MAIA et al., 2017; OKSMAN et al., 2016; POTULSKI et al., 2014). Nestes sistemas, o

estabelecimento de um número muito alto de ligações de hidrogênio na rede percolada formada por nanopartículas de celulose e seus emaranhados são cruciais para a obtenção da capacidade de reforço dessas nanoestruturas e em qualquer material a dispersão e distribuição das nanofibrilas, bem como a interface entre a nanopartícula e a matriz, desempenham um papel fundamental nas propriedades mecânicas resultantes (MAIA et al., 2017).

Um dos grandes desafios da área de nanocompósitos é a incompatibilidade existente entre matriz e reforço, que dificulta a obtenção das propriedades esperadas devido às diferenças químicas entre os componentes.

Desta forma, buscando superar o problema crítico de aderência entre reforço e matriz, uma nova classe de materiais, discutido pela primeira vez por Nishino et al 2004 e denominado compósitos *all cellulose composite* (ACC), tem ganhado destaque na área de nanocompósitos (NISHINO; MATSUDA; HIRAO, 2004).

3.4.1. All-Cellulose Composite

A área que abrange produção de bionanocompósitos encontra uma vasta gama de aplicações que vão desde estruturais até biomédicas. Entretanto a incompatibilidade química inerente entre uma matriz e reforço provoca, muitas vezes, fracas ligações interfaciais, conduzindo a uma ineficiência na transferência de tensão e, portanto, uma baixa resistência mecânica e rigidez (HONG et al., 2006; JOHN; THOMAS, 2008; RIEDEL; NICKEL, 2001). De fato, a resistência e a rigidez de compósitos reforçados com celulose raramente ultrapassam 300 MPa e 30 GPa, respectivamente (DUCHEMIN; NEWMAN; STAIGER, 2009).

A compatibilidade química pode, muitas vezes, ser melhorada por tratamento químico por vulcanização, silanização, acetilação, enxerto químico, entre outros. Entretanto, a crescente consciência ambiental e o crescente interesse em conceitos de materiais sustentáveis, levam, cada vez mais, ao desenvolvimento de compósitos usando fibras naturais em alternativa às sintéticas como os *all cellulose composite* (ACC) (SANJAY et al., 2018)

Por definição, *all cellulose composite* é considerado um produto composto por um único componente químico – nesse caso a celulose- em que

as fases componentes têm diferentes características morfológicas e/ou estruturais e que promete diminuir a incompatibilidade reforço/matriz e, assim, melhorar as interações químicas podendo exibir propriedades mecânicas superiores, além de facilitar a reciclagem (HUBER et al., 2012).

Atualmente, duas rotas são usadas para a produção de *all cellulose composite*: a primeira envolve inicialmente a dissolução de uma porção de celulose em um solvente que é regenerado na presença de celulose não dissolvida. Como exemplo têm-se as fibras de rami que foram introduzidas numa solução de celulose preparada a partir de polpa de fibras kraft dissolvida num solvente misto de cloreto de lítio (LiCl) e N, N- dimetilacetamida (DMAc) com posterior fabricação dos compósitos (NISHINO; MATSUDA; HIRAO, 2004). A segunda rota caracteriza-se por um único passo que envolve a dissolução parcial da superfície das fibras celulósicas que, em seguida, é regenerada no local para formar uma matriz em torno da porção não dissolvida. Neste procedimento, a camada externa do material de celulose é dissolvida para formar uma fase de matriz que cobre a parte do núcleo (celulose não dissolvida) atuando como reforço (GINDL; KECKES, 2005; HUBER et al., 2012).

Ambos os métodos de produção de ACC utilizam solventes, tais como cloreto de lítio / N, N-dimetilacetamida (LiCl / DMAc), tetróxido de diazoto / dimetilformamida (N_2O_4 / DMF), N -metilmorfolina- N -óxido (NMMO), ácidos minerais, hidróxido de sódio (NaOH), fluoreto de dimetilsulfóxido/ fluoreto de tetrabutílamônio (DMSO / TBAF), cloreto de dimetilimidazolona / lítio e vários hidratos de sal fundido e líquidos iônicos (ILs). Alguns deles têm capacidade de dissolução limitada, taxa de dissolução lenta, alta toxicidade e não reciclabilidade, além de ser um processo caro e demorado, uma vez que a dissolução é seguida pela remoção, regeneração e secagem do solvente da celulose, dificultando seu uso em escala industrial (WANG et al., 2018a). Além disso, apesar da natureza biológica desses materiais, o conceito de material “verde” precisa ser revisto, pois o processo para produção desses compósitos envolve um número de etapas de processamento baseadas em soluções que, do ponto de vista ambiental, não são amigáveis. (SOYKEABKAEW; NISHINO; PEIJS, 2009).

A Tabela 1 mostra características de alguns *all cellulose composite* relatados na literatura e obtidos a partir de diferentes fontes de celulose, diferentes processos e solventes. Vários materiais de celulose incluindo polpas de madeira, rami, sisal e fibras de celulose regenerada, pós de celulose microcristalina, CB e papel de filtro têm sido utilizados na produção de ACC. O tempo necessário para dissolução necessita ser adaptado, pois depende fortemente da estrutura da fibra, especialmente o grau de orientação e cristalinidade na parte externa. Assim, as condições de dissolução necessitam serem adaptadas de acordo com as diferentes fontes de celulose durante a obtenção do ACC despadronizando e variando muito o processo (GINDL; KECKES, 2005; SOYKEABKAEW; NISHINO; PEIJS, 2009; WANG et al., 2018b).

Tabela 1- Características dos ACC obtidos a partir de diferentes métodos, solventes e fontes de celulose.

Fonte de celulose	Solvente	Resistência à tração (MPa)	Módulo de Elasticidade (GPa)	Elongação na ruptura (%)	Cristalinidade (%)	Referência
Fibras de Lyocell de baixa razão de estiramento	LiCl/DMAc	355	13	10	*	SOYKEABKAEW; NISHINO; PEIJS, 2009
Fibras de Lyocell de alta razão de estiramento	LiCl/DMAc	190	8	15	*	SOYKEABKAEW; NISHINO; PEIJS, 2009
Celulose microcristalina	LiCl/DMAc	62	2,6	6,8	48	DUCHEMIN; NEWMAN; STAIGER, 2009
Bagaço de cana	LiCl/DMAc	140	12,8	-	72	GHADERI et al., 2014
Celulose microcristalina pré tratada	Líquido Iônico	49	3,6	2,11	50,8	MA et al., 2011
Fibras de cânhamo	NMMO	28,9	1,82	20,8	*	SHANSHAN; JIANQING; ZHENGWEI, 2012
Polpa de Algodão / Linter	NaOH/uréia	124	5,1	*	*	QI et al., 2009
CB	LiCl/DMAc	411	18	3,3	*	SOYKEABKAEW et al., 2009

Embora o processo de obtenção precise ser ainda bem investigado e padronizado, o ACC é um material inovador com capacidade para ser utilizado em aplicações estruturais bem como biomédicas (SHAH et al., 2013), além das suas propriedades melhoradas permitirem produção de materiais inteligentes produzidos a partir de celulose regenerada. Além disso as propriedades mecânicas dos ACC podem fornecer uma alternativa atraente ao papel de

celulose e uma excelente aplicação na produção de embalagens (GHADERI et al., 2014b; HALONEN, 2012)

3.5. Embalagens

As embalagens têm a função principal de proteger o alimento contra o meio externo, além fornecer as mais variadas informações aos consumidores, como ingredientes, valor nutricional, restrição de componente, adequação de armazenamento, entre outras. (TANG et al., 2012). A maioria dos materiais utilizados para a produção de embalagens são provenientes de combustíveis fósseis. Esses materiais não são biodegradáveis em sua estrutura, de modo que o uso generalizado acarreta uma série de preocupações no que diz respeito ao impacto ambiental causado pelo descarte dos mesmos (GHADERI et al., 2014a). Por esta razão, cientistas e engenheiros de alimentos estão tentando desenvolver novos materiais para filmes biodegradáveis, principalmente com base em materiais de fontes renováveis que são abundantes na natureza. Em geral, esses materiais são baratos e muitos deles são considerados resíduos ou subprodutos (AIDER, 2010; BARÃO, 2011)

Os materiais obtidos a partir de fontes naturais renováveis que têm sido usados para produzir filmes comestíveis incluem principalmente proteínas, lipídios, polissacarídeos e todas as combinações possíveis entre eles e, às vezes, incorporação de aditivos, como nanopartículas, destinados a melhorar as propriedades do filme, definindo um novo tipo chamada de bionanocompósitos (CAZÓN et al., 2017).

Os bionanocompósitos fazem parte de uma classe de material composto por espécies naturais (principalmente biopolímeros) e sólidos inorgânicos de estrutura variada e morfologia em escala nanométrica que exibem propriedades de embalagem notavelmente melhoradas devido à grande área superficial e razões de aspecto significativas. Além disso, essa classe de materiais é suscetível à degradação por microorganismo, resultando em boa biodegradabilidade, uma característica promissora para seu uso como material de embalagem (SHANKAR; RHIM, 2018).

Na produção dos bionanocompósitos, na maioria dos casos, é necessária a adição de plastificantes, pois sem eles os filmes produzidos, principalmente os baseados em vários polissacarídeos, apresentam-se frágeis, devido as interações entre as cadeias poliméricas. Os plastificantes reduzem a coesão entre as cadeias poliméricas adjacentes, melhorando as propriedades, pois reduzem a tensão à deformação, dureza, densidade e viscosidade, aumentando a flexibilidade da cadeia polimérica, bem como a resistência à fratura . Alguns plastificantes comumente usados são polióis (glicerol, sorbitol e polietilenoglicol), açúcares (glicose e sacarose) e lipídios (monoglicerídeos, fosfolipídios e surfactantes) (ESPITIA et al., 2014; VIEIRA et al., 2011)

A garantia da qualidade e a segurança, principalmente, dos alimentos industrializados dependem do sistema de embalagem a ser utilizado. O uso correto do material para cada tipo de alimentos (desidratados, líquidos, sólidos, pastosos, etc.) e seu dimensionamento garantem a conservação dos alimentos e a aumento da sua vida útil. A embalagem é um fator essencialmente importante para os alimentos, pois oferece para o consumidor um alimento seguro, atraente, de qualidade, e traz consigo informações relativas ao produto em questão.

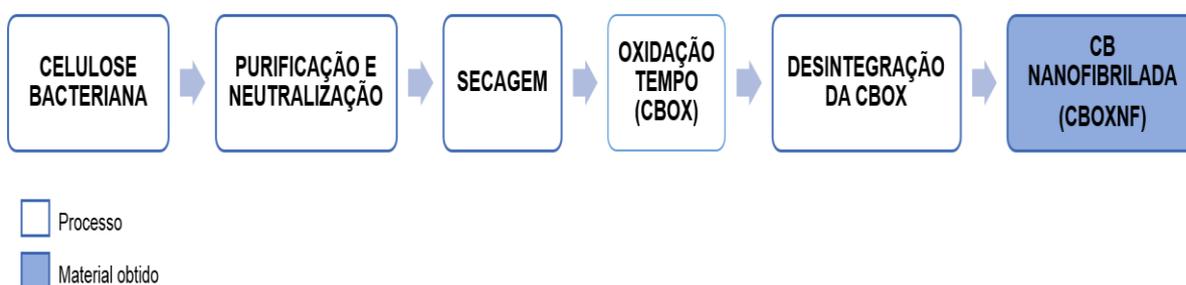
A depender da aplicação, os materiais utilizados para compor embalagens para alimentos necessitam possuir boas propriedades, entretanto, no geral, as propriedades que chamam mais a atenção dos pesquisadores são as propriedades mecânicas, de barreira a CO_2 , O_2 e ao vapor de água, transparência, solubilidade, toxicidade e biodegradabilidade (TANG et al., 2012).

4 METODOLOGIA

Etapa1 - Obtenção e caracterização de nanofibras de CB.

O esquema (Figura 8) a seguir ilustra, em resumo, o processo de obtenção e caracterização das nanofibras de CB utilizando homogeneizador de alta rotação.

Figura 8 - Esquema de obtenção da CBOXNF a partir da CB oxidada a TEMPO utilizando homogeneizador de alta rotação.



Fonte: próprio autor

4.1. Materiais

Glicose (D+, 99%, Vetec), peptona bacteriológica (Himedia - Índia), extrato de levedura (K25-611005 – Kasvi – Brasil), ácido cítrico (99,5% -Sigma Aldrich - Alemanha), fosfato de sódio dibásico P.A (Santa Cruz Biotecnologia – Brasil), hidróxido de sódio (97% - Sigma Aldrich - Alemanha), ácido clorídrico (37% - Sigma Aldrich - Alemanha), ácido sulfúrico (95-98% Sigma Aldrich - Alemanha), óleo de silicone (Vetec/Sigma Aldrich – Brasil), 2,2,6,6-tetrametil-1-piperidinoxil – TEMPO (98% - Sigma Aldrich - Alemanha), brometo de sódio P.A (Dinâmica - Brasil), hipoclorito de sódio (10 – 12% - Dinâmica), cloreto de sódio (Vetec/Sigma Aldrich - Brasil), bifitalato de potássio P.A. (Vetec/Sigma Aldrich - Brasil), glicerol P.A –(Vetec/Sigma Aldrich - Alemanha), MEM - Minimum Essential Medium - (Thermo Scientific – Reino Unido) Penicilina / estreptomicina, soro bovino fetal (FBS) e aminoácidos não essenciais (Millipore - Alemanha), Presto Blue (Gibco-Invitrogen – Estados Unidos), piruvato de sódio (Sigma-Aldrich - Alemanha), tripsina 0,25% (p / v) (Thermo Scientific – Reino Unido), solução salina tampão fosfato (PBS).

4.2. Métodos

4.2.1. Preparação das películas de CB

As membranas de CB foram produzidas, no laboratório de Microbiologia de Alimentos, da Embrapa Agroindústria Tropical pela bactéria *Komagataeibacter xylinus* ATCC 53582 em condições estáticas por fermentação de meio HS sintético (SCHRAMM; HESTRIN, 1954). O meio foi esterilizado a 121 °C por 15 min inoculado com a cultura (3% v / v) e incubado por 10 dias a 30 °C, em bandeja de vidro (25x27x2cm), contendo 500 mL de meio de cultura. Após a fermentação, as membranas foram purificadas por fervura em 2000 mL de água corrente a 100 °C durante 1 h, em seguida, foram transferidas para uma solução a 2% (p / v) de NaOH a 80 °C durante 1 h. Esses passos de purificação foram realizados duas vezes. As membranas de CB foram então lavadas em água destilada até pH 7.

As películas purificadas foram secas por 48 horas em estufa a 50°C e moídas em homogeneizador de alta rotação por 15 minutos ou até a obtenção de um pó que foi posteriormente armazenado para análises posteriores.

4.2.2. Oxidação mediada por TEMPO

A CB foi oxidada de acordo com o método proposto por (SAITO et al., 2007) com algumas modificações. O pó de CB foi suspenso em água destilada (100 mL por cada grama de CB) contendo TEMPO e KBr (0,016 g e 0,1 g por grama de CB, respectivamente). A oxidação foi iniciada pela adição de uma solução de NaClO a 11% (numa quantidade suficiente para atingir uma concentração de NaClO de 5,0 mmol / g em base CB seca) a 25 °C sob agitação magnética (750 rpm). Durante a reação o pH da suspensão foi ajustado para 10 por adição de uma solução de NaOH 0,5 M e mantida sob agitação durante 2 h. Em seguida, a suspensão de CB oxidada foi filtrada com sucessivas lavagens até pH 7, sendo referida como celulose bacteriana oxidada (CBOx).

4.2.2.1. Determinação do conteúdo de carboxilato na CBOx

O teor de carboxilato na CBOx foi determinado por titulação condutimétrica. Adicionou-se 1 g de CBOx em 183,3 mL de água destilada, 16,67

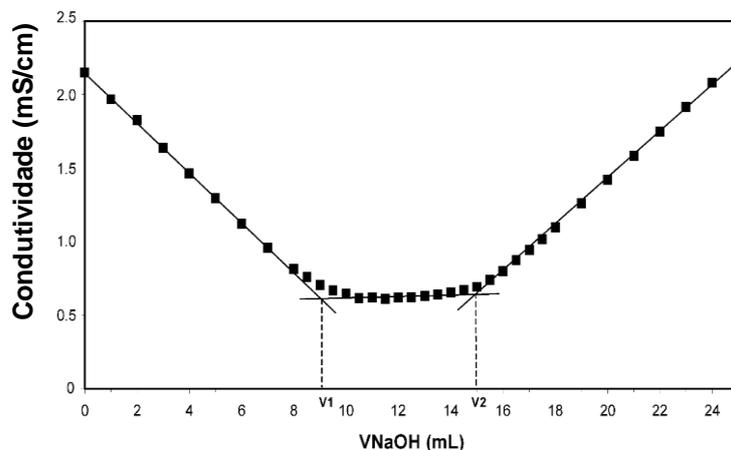
mL NaCl 0,01M com posterior agitação magnética a 200 rpm por 10 min. Por fim, a suspensão foi acidificada até pH 3 com HCl 0,1 M e titulada com solução de NaOH 0,04 M a uma razão aproximada de 1 mL / min até pH 11 (BESBES; ALILA; BOUFI, 2011; SILVA PEREZ, D; MONTANARI; VIGNON, 2003; SAITO; ISOGAI, 2004).

A curva de titulação foi plotada em um gráfico de condutividade versus volume de NaOH. O teor de carboxilato (C) foi calculado de acordo com a equação 1.

$$C = ((V_2 - V_1)) * C_{NaOH} / m \quad (1)$$

Onde, V1 e V2 são os volumes inicial e final, respectivamente, baseado no platô da curva (Figura 9) CNaOH é a concentração de NaOH em mmol/g de CB e m é a massa da amostra (g).

Figura 9 - Curva de titulação condutimétrica de CB oxidada a TEMPO.



Fonte: Silva Perez, D. et al., (2003)

4.2.2.2. Nanofibração da CBOx

Uma suspensão CBOx de 1% (m / v) foi processada em um homogeneizador de alta rotação (Vita-Prep 3, Vitamix Corp., Cleveland, OH, EUA) a 24 000 rpm durante 30 min, em 3 etapas de 10 minutos, com intervalos de 10 minutos entre essas etapas, produzindo a celulose bacteriana oxidada nanofibrilada (CBOXNF). A suspensão foi congelada a -80°C, seca em liofilizador LP 510 (Liotop / Liobras, São Carlos, Brasil) e armazenada.

4.2.2.3. Rendimento do processo de obtenção das nanofibras de CB

O rendimento do processo de obtenção de CBOXNF foi calculado pela razão entre a massa final de CBOXNF após liofilização que será usada como matriz na produção dos filmes *all cellulose composite* e a massa de CB seca inicial que entrou no processo de oxidação. Para a análise foi utilizada balança de infravermelho (MARTE – ID45) e os ensaios foram feitos em triplicata.

$$\eta (\%) = \frac{\text{massa de entrada (g)}}{\text{massa saída}} \quad (2)$$

4.2.2.4. Liofilização e Redispersão da CBOXNF

NFBC e BC liofilizadas em um liofilizador LP 510 (Liotop / Liobras, São Carlos, Brasil) foram moídas em moinho analítico de impacto (IKA-A11) e denominadas CBOXNFL e CBL respectivamente. Uma solução com concentração 0,5% m/v foi agitada magneticamente a 200 rpm durante 24 h para avaliar a redispersibilidade e a estabilidade das dispersões. Após 24 h, o potencial Zeta foi medido (conforme descrito no item 4.3.4).

4.3. Caracterização da CB, CBOx e CBOXNF

4.3.1. Análise Termogravimétrica (TGA)

O TGA foi feito usando um analisador térmico Shimadzu TGA-50. Uma amostra liofilizada de 6 a 7 mg foi ajustada em panela de alumínio e analisada de 25 a 600 °C a 10 °C / min, sob atmosfera de nitrogênio com fluxo de 40 mL / min.

4.3.2. Espectroscopia no Infravermelho por transformada de Fourier

Os espectros de absorção de infravermelhos foram obtidos de 4.000 a 400 cm⁻¹, com resolução espectral de 4 cm⁻¹ e 25 varreduras. As amostras de CB secas foram moídas e pastilhas de KBr foram montadas em uma proporção de 1:10 m/m (amostra / razão de KBr). Em seguida as pastilhas foram analisadas em um espectrômetro FTIR Agilent Cary 660.

4.3.3. *Difração de Raios-X*

As análises das amostras de CB, CBOX e CBOXNF foram realizadas no Laboratório de Raios X da Universidade Federal do Ceará. Os difratogramas XRD foram coletados em um difratômetro XPert Pro MD (PANalytical, Holanda) com um tubo de cobre a 40 kV e 40 mA a uma faixa 2θ de 10° a 30° , com uma velocidade de varredura de $2^\circ \text{C} / \text{min}$. Os índices de cristalinidade (IC) foram calculados a partir do método proposto por Segal (SEGAL et al., 1959).

$$IC(\%) = \left(\frac{I_{002} - I_{am}}{I_{002}} \right) \times 100 \quad (3)$$

Onde:

I_{002} - é a intensidade máxima de difração da região cristalina ($2\theta \sim 22,6^\circ$)

I_{am} - é a intensidade de difração da região amorfa ($2\theta \sim 18^\circ$)

4.3.4. *Potencial Zeta*

O potencial Zeta foi medido em suspensões de CBOX e CBOXNF (pH 7) previamente diluídas em água destilada em uma proporção de 1:10 amostra: água e nas amostras de CBL e CBOXNFL, ambas em pH 7, imediatamente após a agitação. O potencial Zeta foi medido em um analisador Zetasizer 3000 NanoZS (Malvern Instruments, Reino Unido), em triplicata.

4.3.5. *Análise Turbidimétrica*

Mediante resultados da análise do potencia Zeta para CBL e CBOXNFL foi realizada uma análise turbidimétrica apenas em suspensões de NFBCL. O ensaio turbidimétrico foi realizado de acordo com as normas descritas em Lutz, 2008. A suspensão (5 mg/mL) de NFBCfd foi diluída 50 vezes antes da leitura no turbidímetro (turbidímetro 2100P - Hach). A unidade mais comumente usada para medir a turbidez é a unidade nefelométrica (NTU)

4.3.6. *Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) e Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)*

Para análise de MET, a CBOXNF foi dispersa em água Mili-Q (1,25 g / L) e montada em grids de 300 mesh revestidas com formvar com adição de uma

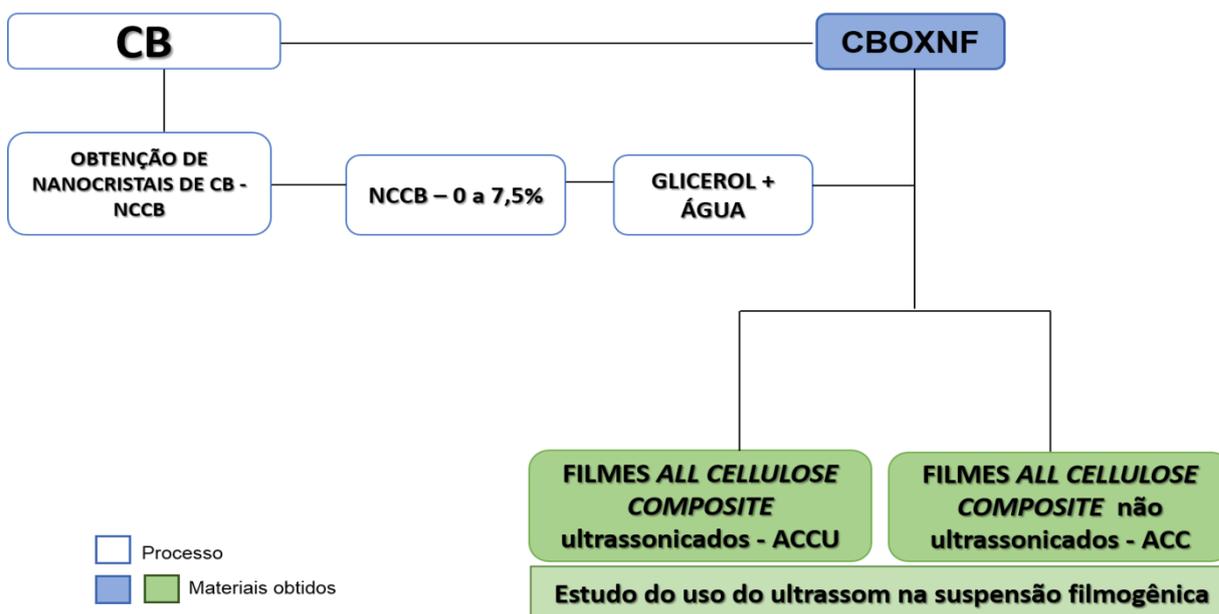
gota de solução de ácido fosfotungstíco contrastante (0,1% m/v). Os grids foram visualizados no microscópio eletrônico de varredura Tescan Vega 3 (Tescan, República Tcheca), com detector STEM sob tensão de aceleração de 30 kV. Os diâmetros médios das nanofibrilas de pelo menos 200 estruturas foram determinados usando o programa Image J (National Institute of Health-NIH).

Para análise de MEV, CB liofilizada foi montada em stubs e a seguir metalizados com ouro e observados em um microscópio eletrônico de varredura MEV TESCAN, sob aceleração de tensão de 15KV. Os diâmetros médios das nanofibrilas de pelo menos 200 estruturas foram determinados usando o software Image J (NIH, EUA).

Etapa 2 – Obtenção, caracterização e estudo do uso do ultrassom na obtenção dos filmes *all cellulose composite*

O esquema (Figura 10) a seguir ilustra, em resumo, o processo de obtenção dos filmes *all cellulose composite* utilizando a CBOXNF, obtida na etapa anterior, como matriz.

Figura 10 - Esquema de obtenção dos filmes *all cellulose composite* a partir de CB desintegrada.



Fonte: Próprio autor

4.4. Obtenção e rendimento dos Nanocristais de Celulose Bacteriana (NCCB)

Os NCCB foram obtidos por hidrólise ácida, seguindo a metodologia relatada por Vasconcelos et al., (2017), com modificações. Em resumo, foi misturado 1g de CB com 50mL de solução ácida contendo ácido sulfúrico (60%) e ácido clorídrico (35%) na razão de 1:1. Posteriormente a suspensão foi adicionada à um banho de silicone líquido à 45 °C sob agitação magnética por 1h. À suspensão foi adicionada água gelada na proporção de 5mL de água para 1mL de solução ácida posteriormente foi centrifugada à 15,64 G por 15 min a 20°C, ultrassonicada (Unique / Desruptor, potencia ultrassonica de 250W – micropona de titânio de 4mm de diâmetro) por 2 min a uma frequência de 60Hz e dialisada em membrana de troca iônica (Spectra/Por 5) com diâmetro de poro de 48mm e massa molar variando entre 12000 e 14000 Dalton em água destilada com duas trocas diárias até pH 7 (VASCONCELOS et al., 2017).

O rendimento dos NCCB foi calculado pela razão entre a massa final após a hidrólise (base seca) e a massa inicial de CB que foi hidrolisado, conforme equação 3. Para a análise foi utilizada balança de infravermelho (MARTE – ID45) e os ensaios foram feitos em triplicata.

$$\eta (\%) = \frac{\text{massa de entrada (g)}}{\text{massa saída}} \quad (3)$$

4.5. Preparação dos filmes *all cellulose composite*

Os filmes foram produzidos pela técnica *casting* utilizando diferentes concentrações de NCCB 0 %, 2,5%, 5% e 7,5% em peso com base na massa de matriz (CBOXNF) seca. Para cada película, adicionou-se 50% de glicerol como plastificante. Foi adicionada água destilada para ajustar o teor de sólidos a 1,0 g /100 mL. A suspensão formadora de filme foi homogeneizada em homogeneizador de alta rotação (Vita-Prep 3, Vitamix Corp., Cleveland, OH, EUA) a 24000 rpm durante 15 min, ultrassonicada a uma potência de 60Hz durante 2 min (Unique / Desruptor DES500, potencia ultrassonica de 250W – micropona de titânio de 4mm de diâmetro) e foram denominados ACCU 0%, ACCU 2,5%, ACCU 5,0% e ACCU 7,5%. Para comparar e verificar o efeito do ultrassom na suspensão filmogênica, filmes sem sonicação também foram

produzidos e referidos como ACC 0%, ACC 2,5%, ACC 5,0% e ACC 7,5%. As bolhas de ar foram removidas sob vácuo. As películas foram secas em bandeja de aço inoxidável (20x30 cm) a 50 °C durante 48 h.

4.6. Caracterização dos NCCB e filmes *all cellulose composite*

4.6.1. NCCB

Nos nanocristais foram realizadas análises de potencial Zeta, DRX, FTIR, TGA e microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Suspensões de NCCB (pH 7) foram previamente diluídas em água destilada para uma proporção de 1:10 amostra: água (v / v) e o potencial Zeta foi medido em um analisador Zetasizer 3000 NanoZS (Malvern Instruments, Reino Unido), em triplicata. As análises de TGA, FTIR e DRX seguiram metodologias mencionadas nos itens 4.3.1, 4.3.2 e 4.3.3, respectivamente.

Para verificar a morfologia, os NCCB foram visualizados em Microscópio Eletrônico de Transmissão (MET) da marca FEI Company, modelo Tecnai Spirit Biotwin G2, operando com uma tensão de 80 Kv, pertencente Núcleo de Plataformas Tecnológicas do Centro de Pesquisa Ageu Magalhães da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Recife – PE. Para esta análise, uma alíquota da suspensão de nanocristais foi colocada em “grids” e o excesso drenado com o auxílio de papel filtro. A seguir, o material foi tingido com uma solução de ácido fosfotúngstico (1%) e seco por 24 horas. A partir das imagens, o comprimento (L), a largura (D) e a razão de aspecto (L/D) dos nanocristais foram medidos por meio do software Image J com base na medida 100 cristais, calculando-se a média e o desvio padrão.

4.6.2. Filmes *all cellulose composite*

A espessura dos filmes (acondicionados à temperatura ambiente) foi determinada pela média de 10 medidas feitas com um medidor de espessura AKROM, KR1250 (margem de erro do equipamento: $\pm 1 \mu\text{m}$).

4.6.2.1. Difração de raios X (XRD)

Os padrões DRX foram analisados usando um instrumento de difração de raios X (X'Pert³ Powder, PANalytical, Almelo, Holanda), entre $2\theta = 10^\circ$ e $2\theta = 50^\circ$ com um tamanho de passo $2\theta = 0,02^\circ$ e registrou 14 pontos/s com um tubo de cobre, tubo de raios-X ($\lambda = 1,54056 \text{ \AA}$) a 45 kV e 40 mA em um. O índice de cristalinidade (Crl) foi definido por SEGAL et al., 1959 conforme descrito na equação 3 desta tese. As análises de Raios-X dos filmes foram realizadas no Laboratório Ibérico Internacional de Nanotecnologia (INL – Braga/PT).

4.6.2.2. Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier – FTIR

O espectro FTIR dos filmes foi gravado com um Bruker FT-IR VERTEX 80 / 80v (Boston, EUA) no modo de reflexão total atenuada (ATR) com um acessório de cristal de platina na faixa de comprimento de onda: 4000-400 cm^{-1} , usando 16 varreduras a uma resolução de 4 cm^{-1} . Antes da análise, um espectro de fundo aberto foi registrado como um espaço em branco. Todas as medidas foram realizadas em triplicata. As análises foram realizadas no Laboratório Ibérico Internacional de Nanotecnologia (INL – Braga/PT).

4.6.2.3. Análise Termogravimétrica

A análise termogravimétrica dos filmes (Laboratório Ibérico Internacional de Nanotecnologia (INL – Braga/PT) foi realizada utilizando um analisador térmico simultâneo e um calorímetro de varredura diferencial (TGA / DSC 3+, Mettler Toledo, EUA). Foram colocados 6 a 10 mg de cada película em panela de alumínio e analisadas em um intervalo de temperatura de 25 a 600 $^\circ\text{C}$. Foram avaliadas três réplicas de cada amostra.

4.6.2.4. Propriedades Mecânicas

As propriedades mecânicas dos filmes foram medidas com pelo menos dez repetições em amostras de teste obtidas em uma prensa CEAST em dimensões 125 mm x 12,5 mm, acondicionadas por 48 h em um ambiente com temperatura controlada e umidade relativa ($23 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ e $50 \pm 5\%$) com base no método D882-01 (ASTM, 2001), usando uma máquina de teste universal Emic

DL-3000 com célula de carga de 100 N, separação inicial entre as garras de 100 mm e velocidade de deformação de 12,5 mm / min.

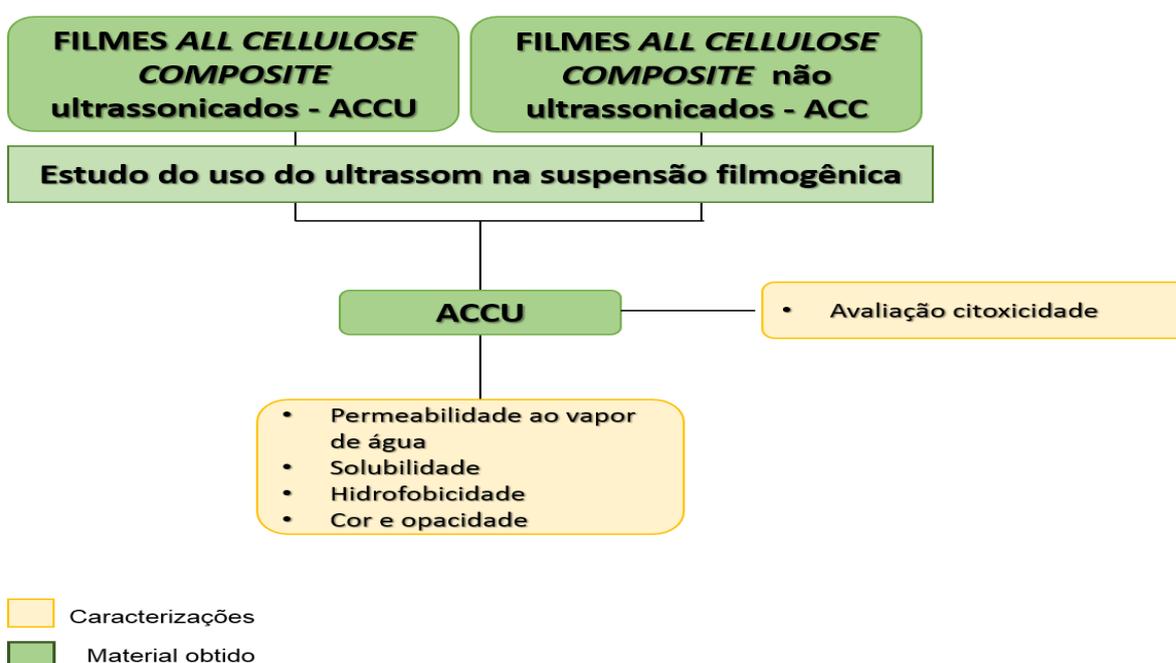
4.6.2.5. Microscopia Eletrônica de Varredura – MEV

A morfologia da superfície dos filmes foi examinada utilizando microscopia eletrônica de varredura (Quanta FEG 650, FEI, EUA) com uma tensão de aceleração de 5 kV. Antes da análise, todas as amostras foram montadas em “stubs” de alumínio usando fita adesiva de carbono e revestidos de ouro com tinta dourada e, em seguida, analisados. As micrografias foram feitas em microscópio no Laboratório Ibérico Internacional de Nanotecnologia (INL – Braga/PT).

Etapa 3 - Caracterização e avaliação biológica dos filmes *all cellulose composite* ultrassonicados.

O esquema (Figura 11) a seguir mostra descrição da etapa 3, realizada após o estudo do ultrassom nos filmes ACC e ACCU. Esta etapa inclui estudo da citotoxicidade, permeabilidade, hidrofobicidade de superfície, cor e opacidade dos filmes ACCU.

Figura 11 - Esquema das principais tarefas realizadas na terceira etapa nos filmes *all cellulose composite* ultrassonicados



Fonte: Próprio autor

4.6.2.6. Permeabilidade ao vapor de água (PVA)

A permeabilidade ao vapor de água (PVA) foi determinada gravimetricamente segundo método ASTM E96-00 (ASTM, 2000). Foram utilizadas células de permeação com 24 mm de diâmetro contendo 1,5 mL de água, mantendo um espaço livre na célula de, aproximadamente, 10 mm de altura. Os filmes, em formato de disco, foram selados no topo das células, que foram colocadas em dessecador vertical ARSEC DCV-040 com circulação de ar contendo sílica gel (0% UR) previamente seca a 105 °C por 24 horas. Foram feitas, no mínimo, 8 repetições para cada tratamento. As células foram mantidas a 25°C e 30% UR durante no mínimo 24 horas e foram pesadas 8 vezes ao longo de 24 horas, com intervalos de, no mínimo, 1 hora. O ganho de peso foi plotado em função do tempo e a PVA foi definida conforme equação 4.

$$PVA = TPVA \cdot \frac{e}{\Delta P} \quad (4)$$

TPVA é a taxa de permeabilidade ao vapor de água (declividade da reta dividida pela área do filme), ou seja, taxa de transmissão de vapor de água ($\text{g} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$) através do filme, calculada a partir da inclinação da linha reta dividida pela área exposta do filme (m^2) e a espessura, ΔP é a diferença de pressão parcial de vapor de água entre as faces do filme.

4.6.2.7. Solubilidade em água

A solubilidade em água foi determinada seguindo o método Soni e colaboradores (2016) com modificações. Para isso, 4 réplicas de cada filme, medindo aproximadamente $2 \times 2 \text{ cm}^2$, foram secos em estufa a 105 °C por 24 h, ponderados e submetidos à agitação (150 rpm) durante 24 h a 25 °C em 50 mL de água destilada. Posteriormente, o material restante foi filtrado, seco a 105 °C durante 24 horas e ponderado novamente (SONI et al., 2016). Os resultados foram expressos em porcentagem de perda de massa. A porcentagem da matéria insolúvel total (% MI) foi calculada usando a equação 5:

$$\%MI = \frac{\text{peso inicial} - \text{peso final}}{\text{peso inicial}} 100 \quad (5)$$

4.6.2.8. Hidrofobicidade de superfície

A hidrofobicidade superficial dos filmes foi avaliada medindo o ângulo de contato (AC) de uma gota de água na superfície da película através de um medidor de ângulo de contato óptico (Instrumentos GBX). Para medir os ângulos, foi colocada uma gota na superfície dos filmes (3x3 cm) fixados em uma placa de Petri. Após a fixação, os vídeos de gotejamento de água foram gravados na superfície do filme, na câmera Pixe Link Nikon acoplada no ângulo de contato GBX Instrumentation Specificque. A medida do ângulo de contato foi realizada no momento em que a gota tocou a superfície do filme, coletado através do software Visiodrop.

4.6.2.9. Cor e Opacidade

Os parâmetros de cor e opacidade dos filmes foram determinados utilizando um colorímetro Minolta (Cr 400; Minolta Japão). Foi utilizada uma placa padrão de cor branca ($Y=93,7$, $x = 0,32$, $y = 0,33$) como plano de fundo para calibração do equipamento e como plano de fundo para as medidas de cor. Os parâmetros determinados foram L^* , a^* e b^* (Sistema CIELab) que são recomendados pela Comissão Internacional de Iluminação. No sistema de cores L^* representa a luminosidade (variando de preto a branco) enquanto que a^* e b^* são as coordenadas cromáticas, onde $+ a^*$ e $- a^*$ estão nas direções vermelha e verde, respectivamente, enquanto que $+ b^*$ está na direção amarela e $- b^*$ está na direção azul. A opacidade dos filmes de celulose foi determinada de acordo com o método Hunter Lab, como a relação entre a opacidade de cada amostra em um padrão branco (Y_W) e um padrão preto (Y_b) (BALLESTEROS et al., 2017). Para ambas as análises de cor e opacidade foram feitas três medidas para cada filme.

4.7. Avaliação de citotoxicidade utilizando células epiteliais intestinais

4.7.1. *Cultura celular*

A linha celular Caco-2 do carcinoma do cólon humano (ATCC, HTB-37) foi utilizada nas passagens 25-40. As células de Caco-2 foram cultivadas em frascos de cultura contendo Meio Mínimo Essencial (MEM), suplementado com 20% de soro de bovino fetal, 0,1 mg / mL de piruvato de sódio, 1% de

aminoácidos não essenciais e 1% de penicilina / estreptomicina. As células foram mantidas a 37 °C em uma atmosfera contendo 5% de CO₂ a 95% de umidade relativa (incubadora Binder, CB 160). As células foram cultivadas perto da confluência em um balão de plástico de 75 cm² e colhidas semanalmente com tripsina.

4.7.2. Citotoxicidade - viabilidade celular através do ensaio de resazurina

O ensaio de resazurina foi utilizado para avaliar a viabilidade celular de Caco-2 após incubação com filmes de ACC (ANSAR AHMED; GOGAL; WALSH, 1994; XU; MCCANNA; SIVAK, 2015). Células Caco-2 foram semeadas em placas de 96 poços a uma densidade de 10 000 células por poço e deixadas aderindo durante a noite. Após a adesão, o meio de cultura foi removido e substituído pelas películas ACCU diluídas no meio de cultura a uma concentração de 2,0 ou 0,5 mg / mL.

Os filmes ACCU contendo 0%, 2,5%, 5,0% ou 7,5% de NCCB foram cortados em pequenos pedaços e 50 mg de cada película foi adicionada à 20 mL de água destilada. As suspensões foram agitadas magneticamente a 700 rpm durante 3 h e depois homogeneizadas por um misturador elétrico mini mixer durante 5 minutos. Depois disso, as suspensões foram centrifugadas (Universal, 320, Hettich) a 645G durante 5 minutos para remover a água. Após a centrifugação, as amostras foram dispersas em 5 mL de meio de cultura, sonicadas durante 10 min (frequência 80Hz, potência 90 W) e submetidas a agitação em vórtex durante 3 minutos, obtendo a solução-mãe (SM) com uma concentração de 10 mg. mL⁻¹. As concentrações de teste foram preparadas por diluição da SM no meio de cultura e expostas à luz ultravioleta durante 30 min para esterilização.

Um controle negativo foi realizado usando células que crescem no meio de cultura (considerado como 100% de viabilidade celular). Foram utilizados 30% de DMSO como controle positivo. As amostras foram incubadas durante 24 h ou 48 h com 10% de solução de resazurina (concentração final 0,01 mg / mL). A resazurina foi adicionada simultaneamente com amostras, uma vez que não é tóxica, para proporcionar uma sensibilidade adequada (ANSAR AHMED;

GOGAL; WALSH, 1994; XU; MCCANNA; SIVAK, 2015). Para todas as amostras, um branco foi realizado utilizando amostras diluídas no meio de cultura incubadas com resazurina (sem células).

A intensidade de fluorescência, que é proporcional à viabilidade celular, foi medida utilizando um Microplate Fluorescence Reader (Synergy, BioTek H1, EUA) com um comprimento de onda de excitação de 560 nm e um comprimento de onda de emissão de 590 nm. A viabilidade celular foi expressa como percentagem de fluorescência em células tratadas (amostras) em comparação com a cultura de controle (fluorescência de células que crescem no meio de cultura) como se segue:

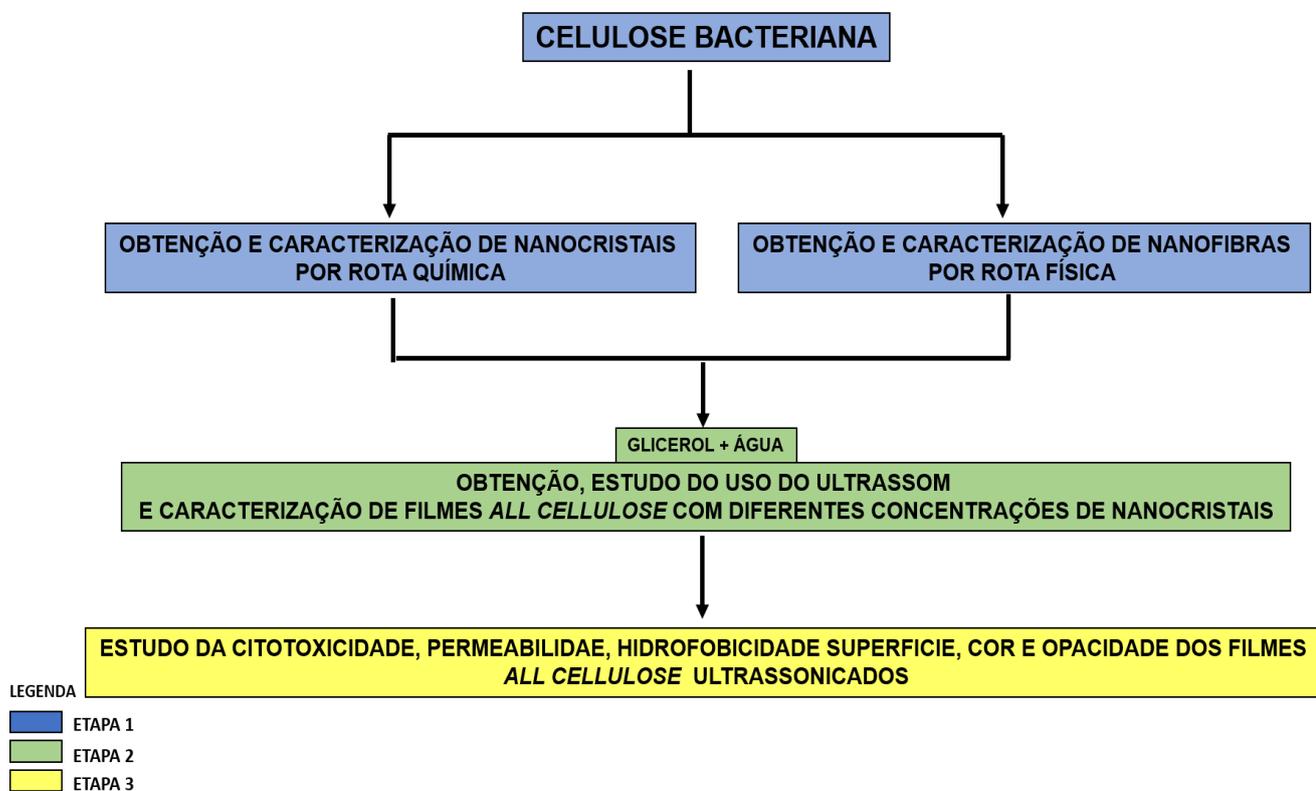
$$\% \text{ de viabilidade celular} = (\text{Fluorescência de células tratadas com amostra} - \text{Fluorescência da amostra}) / (\text{Fluorescência de células que crescem no meio de cultura} - \text{Fluorescência de meio de cultura}) * 100$$

4.8. Análise Estatística

A análise estatística foi realizada utilizando a análise de variância produzida com o software Statistic10. O teste de Tukey foi aplicado para detectar diferenças significativas, e $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

O esquema (Figura 12) a seguir mostra um resumo das etapas realizadas durante o desenvolvimento dos *all cellulose composite*.

Figura 12 - Esquema resumido das principais tarefas realizadas na obtenção dos filmes *all cellulose composite*.



Fonte: Próprio autor

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Etapa 1 – Obtenção e caracterização de nanofibras de CB

5.1. Quantificação de Carboxilato CB Oxidada a TEMPO

Os grupos carboxilato ($-\text{COO}^-\text{Na}^+$) formados após a oxidação TEMPO promovem a repulsão eletrostática entre cadeias, facilitando a desagregação de nanofibrilas e uma suspensão mais dispersa a pH neutro (SAITO et al., 2011). A CBOX apresentou 0,244 mmol de grupos carboxilato por grama de celulose (grau de oxidação, 0,04), evidenciando a funcionalização. Mesmo com teor de carboxilato da CBOX tendo sido inferior ao valor mínimo (0,8 mmol / g) recomendado para uma fibrilação eficiente (ISOGAI et al., 2011) foi possível através uso de misturador de alta rotação promover a formação de nanofibras de CB como um gel homogêneo. Uma vez que CB tem uma cristalinidade naturalmente maior (ou seja, regiões menos amorfas), em comparação com outras celuloses nativas, é mais difícil que íons nitrosônicos (provenientes da oxidação) penetrem em regiões cristalizadas. Portanto, apenas as fibrilas expostas na superfície podem ser oxidadas, explicando o baixo grau de oxidação obtido para a CBOX (ISOGAI; SAITO; FUKUZUMI, 2011; JIA et al., 2016). Adicionalmente sabe-se que condições de oxidação mais severas, que levaram a maiores níveis de carboxilato, poderiam resultar em fibrilas com comprimentos muito menores, conforme observado por Liu, Oksman e Mathew (2016).

5.2. Rendimento do processo de obtenção das nanofibras de CB

O rendimento de um processo é calculado para observarmos as perdas que acontecem durante a obtenção ou conversão de um material em um produto. Essas perdas precisam ser identificadas, entendidas e avaliadas para que se uma boa aplicabilidade do processo. O rendimento das nanofibrilas foi calculado a partir da CB seca, antes do processo de oxidação até a etapa de liofilização e o valor obtido foi de 89% (base seca). Nota-se que houve uma perda de, apenas, 11% em todo o processo (oxidação – nanofibrilação – liofilização), o que é natural devido a amostra, após liofilização, ser moída em pequena granulometria e difícil contenção. Ainda não se tem dados na literatura sobre o

rendimento da obtenção de celulose nanofibrilada a partir de homogeneizador de alta rotação, entretanto Nunes (2014), obteve rendimento semelhante (87%), passando a suspensão de celulose de origem vegetal 15 vezes por um homogeneizador de alta pressão, o que acarretou muita energia ao processo (NUNES, 2014). Vale ressaltar que os valores de rendimento obtidos no processo de nanofibrilação por homogeneizador de alta rotação não foram tão aquém dos equipamentos já utilizados, podendo ser uma alternativa de baixo custo para obtenção de nanofibras de celulose.

5.3. Caracterização CB, CBOX, CBOXNF e CBOXNFL

5.3.1. Potencial Zeta

Vários métodos de secagem de nanofibras de celulose, como secagem em estufa, liofilização e secagem supercrítica já foram estudados (PENG; GARDNER; HAN, 2012; QUIÉVY et al., 2010; ŽEPIČ et al., 2014). No entanto, todos esses métodos resultaram em agregação ou formação de uma rede forte de nanopartículas. A análise de potencial Zeta tem como finalidade avaliar a presença de cargas superficiais na molécula, além da estabilidade (VASCONCELOS et al., 2017). Valores de potencial Zeta maiores que 30mV em módulo, indicam uma boa estabilidade da suspensão (CRUZ, et al 2012).

CBOX, CBOXNF apresentaram valores de potencial Zeta de -67, e -58 mV respectivamente. Esses resultados mostraram que, apesar do grau de oxidação da CBOXNF ter sido menor que o da celulose vegetal nanofibrilada (0,8 mmol / g), a oxidação mediada pelo radical TEMPO descrita neste estudo foi suficiente e essencial para proporcionar alta estabilidade à celulose nanofibrilada quando comparada ao potencial Zeta da CB nanofibrilada não oxidada que é relatada na literatura com sendo -12,9 mV (JIA et al., 2016). Esta estabilidade da dispersão aumentada é atribuída à repulsão eletrostática fornecida pelos grupos carboxi aniônicos após a oxidação (EYHOLZER et al., 2010; ISOGAI; SAITO; FUKUZUMI, 2011)

A secagem das suspensões nanofibriladas é importante por dois motivos principais: alargar o seu âmbito de aplicação e reduzir os custos de transporte. Um grande desafio com os nanomateriais de celulose é quando uma suspensão

bem dispersa deve ser seca. A agregação de cadeia irreversível (conhecida como hornificação) geralmente ocorre como resultado da secagem de nanofibrilas de celulose devido à formação de ligações de hidrogênio adicionais entre partes amorfas das fibrilas (EYHOLZER et al., 2010), levando à perda de propriedades relacionadas à nanoestrutura do material (BECK; BOUCHARD; BERRY, 2012). De fato, a CBOXNFL redispersa apresentou maior potencial Zeta (-63mV) quando comparado ao CBL (-25 mV), o que implica que CB não modificado tende a ter suas cadeias agregadas após a secagem.

A Organização Internacional de Padronização (International Organization for Standardization - ISO) define a turbidez como "reduzindo a transparência de um líquido causada pela presença de matéria não dissolvida" (ISO, 2016). Ou seja, a turbidez é diretamente proporcional à sua concentração, então quanto mais turva a suspensão, mais concentrada ela será. Os valores de NTU para água destilada, água encanada e água bruta são de 0,08, 0,54 e 3,52, respectivamente, mas valores muito mais altos, bem acima de 150 NTU, são comuns em muitos sistemas hidrológicos (LAWLER, 2005). O valor turbidimétrico obtido na análise BCOXNFR foi 2951 NTU, e quando comparado com os valores utilizados como padrão para água destilada (0,08 NTU) é bastante elevado, caracterizando uma suspensão altamente turva, corroborando o alto valor de estabilidade da suspensão encontrado na análise de potencial Zeta (-63mV). Ao mesmo tempo, foi realizada a análise turbidimétrica da amostra de BC e BCNF, porém os valores turbidimétricos foram semelhantes aos da água encanada (0,54 NTU), devido à rápida precipitação das amostras antes da análise.

5.3.2. Análise Termogravimétrica – TGA

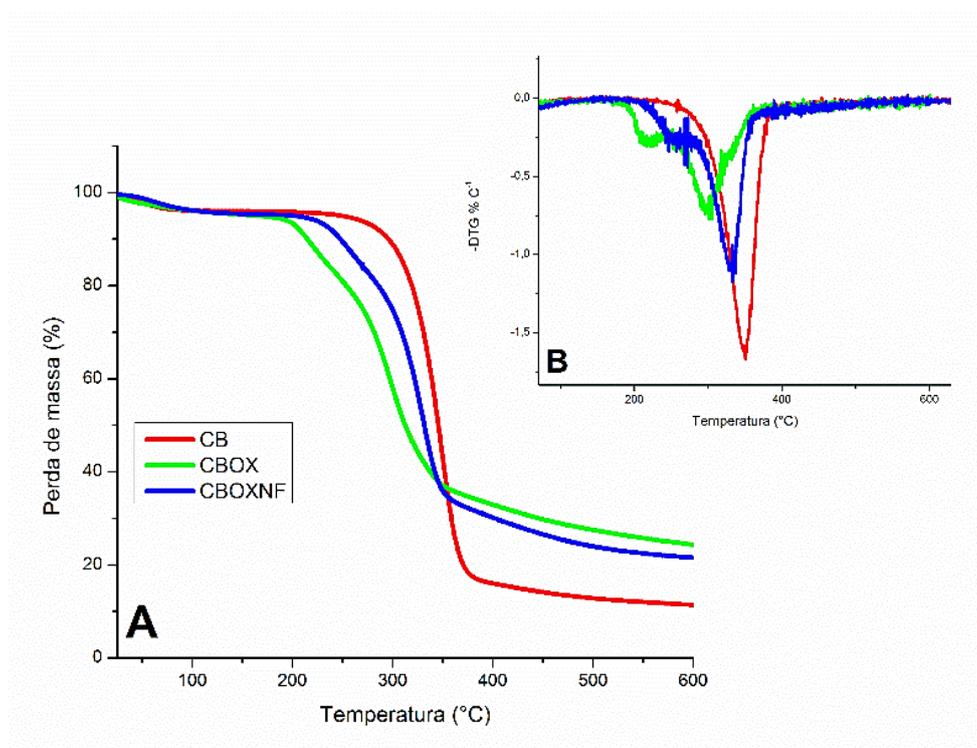
A Figura 12 mostra as curvas termogravimétricas e suas respectivas curvas derivadas (DTG) de CB, CBOX e CBOXNF. As três análises apresentaram curvas de degradação térmica semelhantes. Os picos de degradação térmica iniciais (Tonset) para CBOX (190 °C) e CBOXNF (218 °C) foram claramente inferiores comparados aos de CB íntegra (260 °C). Esta diminuição na temperatura inicial de degradação provavelmente foi causada pelos grupos carboxilato de sódio presentes na estrutura de CBOX e CBOXNF

provenientes da oxidação TEMPO (FUKUZUMI et al., 2010). Por outro lado, observa-se que o pico de degradação máximo da CBOX e CBOXNF foi em 301°C e 330°C, respectivamente, evidenciando mais uma vez a oxidação e a diminuição na estabilidade térmica da CB causada pela inserção dos grupos carboxilatos de sódio, quando comparado a T_{máx} da CB (351°C). A tabela mostra a porcentagem de perda de massa referente aos principais eventos para as três amostras analisadas.

Tabela 2 - Temperatura de degradação inicial (Tonset) e temperatura máxima de degradação (T_{máx}), percentuais de perda de massa e cinzas da CB, CBOX e CBOXNF.

Amostra	Tonset (°C)	T _{máx} (°C)	Perda de massa (%)	Cinzas (%)
CB	260	351	81	19
CBOX	190	301	64	36
CBOXNF	218	330	56	44

Figura 13 - Curvas termogravimétrica (A) e curvas derivadas (B) correspondentes à análise térmica da celulose bacteriana (CB) sem modificação química, celulose bacteriana oxidada a TEMPO (CBOX) e celulose bacteriana oxidada nanofibrilada (CBOXNF).

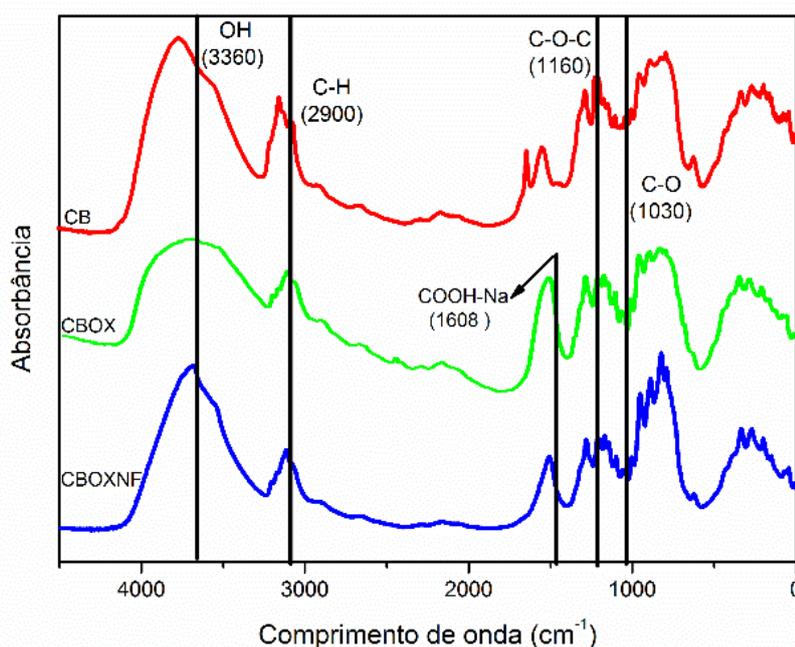


Fonte: Próprio autor

5.3.3. Espectroscopia no Infravermelho por transformada de Fourier

A Figura 13 apresenta os espectros FTIR de CB, CBOX e CBOXNF. Além das bandas típicas de CB (alongamento de OH a 3350 cm^{-1} , flexão de OH a 2900 cm^{-1} , alongamento de C-O-C a 1160 cm^{-1} e alongamento de CO a 1030 cm^{-1}), CBOXNF apresentou uma banda adicional a 1608 cm^{-1} que é atribuída a C = O, confirmando a formação de grupos carboxilatos (SILVA PEREZ, D.; MONTANARI; VIGNON, 2003; ZHANG et al., 2016). A ausência de picos referentes ao grupo aldeído na região ($1720\text{-}1740\text{ cm}^{-1}$) indica que esses grupos foram transferidos ou transformados em outros grupos após oxidação, provavelmente grupos carboxilatos (BENHAMOU et al., 2014; ISOGAI et al., 2011).

Figura 14 - Espectros de FTIR da celulose bacteriana (CB) sem modificação química, celulose bacteriana oxidada a TEMPO (CBOX) e celulose bacteriana oxidada nanofibrilada (CBOXNF)



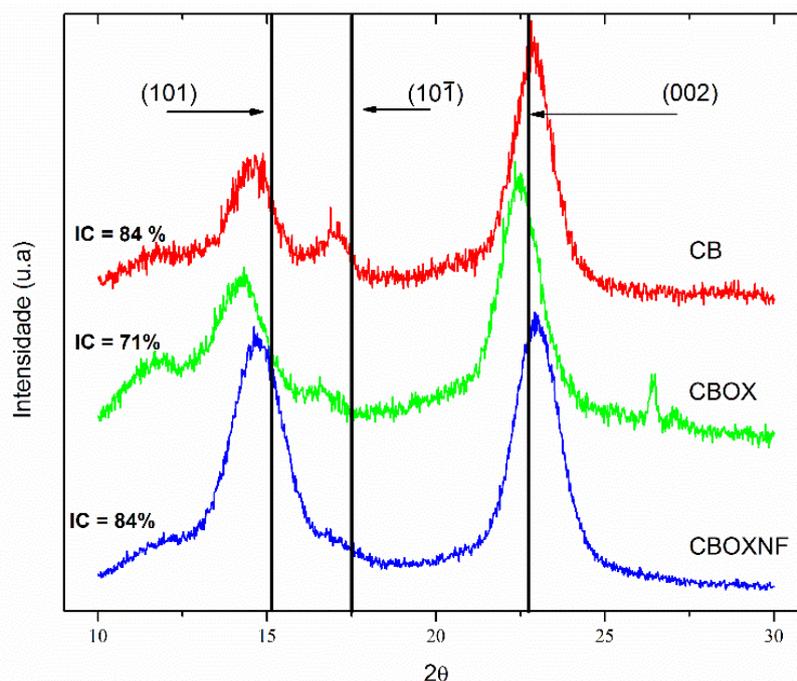
Fonte: Próprio autor

5.3.4. Difração de Raios-X

A Figura 14 apresenta os difratogramas DRX. Os índices de cristalinidade (IC) foram 84%, 71% e 84%, respectivamente, para CB, CBOX e CBNF. Os seguintes picos foram identificados: para CB, $14,7^\circ$, $17,1^\circ$ e $22,8^\circ$; para CBOX

11,8°, 14,2°, 16,6° e 22,4°; e para CBNF, 14,7 ° e 22,9°. Os picos de cerca de 15°, 17° e 22°, atribuídos aos planos cristalográficos (101), (101) e (002), respectivamente, são característicos da celulose I; os ângulos 12,5°, 20,1° e 22,7° são comuns na celulose II. A presença de celulose II pode ser atribuída à conversão de celulose I através de tratamentos alcalinos e ácidos durante o processamento da matéria-prima, onde a celulose I é o alomorfo mais forte (HUBER; PANG; STAIGER, 2012). A sobreposição e o deslocamento de picos podem ocorrer por deformação e/ou destruição de cristais durante o processamento mecânico, como a fibrilação (XU et al., 2013). Nenhuma das amostras apresentou picos a 20,1°, indicando que não houve conversão de celulose I. Após a oxidação, um novo pico apareceu a 11,8°, e a intensidade do pico a 16,6° diminuiu. Após a fibrilação, o perfil cristalográfico foi notavelmente alterado, com deslocamento e sobreposição dos picos a 11,7° e 16,6°. O índice de cristalinidade aumentou após a nanofibrilação da CB oxidada, devido à despolimerização das cadeias celulósicas por reações de eliminação (ISOGAI; KATO, 1998) que, quando combinadas com o tratamento mecânico, resultaram em maior conteúdo de regiões cristalinas, que são quimicamente e mecanicamente mais estáveis.

Figura 15 - Difrátogramas de Raios-X correspondentes aos picos cristalinos da celulose bacteriana (CB) sem modificação química, celulose bacteriana oxidada a TEMPO (CBOX) e celulose bacteriana oxidada nanofibrilada (CBOXNF) e seus respectivos índices de cristalinidade



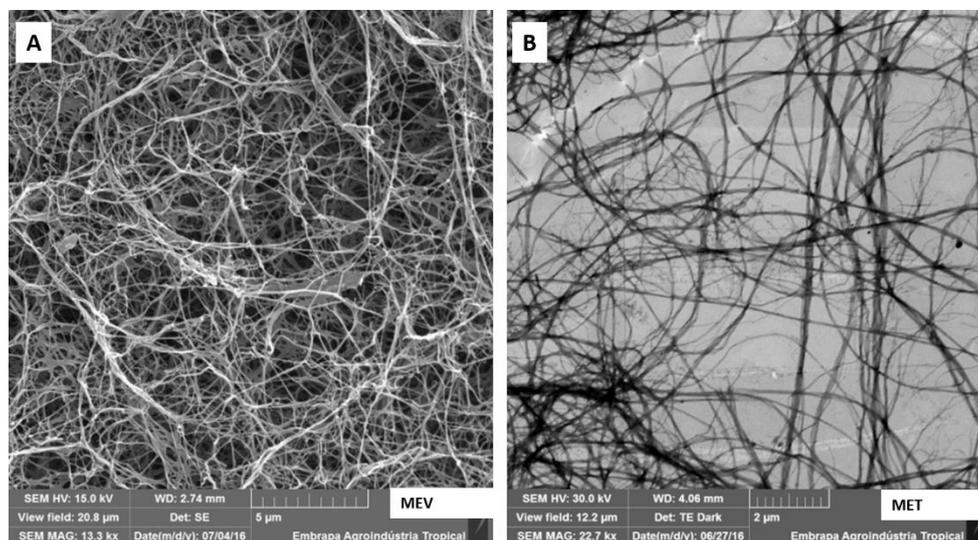
Fonte: Próprio autor

5.3.5. Microscopia Eletrônica de varredura (MEV) e Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Em virtude das características físicas do material as amostras de CB foram visualizadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e as amostras de CBOXNF foram visualizadas utilizando microscopia eletrônica de transmissão (MET). Em ambas as amostras as micrografias (Figura 16) apresentaram morfologias com perfil semelhante, indicando que os processos de oxidação e nanofibrilação na CB, não modificou sua estrutura. Os grupos da superfície podem ter influenciado a aglomeração das nanofibras em CBOXNF, evidenciando uma maior desagregação, quando comparada à CB, que apresenta uma estrutura mais aglomerada (LAI et al., 2014). As espessuras médias das nanofibras foram de $68 \text{ nm} \pm 15 \text{ nm}$ para CB (variando de 29 a 160 nm) e $40 \text{ nm} \pm 8 \text{ nm}$ para CBOXNF (variando de 18 a 131 nm), semelhantes aos valores relatados para nanofibras de celulose de diferentes fontes (ALEMDAR; SAIN, 2008; SAITO et al., 2006; XU et al., 2013). Vale ressaltar que a oxidação mediada pelo radical TEMPO, embora com baixo (0,244 mmol/g de CB) teor de

carboxilato mencionado no item 5.1, foi necessária e suficiente para obtenção das nanofibras de celulose bacteriana desagregadas.

Figura 16 - Micrografias representando a morfologia da celulose bacteriana sem modificação química (CB), celulose bacteriana e celulose bacteriana oxidada nanofibrilada (CBOXNF).



Fonte: Próprio autor

Etapa 2 – Obtenção, caracterização e estudo do uso do ultrassom na obtenção dos filmes *all cellulose composite*

5.3.6. Caracterização e Rendimento dos Nanocristais de CB

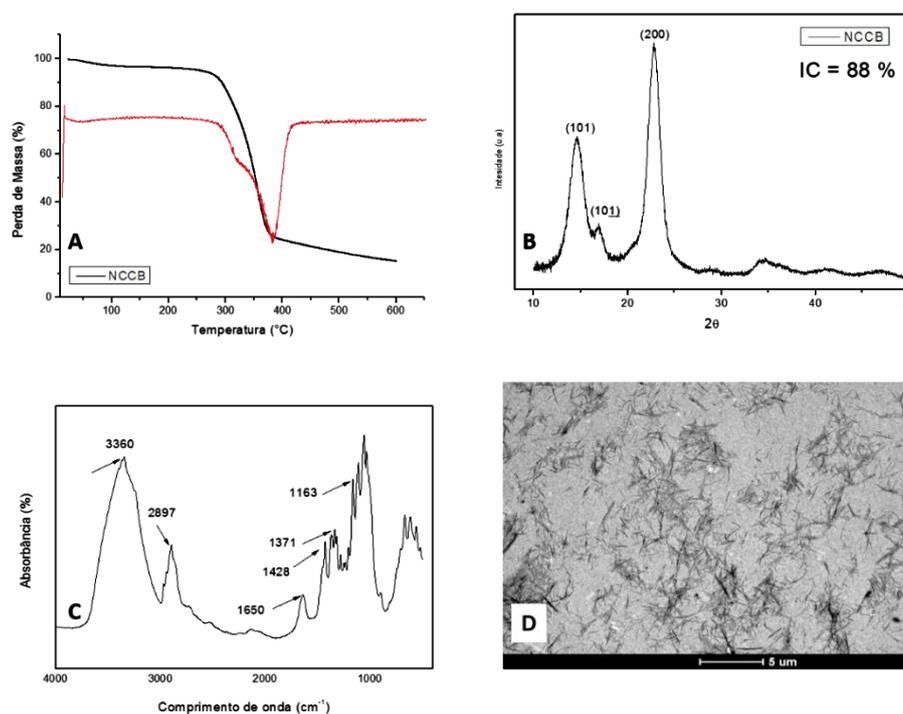
A caracterização dos nanocristais obtidos estão apresentadas na Figura 17. A degradação térmica da celulose bacteriana envolve a despolimerização, a desidratação e a decomposição das unidades glicosídicas seguidas da formação de um resíduo carbonizado (SOUZA, 2015). A curva TG (Figura 17 A) e sua respectiva DTG dos nanocristais apresenta perfil característico de CB com um pico de degradação em torno de 350 °C. Essa alta estabilidade térmica obtida nos nanocristais pode ser explicada pelo uso da mistura combinada dos ácidos sulfúrico e clorídrico (CORRÊA et al., 2010). Estudo comparando diferentes condições de hidrólise, relata uma estabilidade térmica 17% maior ao utilizarem uma mistura de ácidos (H₂SO₄ / HCl) na obtenção de nanocristais de CB (VASCONCELOS et al., 2017).

Os padrões de raios X mostraram os três picos de difração (Figura 17 B) que são característicos da celulose I α (triclínica) e que prevalecem na CB. Estes três picos, $2\theta = 4,6^\circ$, $19,9^\circ$ e $22,9^\circ$, são atribuídos aos planos cristalográficos de (100) e (101) (região amorfa) e (200) região cristalina, respectivamente. O índice de cristalinidade tem influência direta nas propriedades mecânicas dos materiais. O índice de cristalinidade dos NCCB (88%), como esperado, foi elevado, uma vez que durante o processo de hidrólise, a fase amorfa da celulose é destruída, liberando os nanocristais e aumentando o índice de cristalinidade (HENRIQUE et al., 2015).

A Figura 17 C apresenta os espectros de FTIR dos NCCB. Os gráficos mostram bandas características de CB em 3360 cm^{-1} e 1640 cm^{-1} , associadas à vibração de estiramento e vibração de flexão do -OH, respectivamente. O espectro mostrou também, bandas em 2897 cm^{-1} (alongamento C-H), 1371 cm^{-1} (deformação angular simétrica de C-H), 897 cm^{-1} (deformação angular de ligações C-H), 429 cm^{-1} (deformação angular assimétrica de ligações C-H) (HENRIQUE et al., 2015; VASCONCELOS et al., 2017).

As micrografias de MET (Figura 17 D) dos NCCB, como esperado para nanocristais obtidos por hidrólise ácida, mostram pequenas estruturas em formato de haste que lembram agulhas. A razão de aspecto (L/D) é um parâmetro importante na obtenção dos nanocristais que são destinados ao reforço de nanocompósitos e pode ser diretamente influenciada por fatores como concentração de ácido utilizado na hidrólise, fonte de celulose e força iônica (DUFRESNE, 2012). O comprimento (L) dos nanocristais variou de 900 a 2200 nm, com largura (D) variando de 60 a 90, produzindo valores médios de $L = 1469 \pm 362\text{ nm}$, $D = 72 \pm 20$ e uma razão $L/D = 20$. Nanocristais apresentam uma razão de aspecto que podem variar de 1 a 100 e quanto mais próximo de 100, melhor será seu potencial de reforço em nanocompósitos (FARUK et al., 2012). Em geral, uma razão de aspecto maior que 13 é considerada boa para aplicação dos nanocristais como reforço em nanocompósitos (DUFRESNE, 2012).

Figura 17 - Caracterização dos nanocristais de CB. A) curvas TG e DTG da análise termogravimétrica B) Difratogramas de Raios-X C) Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier - FTIR D) Microscopia eletrônica de transmissão – MET



Fonte: Próprio autor

O potencial Zeta é analisado para verificar a estabilidade da suspensão pela presença das cargas de superfície. A suspensão de NCCB analisadas apresentou valor de potencial Zeta -35 mV. Uma boa estabilidade na suspensão é considerada quando valores de Zeta apresentam-se maiores que >30 mV em módulo (MIRHOSSEINI et al., 2008; VASCONCELOS et al., 2017)

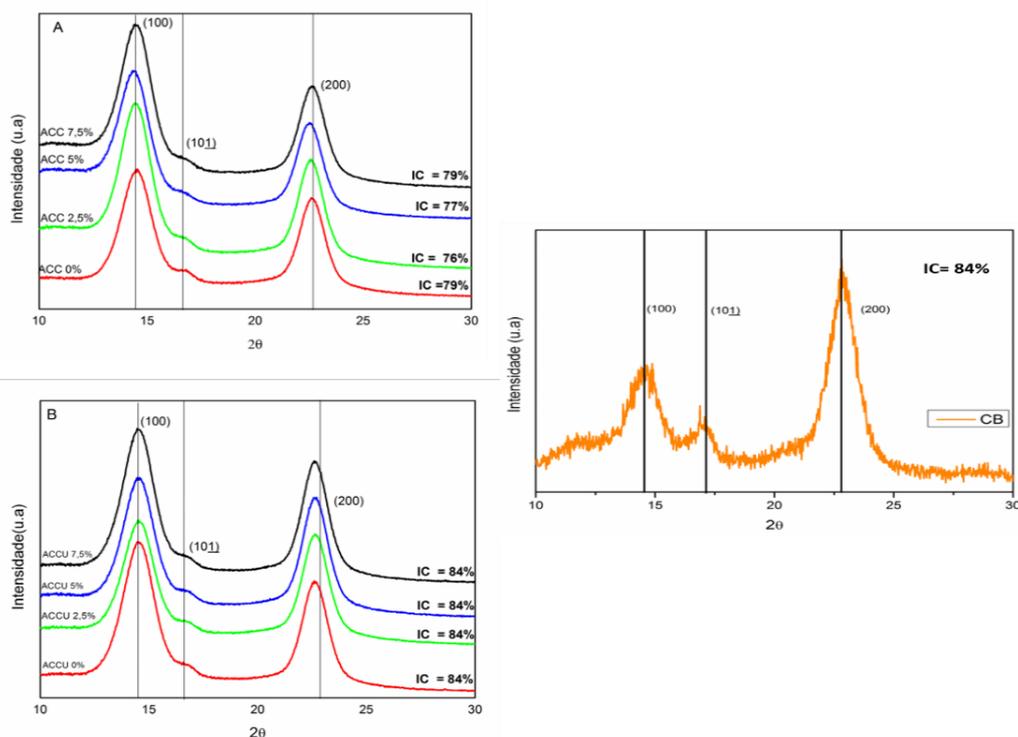
O rendimento foi calculado com base de massa seca de NCCB obtido após a hidrólise e a massa de CB seca inicial do processo. O percentual de rendimento de nanocristais foi 56%, em base seca. Poucos trabalhos na literatura apresentam resultados para o rendimento de NCCB. Tapina, 2012 encontrou valores de rendimento de 65, 68 e 71% para nanocristais obtido a partir de fibras de curauá, celulose microcristalina e fibras de algodão (TAIPINA, 2012).

5.4. Caracterizações dos Filmes ACC e ACCU

5.4.1. Difração de Raios-X

De acordo com a Figura 18, todos os filmes (ACC e ACCU) mostraram o mesmo perfil de difração de raios X com picos característicos de celulose I com $2\theta = 14,5^\circ$, $16,6^\circ$ e $22,6^\circ$ (CHEN et al., 2013; JIANG; HSIEH, 2013), atribuídos aos planos cristalográficos (101), ($10\bar{1}$) e (002). Todos os picos apresentaram intensidade semelhante, sugerindo que a estrutura original da CB nativa foi essencialmente mantida (FENG et al., 2012; TSOUKO et al., 2015). Devido a correlação entre as propriedades mecânicas e a cristalinidade dos materiais celulósicos, é imprescindível a avaliação desta característica em filmes nanocompósito. O índice de cristalinidade (IC) foi, em média, 77% para os filmes ACC (Figura 18 A) e 84% para os filmes ACCU (Figura 18 B), em ambos os filmes a cristalinidade permaneceu alta quando comparados à estrutura original de CB (IC = 84%) na Figura 18 C. Em relação ao processo de obtenção dos *all cellulose composite* produzidos a partir de celulose dissolvida em solventes, observa-se que a cristalinidade diminui consideravelmente quando há um aumento do tempo de dissolução. Em estudo feito por Soykeabkaew e colaboradores (2009), que avaliaram a influência do tempo de dissolução seletiva nas fibras de celulose, o aumento do tempo de duas para doze horas de imersão diminuiu a cristalinidade das fibras em mais de 50% representando uma desvantagem no processo quando se pretende obter nanocompósitos com boas propriedades mecânicas (SOYKEABKAEW et al., 2009). Em um tempo de imersão maior, o solvente possivelmente penetra mais através nos espaços vazios entre os cristalitos e dissolve tanto as cadeias amorfas quanto os cristalitos, afetando a cristalinidade (TANPICHAI; WITAYAKRAN, 2016).

Figura 18 - Difratoogramas de Raios-X de *all cellulose composite* A) sem uso do ultrassom: ACC 0%, ACC 2,5%, ACC 5% e ACC 7,5%, (B) com uso do ultrassom: ACCU 0%, ACCU 2,5%, ACCU 5% e ACCU 7,5% e (C) celulose bacteriana íntegra

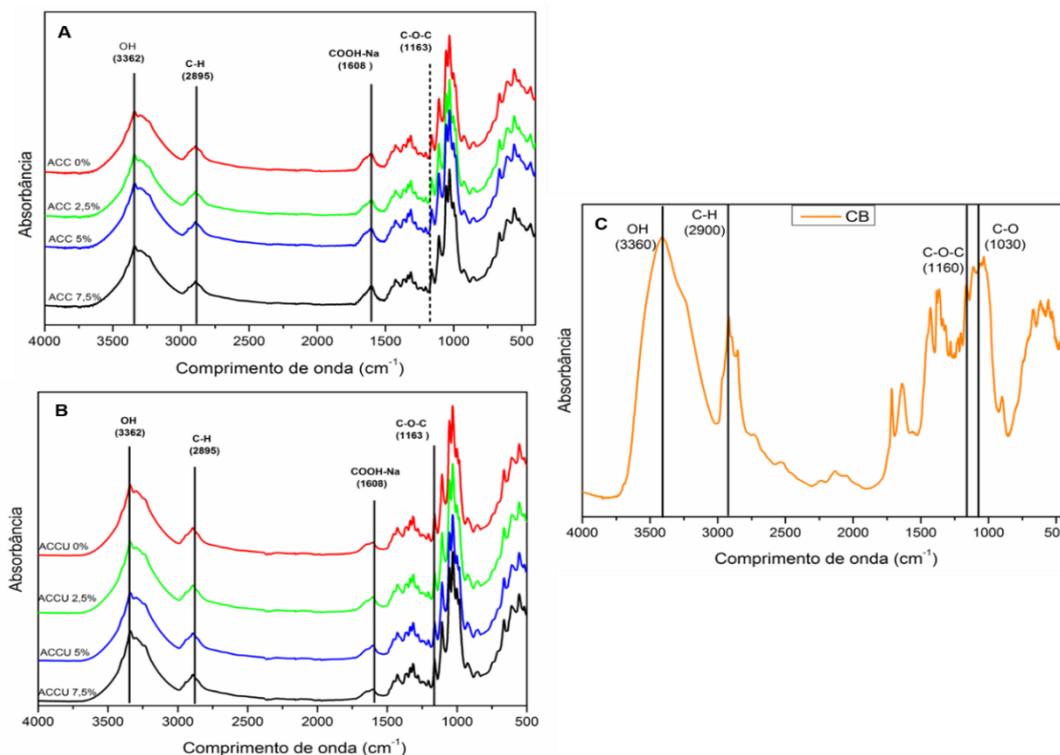


Fonte: Próprio autor

5.4.2. Espectroscopia no Infra-vermelho por transformada de Fourier – FTIR

Como esperado, os espectros FTIR de ACC e ACCU (Figura 18) apresentaram bandas de vibração típicas de CB a 1163 cm^{-1} (distensão assimétrica de ligações CH), 1371 cm^{-1} (tensão angular simétrica CH), 1429 cm^{-1} (tensão angular assimétrica de ligações CH), 3362 cm^{-1} , (alongamento de ligações OH). No comprimento de onda de 1608 cm^{-1} , pode-se observar um pico em relação ao grupo de sal de sódio do ácido carboxílico, referente à oxidação TEMPO realizada. A ausência de um pico evidente em 897 cm^{-1} (deformação da ligação β -glicosídica C1-O-C4) na região anomérica $950\text{ a }700\text{ cm}^{-1}$ pode significar clivagem na ligação β -glicosídica por tratamentos mecânicos e/ou químicos (JIANG; HSIEH, 2013). No espectro, não foram observadas bandas em relação à vibração simétrica (807 cm^{-1}) associada aos grupos sulfato, derivada da esterificação da hidrólise (VASCONCELOS et al., 2017).

Figura 19 - Espectros FTIR dos filmes *all cellulose composite* (A) sem uso do ultrassom: ACC 0%, ACC 2,5%, ACC 5% e ACC 7,5%, (B) com uso do ultrassom: ACCU 0%, ACCU 2,5%, ACCU 5% e ACCU 7,5% e (C) celulose bacteriana íntegra

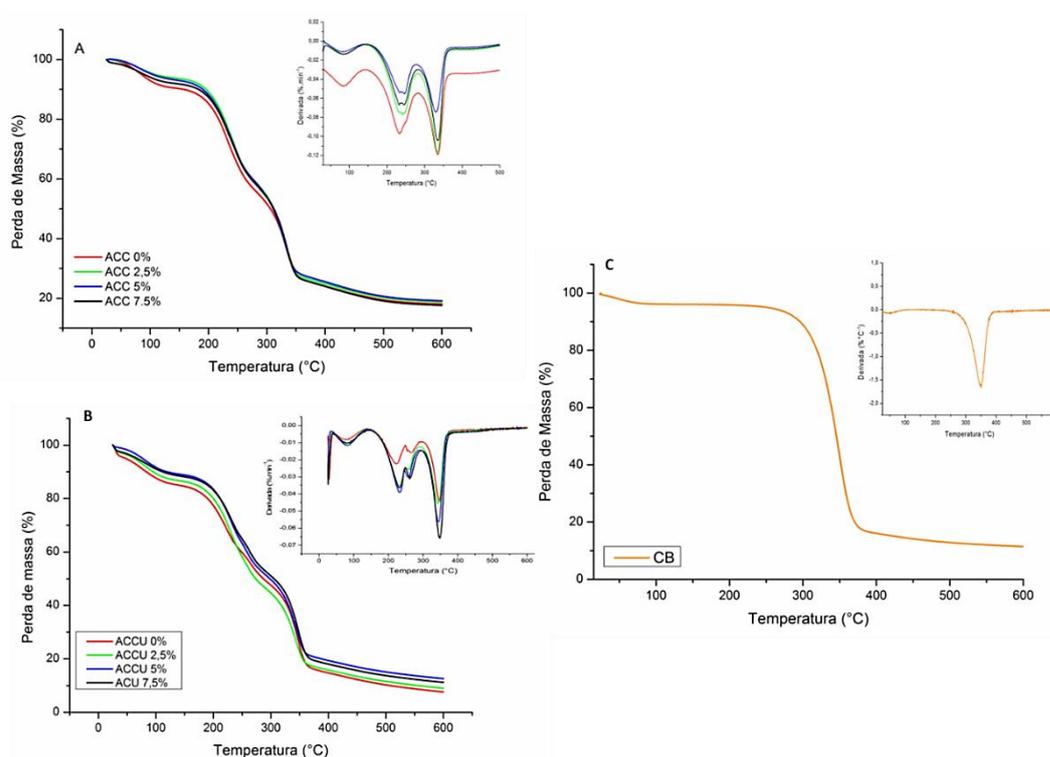


Fonte: Próprio autor

5.4.3. Análise Termogravimétrica - TGA

A Figura 19 mostra curvas de análise termogravimétrica e suas respectivas curvas derivadas (DTG). No geral, para todos os filmes, a perda de massa no primeiro pico em torno de 80°C foi de 6 a 10% correspondente à evaporação da água adsorvida. Nos filmes *all cellulose composite* sem o uso do ultrassom (ACC – Figura 19 A) e com o uso do ultrassom (ACCU - Figura 19 B) foram observados um pico de temperatura inicial em torno de 242 e 262 °C, respectivamente, com uma média de perda de massa de 34,6 % (ACC) e 37,8% (ACCU), apresentadas na Tabela 3. O gráfico C da figura 19, além do pico de evaporação da água (em torno de 60°C), mostra um segundo pico em torno de 350°C, indicando a degradação da celulose. As temperaturas iniciais de degradação dos filmes mostram claramente uma diminuição na estabilidade térmica quando comparados à CB devido à degradação das unidades de anidroglicoronato de sódio, presentes nos filmes após a oxidação TEMPO (DE BRITTO; ASSIS, 2009; FUKUZUMI et al., 2010).

Figura 20 - Curvas termogravimétricas (TG) e curvas derivadas (DTG) para filmes all cellulose composite (A) sem uso do ultrassom: ACC 0%, ACC 2,5%, ACC 5% e ACC 7,5%, (B) com uso do ultrassom: ACCU 0%, ACCU 2,5%, ACCU 5% e ACCU 7,5% e (C) celulose bacteriana íntegra



Fonte: Próprio autor

Tabela 3 - Média das Temperaturas de degradação inicial (Tonset), temperaturas máxima de degradação (Tmax), percentuais de perda de massa e cinzas dos filmes *all cellulose composite* sem uso do ultrassom: ACC 0%, ACC 2,5%, ACC 5% e ACC 7,5%, com uso do ultrassom: ACCU 0%, ACCU 2,5%, ACCU 5% e ACCU 7,5%, com uso do ultrassom: ACCU 0%, ACCU 2,5%, ACCU 5% e ACCU 7,5% e celulose bacteriana íntegra

FILMES	Pico 1			Pico 2			Pico 3			CINZAS (%)
	Tonset (°C)	Tmáx (°C)	Perda de Massa (%)	Tonset (°C)	Tmáx (°C)	Perda de Massa (%)	Tonset (°C)	Tmáx (°C)	Perda de Massa (%)	
ACC	41	83	6,0	144	242	34,6	283	333	33,7	25,3
ACCU	39	81	9,97	142	262	37,8	295	345	32,69	19,2
CB	25	53	2,5	84	351	82,2	****	*****	*****	14,6

5.4.4. Propriedades Mecânicas

As propriedades mecânicas avaliadas são apresentadas na Tabela 4.

Observa-se que nos filmes sem ultrassom (ACC) a resistência à tração (σ) aumentou de 53MPa (ACC 0%) para 64MPa (ACC 7,5%), equivalente à uma adição de 20%. Nos filmes em que o ultrassom foi utilizado na suspensão

filmogênica (ACCU), esse percentual foi de 30 %, aumentando a resistência à tração de 50 MPa para 65 MPa. Seguindo esta lógica, podemos observar que, em ambos os filmes (ACC e ACCU) os resultados de deformação (ϵ) diminuíram com a adição das nanopartículas, mostrando-se menos flexíveis. Os resultados do módulo de elasticidade (Y) mostram que nos filmes sem o uso do ultrassom (ACC) e com uso do ultrassom (ACCU), não houve uma padronização nos resultados, com o aumento da concentração de nanocristais. Entretanto observa-se valores acima de 1,5 GPa para ambos os filmes (ACC e ACCU) sendo observados os melhores resultados de módulo elasticidade (Y) para os filmes com concentrações de 2,5 e 7,5% de NCCB com valores equivalentes a 2GPa corroborado pelo maior grau de cristalinidade encontrados nos mesmos filmes e mencionados na seção 5.3.1. O uso do ultrassom aumentou a resistência e a rigidez do material, atribuído à melhor dispersão dos nanocristais, entretanto não foi observado um ganho significativo referente à variação da concentração dos nanocristais como observa-se em outros trabalhos que usam nanopartículas como reforço. A avaliação do efeito dos nanocristais de amido nas propriedades físico-químicas de filmes biocompósitos de amido mostrou um aumento de resistência à tração de 2,08 MPa para 6,7MPa em filmes com 0 e 10 % de nanocristais, respectivamente (MUKURUMBIRA; MELLEEM; AMONSOU, 2017). Melhores propriedades mecânicas foram obtidas em filmes de gelatina com diferentes concentrações de nanocristais após o uso do ultrassom na suspensão filmogênica (SANTOS et al., 2014). Além disso, os valores de módulo de elasticidade (Y) obtidos neste trabalho para ambos os filmes são superiores à valores obtidos em filmes derivados da indústria petroquímica como por exemplo o polietileno de baixa densidade que varia de 102 a 240 MPa (COUTINHO; MELLO; SANTA MARIA, 2003)

Tabela 4 - Propriedades de *all cellulose composite* sem sonicação (ACC 0%, ACC 2,5%, ACC 5%, ACC 7,5%) e com sonicação (ACCU 0%, ACCU 2,5%, ACCU 5%, ACCU 7,5%). σ (resistência à tração), ϵ (alongação a ruptura), Y (módulo de elasticidade).

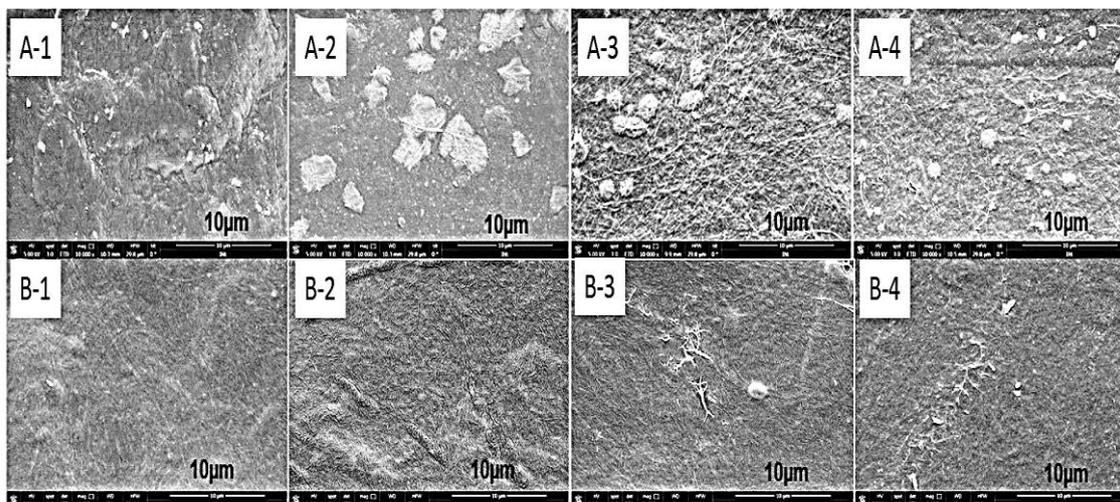
	Espessuras (mm)	σ (Mpa)	ϵ (%)	Y(GPa)
ACC 0%	0,11 ± 0,01 ^a	53 ± 3,4 ^b	5,7 ± 0,5 ^a	1,6 ± 77 ^b
ACC 2,5%	0,11 ± 0,02 ^a	38 ± 6,7 ^c	3,3 ± 0,4 ^c	1,2 ± 80 ^b
ACC 5%	0,15 ± 0,01 ^b	38 ± 6,1 ^c	3,5 ± 0,5 ^c	1,1 ± 130 ^b
ACC 7,5%	0,11 ± 0,02 ^a	64 ± 1,8 ^a	4,5 ± 0,3 ^b	1,7 ± 167 ^b
<hr/>				
ACCU 0%	0,12 ± 0,05 ^a	50 ± 2,0 ^b	4,9 ± 0,47 ^a	1,6 ± 172 ^b
ACCU 2,5%	0,11 ± 0,04 ^a	61 ± 5,0 ^a	4,2 ± 0,44 ^b	1,9 ± 142 ^a
ACCU 5%	0,12 ± 0,01 ^{ab}	52 ± 2,9 ^b	3,6 ± 0,33 ^b	1,6 ± 166 ^b
ACCU 7,5%	0,13 ± 0,01 ^b	65 ± 5,4 ^a	4,1 ± 0,45 ^b	2,0 ± 130 ^a

Letras diferentes na mesma coluna correspondem a amostra estatisticamente diferentes ao nível de confiança de 95%.

5.4.5. Microscopia Eletrônica de Varredura – MEV

A Figura 20 mostra as imagens de MEV dos filmes *all cellulose composite* sem uso do ultrassom (ACC) e com uso do ultrassom (ACCU), com as diferentes variações de concentração de nanocristais de celulose (0 a 7,5%). Nas imagens de 20A2 a 20A4, que correspondem aos filmes ACC 2,5% a ACC 7,5%, respectivamente, observa-se pequenas partículas aglomeradas que remete aos nanocristais mal dispersos na suspensão filmogênica antes da secagem. As imagens 20B2 a 20B4 que correspondem aos filmes ACCU 2,5% a ACCU 7,5%, respectivamente, não foram observados os aglomerados provavelmente por que a técnica de MEV possui algumas limitações como, aumento e profundidade, não sendo possível observar os nanocristais dispersos na superfície dos filmes. Entretanto essa limitação não impediu de concluir que os NCCB foram bem dispersos por não estarem evidenciados aglomerados na superfície analisada, confirmando a necessidade do uso do ultrassom. Além disso, as imagens em B mostram uma estrutura densa e homogênea, indicando uma boa relação de adesão entre matriz e carga.

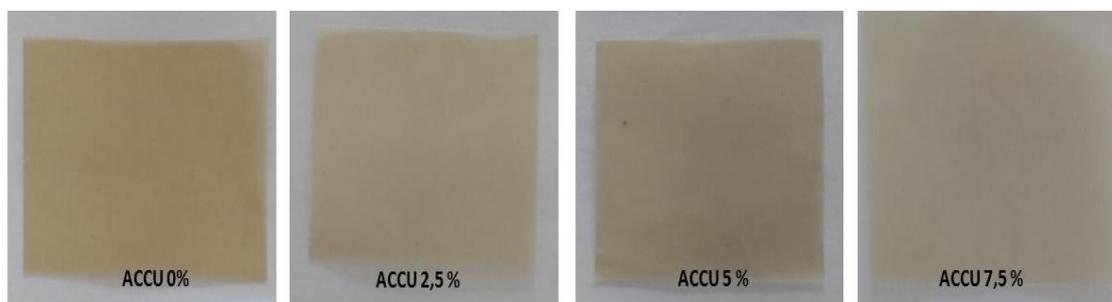
Figura 21 - Imagens de microscopia eletrônica de varredura dos filmes *all cellulose composite*. A1 - ACC 0%, A2 – ACC 2,5%, A3 – ACC 5%, A4 – ACC 7,5% e B1 – ACCU 0%, B2 – ACCU 2,5%, B3 – ACCU 5%, B4 – ACCU 7,5%. Todas a imagens possuem ampliação de 10000x.



Fonte: Próprio autor

A partir dos resultados obtidos na etapa 2: Obtenção, caracterização e estudo do uso do ultrassom na obtenção dos filmes *all cellulose composite*, decidiu-se realizar as demais caracterizações dos filmes ultrassonicados (ACCU), representados na figura 22.

Figura 22 - Filmes ACCU com 0, 2,5, 5 e 7,5 % de nanocristais de CB.



5.5. Caracterização dos Filmes *all cellulose composite* ultrassonicados

5.5.1. Permeabilidade ao vapor de água (P_{VA})

A Tabela 5 mostra os resultados de permeabilidade ao vapor de água. Nos filmes ACCU a P_{VA} variou de 2,2 (ACCU 5%) a 3,5 $\text{g}\cdot\text{mm}\cdot\text{kPa}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ (ACCU 2,5%). A permeabilidade no filme com 5% de NCCB foi 37% menor do que o maior valor de P_{VA} obtido no ACCU 2,5%, no entanto, este valor, foi

apenas 27% menor do que no filme sem adição de nanocristais (ACCU 0%). A permeabilidade ao vapor de água de qualquer material de embalagem de alimentos deve ser tão baixa quanto possível para minimizar a transferência de umidade dos arredores para o alimento (MUKURUMBIRA; MELLEEM; AMONSOU, 2017). Embora tenha havido uma diminuição significativa da P_{VA} no filme 5% comparado ao ACCU 0%, neste estudo, o efeito da adição dos nanocristais mostrou-se inconsistente frente ao esperado, quando comparado à outros estudos feitos com diferentes matrizes. Mukurumbira e colaboradores (2017) avaliando o efeito dos nanocristais (0 a 10%) em matriz de amido de tubérculos (batata e amadumbe) encontrou reduções de 22% ($P_{VA} = 1,8 \text{ g.mm.kPa}^{-1}.\text{h}^{-1}.\text{m}^{-2}$) e 17 % ($1,5 \text{ g.mm.kPa}^{-1}.\text{h}^{-1}.\text{m}^{-2}$), em filmes contendo 10% de nanocristais, quando comparado ao filme de amido puro. Santos *et al.* (2014), em filmes contendo 15% de nanocristais de celulose em matriz de gelatina, obteve uma redução de 30% ($1,8 \text{ g.mm.kPa}^{-1}.\text{h}^{-1}.\text{m}^{-2}$) no valor de P_{VA} , em relação aos resultados dos filmes sem nanocristais. Nota-se que, a depender da matriz utilizada, a adição de nanocristais causará um maior ou menor efeito. Na literatura, matrizes conhecidas por sua alta P_{VA} , como a de amidos e gelatina, os nanocristais causam um efeito linear à medida que são adicionados, entretanto, nos filmes ACCU, isso não aconteceu. A hipótese é que, neste estudo, a matriz de celulose bacteriana oxidada a TEMPO nanofibrilada seja melhor sozinha do que com adição de nanocristais quando comparada as outras matrizes, não justificando a agregação de mais uma etapa na confecção dos filmes. As propriedades hidrofílicas, bem como a quantidade de plastificante, tal como glicerol, são também responsáveis pela elevada permeabilidade em filmes devido à sua afinidade pela água, facilitando a solubilização e permeação do filme (GHADERI *et al.*, 2014a; PINHEIRO *et al.*, 2010).

Tabela 5 - Permeabilidade ao vapor de água (P_{VA}), Percentual de matéria insolúvel (MI), ângulo de contato (AC) e opacidade (Y) em filmes ACCU 0%, ACCU 2,5%, ACCU 5%, ACCU 7,5%.

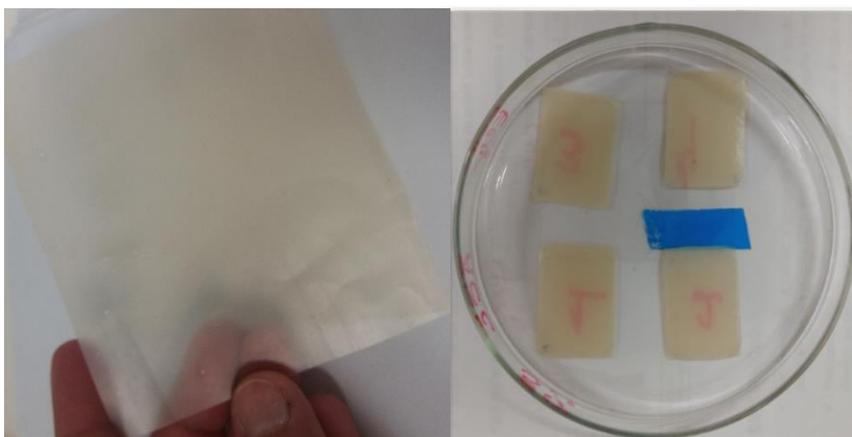
	P_{VA} (g.mm.kPa ⁻¹ .h ⁻¹ .m ⁻²)	MI (%)	AC (°) /t=0s	Y (%)
ACCU 0%	3,0 ± 0,5 ^{ab}	93 ± 0,6 ^a	85 ± 2,9 ^a	16,7 ± 4,4 ^c
ACCU 2,5%	3,5 ± 0,2 ^b	90 ± 0,6 ^{bc}	75 ± 1,7 ^b	17,6 ± 0,5 ^a
ACCU 5%	2,2 ± 0,3 ^c	91 ± 1,3 ^b	85 ± 5,0 ^a	18,2 ± 0,6 ^{ab}
ACCU 7,5%	2,7 ± 0,4 ^a	88 ± 1,1 ^c	88 ± 1,6 ^a	18,8 ± 0,9 ^b

Letras diferentes na mesma coluna correspondem a amostras estatisticamente diferentes a nível de correspondem a amostras estatisticamente diferentes a nível de confiança de 95%.

5.5.2. Solubilidade em água

A Tabela 5 mostra valores de matéria insolúvel (% MI) obtidos para os filmes ACCU, variando de 88 a 93%. O menor percentual de matéria insolúvel foi obtido no filme com 7,5 % de NCCB (MI = 88%), no entanto esse valor foi apenas 5% menor do que o encontrado para o filme sem adição de nanocristais (ACCU 0% - MI = 93%), indicando que a adição de nanocristais de CB também não ocasionou o efeito esperado, denotando que, por si só, a matriz de CB nanofibrilada possui uma alta solubilidade, dispensando a adição dos nanocristais ao processo. A solubilidade é uma importante propriedade em filmes, pois fornece informações sobre sua integridade quando expostos a sistemas aquosos, indicando sua resistência à água (PINHEIRO et al., 2010). Filmes com baixa solubilidade (maiores percentuais de matéria insolúvel) são interessantes quando o objetivo é a preservação de alimentos com grandes quantidades de água ou a liberação de antimicrobianos (OZDEMIR; FLOROS, 2008). Os valores de matéria insolúvel encontrados neste estudo são bastante superiores quando comparados a filmes compostos por outras matrizes como a gelatina (MI= 58% a 25°C), galactomanana (MI = 26%) conhecidos por possuírem alta solubilidade (NISHIHORA, 2015; ZAFAR et al., 2016). Vale ressaltar que a estrutura dos filmes ACCU permaneceu intacta após 24 h imersos em água e sob agitação. A Figura 23 mostra o filme ACCU íntegro em A e em B, amostras do mesmo filme durante a análise de solubilidade. Nota-se que, após a imersão dos filmes ACCU em água eles praticamente não se dissolvem, permanecendo íntegros.

Figura 23 - Filmes ACCU antes da análise de solubilidade (A) e depois de 24 horas, sob agitação e imersos em água (B)



Fonte: próprio autor

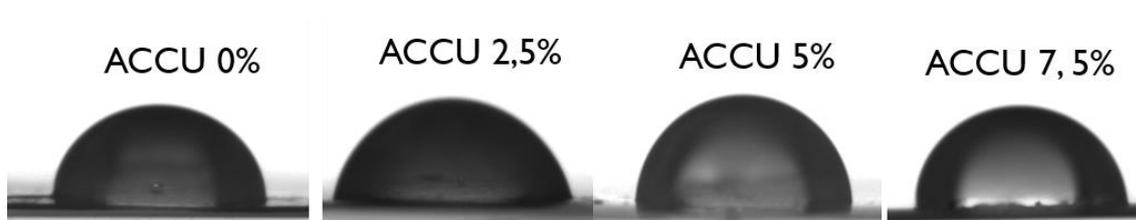
5.5.3. Ângulo de Contato (AC) e Opacidade

A Tabela 5 mostra valores de ângulos de contato nos filmes *all cellulose composite* variando de 75 a 88°. Nota-se que, apesar da redução do ângulo de 85° em ACCU 0%, para 75° em ACCU 7,5%, não observa-se um efeito homogêneo e linear na suspensão filmogênica após a dição dos nanocristais. A medida do ângulo de contato de uma gota depositada sobre a superfície de um filme auxilia a determinar diretamente a hidrofobicidade ou hidrofiliabilidade deste filme, em outras palavras, a afinidade dos filmes com a água, devido sua relação direta com a tensão superficial entre o líquido e a superfície sólida (BRACCO; HOLST, 2013). Todos os valores de AC (Figura 24) nos filmes ACCU indicam que a superfície dos filmes possui uma tendência a ser hidrofóbica, pois, em todas, o ângulo de contato foi superior a 65° (Su et al. 2010).

A opacidade é um indicador da quantidade de luz que atravessa o filme, podendo ser de grande importância para controlar a incidência de luz em alimentos com alto teor lipídico e que sofrem com o processo de foto-oxidação, como produtos que passarão por processos de maturação, cura ou exposição demorada. Quanto maior a opacidade, menor será a quantidade de luz que atravessa o filme (PINHEIRO et al., 2010). Entretanto, em outros casos, a opacidade é indesejada, como em alimentos em que são necessários uma transparência da embalagem. Na tabela 6 observa-se que todos os filmes foram ligeiramente opacos, e que à medida que a concentração de NCCB aumenta, os

valores de opacidade sofrem um pequeno aumento. Os resultados apresentados indicam que a adição dos NCCB's deixa os filmes mais opacos.

Figura 24 - Representação das medidas de ângulo de contato em filmes all cellulose composite ultrassonicados ACCU 0%, ACCU 2,5%, ACCU 5%, ACCU 7,5% no momento em que a gota toca a superfície do filmes



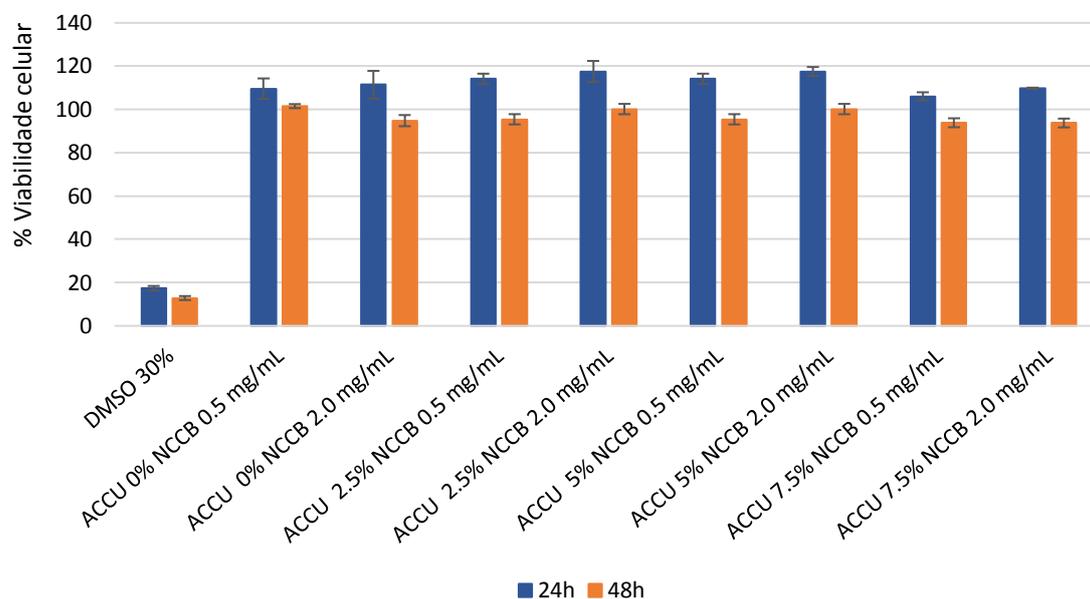
Fonte: Próprio autor

5.6. Avaliação da Citotoxicidade

5.6.1. Viabilidade celular através do ensaio de resazurina

A viabilidade das culturas celulares é rotineiramente avaliada pela utilização da capacidade metabólica (potencial redutor) das células. As células convertem bioquimicamente produtos químicos (normalmente corantes coloridos) que podem então ser convenientemente medidos em comprimentos de onda específicos usando um leitor multiplacas. O reagente Presto Blue é uma solução à base de resazurina, um exemplo de um desses compostos metabolicamente não tóxicos e permeáveis às células. Após a difusão em células vivas, a resazurina (azul e não fluorescente) é convertida em resorzufin (rosa e altamente fluorescente) através de reações de redução por enzimas mitocondriais, citosólicas nas células metabolicamente ativas. Portanto, a fluorescência resultante é proporcional ao número de células viáveis por poço.

Figura 25 - Porcentagem de viabilidade celular em relação às células (Caco-2) cultivadas em meio de cultura avaliado através do teste de Presto Blue após 24h e 48 h de incubação com filmes de celulose com sonicação em diferentes concentrações (0,5mg/mL e 2,0 mg/mL). O DMSO (30%) foi usado como controle positivo.



Fonte: Próprio autor

Conforme mostrado na Figura 25, a atividade das células metabólicas não foi, em geral, afetada pelas nanofibras nem pela concentração de nanocristais, caso contrário, as células perderiam sua viabilidade como ocorreu quando incubadas com DMSO (controle positivo), conforme esperado. Em todas as condições testadas, a quantidade de resazurina reduzida é semelhante à quantidade de resazurina reduzida no controle (células cultivadas no meio de cultura), que significa um percentual de viabilidade celular em torno de 100%. Isto é considerado como uma clara indicação de que nanofibras e nanocristal contidos nos filmes não são tóxicos no intervalo de concentração testado.

Estudo realizado por Machado (2016) avaliou a citotoxicidade de nanocristais de celulose de diferentes fontes (eucalipto, milho e côco) em embalagens para alimentos e não observou nenhum efeito tóxico, em concentrações que variaram de 33 a 333 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, após 24 h de contato com as células Caco-2 (MACHADO, 2016). Embora em estágio inicial, estudos toxicológicos de materiais celulósicos, relatam que concentrações de nanocristais de celulose entre 0,02 a 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ não causaram citotoxicidade,

entretanto concentrações acima de 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ induziram a morte celular em fibroblastos (DONG et al., 2012; JORFI; FOSTER, 2015; PEREIRA et al., 2013).

6 CONCLUSÕES

Baseados nos resultados obtidos, conclui-se que é possível obter, a partir da combinação de homogeneizador de alta rotação e oxidação TEMPO, celulose nanofibrilada com alto rendimento e com características excepcionais como alta cristalinidade e estabilidade. Especialmente interessante foi o alto potencial zeta da CBOXNFL que demonstrou que a estabilidade da dispersão, alcançada pelo processo de oxidação-nanofibrilação, não diminuiu após a liofilização, o que torna o material obtido muito versátil.

A obtenção de nanofibras e nanocristais de CB permitiu a confecção de filmes *all cellulose* com alta cristalinidade, boa estabilidade térmica, resistentes, rígidos e com pouca deformação. Foi necessário o uso do ultrassom para uma melhor dispersão dos nanocristais. Foram obtidos filmes opacos e de aparência amarelada, o que pode ser uma característica desejável a depender da aplicação. Além disso os filmes foram resistentes à água, apresentando um percentual de matéria insolúvel em torno de 90%, denotando um excelente valor quando comparado a outros biopolímeros e não apresentaram toxicidade para as células Caco-2, nas concentrações estudadas. Viu-se, também, que celulose bacteriana oxidada e nanofibrilada (CBOXNF) pode ser utilizada para produção de filmes com características excepcionais sem adição de nanocristais de celulose ou nenhum tipo de nanoreforço.

Com isso, conclui-se que a matriz oxidada e nanofibrilada obtida a partir da CB é um material potencialmente capaz de ser inserido na produção de nanocompósitos para aplicação de embalagens de alimentos, sem a necessidade de adicionar nenhum outro processo e/ou componente (nanopartículas) para a obtenção dos filmes, tornando-a um material ainda mais atrativo e promissor devido a possível redução de custo do processo de fabricação.

REFERÊNCIAS

ABDUL KHALIL, H. P. S. et al. **Production and modification of nanofibrillated cellulose using various mechanical processes: A review** *Carbohydrate Polymers* Elsevier, V. 99, n. 6, p. 649 - 655, 2 jan. 2014.

ABE, K.; YANO, H. Comparison of the characteristics of cellulose microfibril aggregates of wood, rice straw and potato tuber. *Cellulose*, v. 16, n. 6, p. 1017–1023, 23 dez. 2009.

AIDER, M. Chitosan application for active bio-based films production and potential in the food industry: Review. *LWT - Food Science and Technology*, v. 43, n. 6, p. 837–842, 1 jul. 2010.

ALEMDAR, A.; SAIN, M. Isolation and characterization of nanofibers from agricultural residues – Wheat straw and soy hulls. *Bioresource Technology*, v. 99, n. 6, p. 1664–1671, 2008.

ANDRADE, F. K. et al. Bacterial Cellulose: Properties , Production and Applications. In: LEJEUNE, A. T. D. (Ed.). . **Cellulose: Structure and Properties**. [s.l: s.n.]. p. 427–458.

ANSAR AHMED, S.; GOGAL, R. M.; WALSH, J. E. A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: an alternative to [3H]thymidine incorporation assay. *Journal of Immunological Methods*, v. 170, n. 2, p. 211–224, 15 abr. 1994.

AZEREDO, H. M. C.; ROSA, M. F.; MATTOSO, L. H. C. Nanocellulose in bio-based food packaging applications. *Industrial Crops and Products*, v. 97, p. 664–671, 1 mar. 2017.

BÄCKSTRÖM, M.; BOLIVAR, S.; PALTAKARI, J. Effect of ionic form on fibrillation and the development of the fibre network strength during the refining of the kraft pulps. *O Papel*, v. 73, n. 7, p. 57–65, 2012.

BAE, S.; SHODA, M. Bacterial cellulose production by fed-batch fermentation in molasses medium. *Biotechnology progress*, v. 20, n. 5, p. 1366–1371, 2004.

BALLESTEROS, L. F. et al. Production and physicochemical properties of carboxymethyl cellulose films enriched with spent coffee grounds polysaccharides. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 106, p. 647–655, jan. 2017.

BARÃO, M. Z. **Dossiê Técnico: Embalagens para produtos alimentícios**. Instituto de Tecnologia do Paraná, p. 1–31, 2011.

BECK, S.; BOUCHARD, J.; BERRY, R. Dispersibility in Water of Dried Nanocrystalline Cellulose. **Biomacromolecules**, v. 13, n. 5, p. 1486–1494, 14 maio 2012.

BENDAHO, A.; KADDAMI, H.; DUFRESNE, A. Investigation on the effect of cellulosic nanoparticles' morphology on the properties of natural rubber based nanocomposites. **European Polymer Journal**, v. 46, n. 4, p. 609–620, 2010.

BENHAMOU, K. et al. Control of size and viscoelastic properties of nanofibrillated cellulose from palm tree by varying the TEMPO-mediated oxidation time. **Carbohydrate Polymers**, v. 99, p. 74–83, 2014.

BESBES, I.; ALILA, S.; BOUFI, S. Nanofibrillated cellulose from TEMPO-oxidized eucalyptus fibres: Effect of the carboxyl content. **Carbohydrate Polymers**, v. 84, n. 3, p. 975–983, 2011.

BOLDRIN, L. F. **Biossíntese , Aplicabilidade e Recentes Avanços no Estudo da Celulose Bacteriana**. [s.l: s.n.].

BRACCO, G.; HOLST, B. **Surface science techniques**. [s.l: s.n.]. v. 51

BROWN, A. J. On an acetic ferment which forms cellulose. **Journal of the Chemical Society, Transactions**, v. 49, n. 432, p. 432, 1886.

BUDHIONO, A. et al. Kinetic aspects of bacterial cellulose formation in nata-de-coco culture system. **Carbohydrate Polymers**, v. 40, n. 2, p. 137–143, 1999.

CACICEDO, M. L. et al. Self-assembly of carrageenin–CaCO₃ hybrid microparticles on bacterial cellulose films for doxorubicin sustained delivery. **Journal of Applied Biomedicine**, v. 13, n. 3, p. 239–248, abr. 2015.

CACICEDO, M. L. et al. Progress in bacterial cellulose matrices for biotechnological applications. **Bioresource Technology**, fev. 2016.

CAMPANO, C. et al. **Enhancement of the fermentation process and properties of bacterial cellulose: a review** *Cellulose* Springer Netherlands, , 18 fev. 2016.

CAO, Y. et al. The relationship between cellulose nanocrystal dispersion and strength. **Construction and Building Materials**, v. 119, p. 71–79, 30 ago. 2016.

CARREIRA, P. M. D. C. **Produção de celulose bacteriana a partir de resíduos industriais**. [s.l.] Universidade de Aveiro, 2010.

CAZÓN, P. et al. Polysaccharide-based films and coatings for food packaging: A review. **Food Hydrocolloids**, v. 68, p. 136–148, 1 jul. 2017.

CHAWLA, P. R. et al. Microbial Cellulose: Fermentative Production and Applications. **Food Technol. Biotechnol.**, v. 47, n. 2, p. 107–124, 9 jun. 2009.

CHEN, L. et al. Biotransformation of wheat straw to bacterial cellulose and its mechanism. **Bioresource technology**, v. 135, p. 464–8, maio 2013.

CHEN, W.; YU, H.; LIU, Y. Preparation of millimeter-long cellulose i nanofibers with diameters of 30-80 nm from bamboo fibers. **Carbohydrate Polymers**, v. 86, n. 2, p. 453–461, 2011.

CHEN, Y. et al. TEMPO-oxidized bacterial cellulose nanofibers-supported gold nanoparticles with superior catalytic properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 160, p. 34–42, 2017.

CORRÊA, A. C. et al. Cellulose nanofibers from curaua fibers. **Cellulose**, v. 17, n. 6, p. 1183–1192, 22 dez. 2010.

COUTINHO, F. M. B.; MELLO, I. L.; SANTA MARIA, L. C. DE. Polietileno: principais tipos, propriedades e aplicações. **Polímeros**, v. 13, n. 1, p. 01-13, 2003.

SILVA PEREZ, D.; MONTANARI, S.; VIGNON, M. R. TEMPO-mediated

oxidation of cellulose III. **Biomacromolecules**, v. 4, n. 5, p. 1417–1425, 2003.

DAMASIO, R. A. P. **CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÕES DE CELULOSES NANOFIBRILADA (CNF) E NANOCRISTALINA (CNC)**. [s.l.] Universidade Federal de Viçosa, 2015.

DAVIS, N. J.; FLITSCH, S. L. Selective oxidation of monosaccharide derivatives to uronic acids. **Tetrahedron Letters**, v. 34, n. 7, p. 1181–1184, 12 fev. 1993.

DE BRITTO, D.; ASSIS, O. B. G. Thermal degradation of carboxymethylcellulose in different salty forms. **Thermochemica Acta**, v. 494, n. 1–2, p. 115–122, out. 2009.

DE JESUS SILVA, D.; D'ALMEIDA, M. L. O. Nanocristais de celulose. **O Papel (Brazil)**, v. 70, n. 7, p. 34–52, 2009.

DE PAOLI, M. A. **Degradação e estabilização de polímeros**. [s.l.] Artliber, 2009.

DONG, S. et al. CYTOTOXICITY AND CELLULAR UPTAKE OF CELLULOSE NANOCRYSTALS. **Nano LIFE**, v. 02, n. 03, p. 1241006, 8 set. 2012.

DONINI, Í. A. N. et al. ECLÉTICA. v. 35, p. 165–178, 2010.

DUCHEMIN, B. J. C.; NEWMAN, R. H.; STAIGER, M. P. Structure-property relationship of all-cellulose composites. **Composites Science and Technology**, v. 69, n. 7–8, p. 1225–1230, 1 jun. 2009.

DUFRESNE, A. **Nanocellulose: From Nature to High Performance Tailored Materials**. [s.l.: s.n.].

DURÁN, N. et al. A MINIREVIEW OF CELLULOSE NANOCRYSTALS AND ITS POTENTIAL INTEGRATION AS CO-PRODUCT IN BIOETHANOL PRODUCTION. **Journal of the Chilean Chemical Society**, v. 56, n. 2, p. 672–677, 2011.

ESA, F.; TASIRIN, S. M.; RAHMAN, N. A. Overview of Bacterial Cellulose Production and Application. **Agriculture and Agricultural Science Procedia**, v.

2, p. 113–119, 2014.

ESPITIA, P. J. P. et al. Edible films from pectin: Physical-mechanical and antimicrobial properties - A review. **Food Hydrocolloids**, v. 35, p. 287–296, mar. 2014.

ESTEVEES, A. C. C.; BARROS-TIMMONS, A.; TRINDADE, T. **Nanocompósitos de matriz polimérica: Estratégias de síntese de materiais híbridos** *Química Nova* SBQ, , out. 2004.

EYHOLZER, C. et al. Preparation and characterization of water-redispersible nanofibrillated cellulose in powder form. **Cellulose**, v. 17, n. 1, p. 19–30, 20 fev. 2010.

FARUK, O. et al. Biocomposites reinforced with natural fibers: 2000–2010. **Progress in Polymer Science**, v. 37, n. 11, p. 1552–1596, 1 nov. 2012.

FENG, J. et al. Antimicrobial activity of silver nanoparticles in situ growth on TEMPO-mediated oxidized bacterial cellulose. **Cellulose**, v. 21, n. 6, p. 4557–4567, 27 dez. 2014.

FENG, Y. et al. A mechanically strong, flexible and conductive film based on bacterial cellulose/graphene nanocomposite. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, n. 1, p. 644–649, jan. 2012.

FERNANDES, S. C. M. et al. Novel transparent nanocomposite films based on chitosan and bacterial cellulose. **Green Chemistry**, v. 11, n. 12, p. 2023, 2009.

FUJISAWA, S. et al. Superior reinforcement effect of TEMPO-oxidized cellulose nanofibrils in polystyrene matrix: optical, thermal, and mechanical studies. **Biomacromolecules**, v. 13, n. 7, p. 2188–2194, 9 jul. 2012.

FUKUZUMI, H. et al. Transparent and high gas barrier films of cellulose nanofibers prepared by TEMPO-mediated oxidation. **Biomacromolecules**, v. 10, n. 1, p. 162–165, 2009.

FUKUZUMI, H. et al. Thermal stabilization of TEMPO-oxidized cellulose. **Polymer Degradation and Stability**, v. 95, n. 9, p. 1502–1508, 2010.

FUNCHAL, M. Panorama Mundial do Setor de Celulose, Papel e Papelão. 2014.

GALLEGOS, A. M. A. et al. Bacterial cellulose: A sustainable source to develop value-added products - A review. **BioResources**, v. 11, n. 2, p. 5641–5655, 12 abr. 2016.

GAMA, M.; GATENHOLM, P.; KLEMM, D. (DIETER). **Bacterial nanocellulose: a sophisticated multifunctional material**. [s.l.] CRC Press, 2013.

GEA, S. et al. Investigation into the structural, morphological, mechanical and thermal behaviour of bacterial cellulose after a two-step purification process. **Bioresour. Technol.**, v. 102, n. 19, p. 9105–9110, 2011.

GEORGE, J.; SABAPATHI, S. N. Cellulose nanocrystals: Synthesis, functional properties, and applications. **Nanotechnology, Science and Applications**, v. 8, p. 45–54, 2015.

GHADERI, M. et al. All-cellulose nanocomposite film made from bagasse cellulose nanofibers for food packaging application. **Carbohydrate Polymers**, v. 104, n. 1, p. 59–65, 15 abr. 2014a.

GHADERI, M. et al. All-cellulose nanocomposite film made from bagasse cellulose nanofibers for food packaging application. **Carbohydrate Polymers**, v. 104, n. 1, p. 59–65, 15 abr. 2014b.

GINDL, W.; KECKES, J. All-cellulose nanocomposite. **Polymer**, v. 46, n. 23, p. 10221–10225, 2005.

HABIBI, Y.; CHANZY, H.; VIGNON, M. R. TEMPO-mediated surface oxidation of cellulose whiskers. **Cellulose**, v. 13, n. 6, p. 679–687, 2006.

HABIBI, Y.; VIGNON, M. R. Optimization of cellouronic acid synthesis by TEMPO-mediated oxidation of cellulose III from sugar beet pulp. **Cellulose**, v. 15, n. 1, p. 177–185, 5 fev. 2008.

HALONEN, H. **Structural changes during cellulose composite processing**. [s.l: s.n.].

HENRIQUE, M. A. et al. Kinetic study of the thermal decomposition of cellulose nanocrystals with different polymorphs, cellulose I and II, extracted from different sources and using different types of acids. **Industrial Crops and Products**, v. 76, p. 128–140, 15 dez. 2015.

HERRICK, F. W. et al. Microfibrillated Cellulose: Morphology and Accessibility. **Journal of Applied Polymer Science: Applied Polymer Symposium**, v. 37, p. 797–813, 1 jan. 1983.

HONG, L. et al. Hydroxyapatite/bacterial cellulose composites synthesized via a biomimetic route. **Materials Letters**, v. 60, n. 13–14, p. 1710–1713, 1 jun. 2006.

HU, W. et al. Functionalized bacterial cellulose derivatives and nanocomposites. **Carbohydrate Polymers**, v. 101, n. 1, p. 1043–1060, 2014.

HUBER, T. et al. A critical review of all-cellulose composites. **Journal of Materials Science**, v. 47, n. 3, p. 1171–1186, 21 fev. 2012.

HUBER, T.; PANG, S.; STAIGER, M. P. All-cellulose composite laminates. **Composites Part A: Applied Science and Manufacturing**, v. 43, n. 10, p. 1738–1745, 2012.

ISO. Quantitative, Water quality -- Determination of turbidity -- Part 1: In: **(International Organisation for Standardization)**. [s.l: s.n.]. p. 9.

ISOGAI, A. et al. TEMPO-oxidized cellulose nanofibers. **Nanoscale**, v. 3, n. 1, p. 71–85, 2011.

ISOGAI, A.; KATO, Y. Preparation of Polyuronic Acid from Cellulose by TEMPO-mediated Oxidation. **Cellulose**, v. 5, n. 3, p. 153–164, 1998.

ISOGAI, A.; SAITO, T.; FUKUZUMI, H. TEMPO-oxidized cellulose nanofibers. **Nanoscale**, v. 3, n. 1, p. 71–85, 2011.

JIA, Y. et al. Surfactant-free emulsions stabilized by tempo-oxidized bacterial cellulose. **Carbohydrate Polymers**, v. 151, p. 907–915, 20 out. 2016.

JIANG, F.; HSIEH, Y. LO. Chemically and mechanically isolated nanocellulose

and their self-assembled structures. **Carbohydrate Polymers**, v. 95, n. 1, p. 32–40, 2013.

JOHN, M. J.; THOMAS, S. Biofibres and biocomposites. **Carbohydrate Polymers**, v. 71, n. 3, p. 343–364, 8 fev. 2008.

JORFI, M.; FOSTER, E. J. Recent advances in nanocellulose for biomedical applications. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 132, n. 14, p. n/a-n/a, 10 abr. 2015.

KESHK, S. M. Bacterial Cellulose Production and its Industrial Applications. **Journal of Bioprocessing & Biotechniques**, v. 04, n. 02, p. 1–10, 2014.

KESHK, S. M. A. S.; SAMESHIMA, K. Evaluation of different carbon sources for bacterial cellulose production. **African J. Biotechnol.**, v. 4, n. 6, p. 478–482, 2005.

KINGKAEW, J. et al. Effect of molecular weight of chitosan on antimicrobial properties and tissue compatibility of chitosan-impregnated bacterial cellulose films. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 19, n. 3, p. 534–544, 19 jun. 2014.

KLEMM, D. et al. Cellulose: Fascinating biopolymer and sustainable raw material. **Angew. Chemie**, v. 44, n. 22, p. 3358–3393, 2005.

KUMBHAR, J. V.; RAJWADE, J. M.; PAKNIKAR, K. M. Fruit peels support higher yield and superior quality bacterial cellulose production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, n. 16, p. 6677–6691, 9 ago. 2015.

LAI, C. et al. Nanocomposite films based on TEMPO-mediated oxidized bacterial cellulose and chitosan. **Cellulose**, v. 21, n. 4, p. 2757–2772, 2014.

LAVOINE, N. et al. **Microfibrillated cellulose - Its barrier properties and applications in cellulosic materials: A review** **Carbohydrate Polymers** Elsevier, , 1 out. 2012.

LAWLER, D. M. SPECTROPHOTOMETRY | Turbidimetry and Nephelometry. In: **Encyclopedia of Analytical Science**. [s.l.] Elsevier, 2005. p. 343–351.

LIN, D. et al. Physical properties of bacterial cellulose aqueous suspensions treated by high pressure homogenizer. **Food Hydrocolloids**, v. 44, p. 435–442, 2015.

LUO, H. et al. Characterization of TEMPO-oxidized bacterial cellulose scaffolds for tissue engineering applications. **Materials Chemistry and Physics**, v. 143, n. 1, p. 373–379, 2013.

MACHADO, P. I. A. P. **BIOENSAIOS PARA AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DE EMBALAGENS ALIMENTÍCIAS E COMPONENTES UTILIZADOS EM SUA PRODUÇÃO**. [s.l.] Universidade Federal da Bahia, 2016.

MAIA, T. H. S. et al. Polyethylene cellulose nanofibrils nanocomposites. **Carbohydrate Polymers**, v. 173, p. 50–56, 1 out. 2017.

MARKARIAN, J. Biopolymers present new market opportunities for additives in packaging. **Plastics, Additives and Compounding**, v. 10, n. 3, p. 22–25, 1 maio 2008.

MARTÍNEZ-SANZ, M.; LOPEZ-RUBIO, A.; LAGARON, J. M. Optimization of the nanofabrication by acid hydrolysis of bacterial cellulose nanowhiskers. **Carbohydrate Polymers**, v. 85, n. 1, p. 228–236, 22 abr. 2011.

MEHL, H. “ **Nanocompósitos Formados por Nanotubos de Carbono , Nanopartículas de Prata e Polianilina : Síntese e Caracterização .**” [s.l: s.n.].

MESQUITA, J. P. Nanocristais de Celulose para Preparação de Bionanocompósitos com Quitosana e Carbonos Nanoestruturados para Aplicações Tecnológicas e Ambientais. **Universidade Federal de Minas Gerais.**, p. 189, 2012.

MIRHOSSEINI, H. et al. Effect of Arabic gum, xanthan gum and orange oil contents on ζ -potential, conductivity, stability, size index and pH of orange beverage emulsion. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 315, n. 1, p. 47–56, 2008.

MISSOUM, K.; BELGACEM, M. N.; BRAS, J. Nanofibrillated cellulose surface

modification: A review. **Materials**, v. 6, n. 5, p. 1745–1766, 3 maio 2013.

MONDAL, S. **Preparation, properties and applications of nanocellulosic materials***Carbohydrate Polymers*Elsevier, , 1 maio 2017.

MOON, R. J. et al. Cellulose nanomaterials review: structure, properties and nanocomposites. **Chemical Society Reviews**, v. 40, n. 7, p. 3941, 20 jun. 2011.

MUKURUMBIRA, A. R.; MELLEM, J. J.; AMONSOU, E. O. Effects of amadumbe starch nanocrystals on the physicochemical properties of starch biocomposite films. **Carbohydrate Polymers**, v. 165, p. 142–148, 1 jun. 2017.

NECHYPORCHUK, O.; BELGACEM, M. N.; BRAS, J. **Production of cellulose nanofibrils: A review of recent advances***Industrial Crops and Products*Elsevier, , 25 dez. 2016.

NGE, T. T. et al. Microstructure and mechanical properties of bacterial cellulose/chitosan porous scaffold. **Cellulose**, v. 17, n. 2, p. 349–363, 19 abr. 2010.

NISHIHORA, R. K. **PROPRIEDADES DE FILMES DE GELATINA RETICULADOS** Florianópolis. [s.l.] Universidade Federal de Santa Catarina, 2015.

NISHINO, T.; MATSUDA, I.; HIRAO, K. All-cellulose composite. **Macromolecules**, v. 37, n. 20, p. 7683–7687, out. 2004.

NOGI, M. et al. Optically Transparent Nanofiber Paper. **Advanced Materials**, v. 21, n. 16, p. 1595–1598, 27 abr. 2009.

NUNES, T. F. G. **Produção , Caracterização e Aplicação de Nanofibras de Celulose**. [s.l.] Universidade de Coimbra, 2014.

OKSMAN, K. et al. **Review of the recent developments in cellulose nanocomposite processing***Composites Part A: Applied Science and Manufacturing*Elsevier, , 1 abr. 2016.

OZDEMIR, M.; FLOROS, J. D. Optimization of edible whey protein films

containing preservatives for mechanical and optical properties. **Journal of Food Engineering**, v. 84, n. 1, p. 116–123, jan. 2008.

PADRÃO, J. et al. Bacterial cellulose-lactoferrin as an antimicrobial edible packaging. **Food Hydrocolloids**, v. 58, p. 126–140, jul. 2016.

PANAITESCU, D. M. et al. Structural and morphological characterization of bacterial cellulose nano-reinforcements prepared by mechanical route. **Materials & Design**, v. 110, p. 790–801, 2016.

PENG, Y.; GARDNER, D. J.; HAN, Y. Drying cellulose nanofibrils: in search of a suitable method. **Cellulose**, v. 19, n. 1, p. 91–102, 2 fev. 2012.

PEREIRA, M. M. et al. Cytotoxicity and expression of genes involved in the cellular stress response and apoptosis in mammalian fibroblast exposed to cotton cellulose nanofibers. **Nanotechnology**, v. 24, n. 7, p. 075103, 22 fev. 2013.

PIERRE, G. et al. **TEMPO-mediated oxidation of polysaccharides: An ongoing story** *Carbohydrate Polymers* Elsevier, , 1 jun. 2017.

PINHEIRO, A C. et al. Utilização de revestimentos/filmes edíveis para aplicações alimentares. **Boletim da Biotecnologia - universidade do Minho**, v. Outubro, p. 18–29, 2010.

POLETTO, M.; PISTOR, V.; ZATTERA, A. J. Structural Characteristics and Thermal Properties of Native Cellulose. **Cellulose – Fundamental Aspects**, p. 45–68, 2013.

POTULSKI, D. C. et al. Influência da incorporação de celulose microfibrilada nas propriedades de resistência mecânicas do papel. **Scientia Forestalis/Forest Sciences**, v. 40, n. 103, p. 345–351, 15 jan. 2014.

PUANGSIN, B. et al. Comparative characterization of TEMPO-oxidized cellulose nanofibril films prepared from non-wood resources. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 59, p. 208–213, 2013.

QIU, K.; NETRAVALI, A. N. A Review of Fabrication and Applications of Bacterial Cellulose Based Nanocomposites. **Polymer Reviews**, v. 54, n. 4, p. 598–626, 2

out. 2014.

QUIÉVY, N. et al. Influence of homogenization and drying on the thermal stability of microfibrillated cellulose. **Polymer Degradation and Stability**, v. 95, n. 3, p. 306–314, 1 mar. 2010.

RAMBABU, N. et al. Production of nanocellulose fibers from pinecone biomass: Evaluation and optimization of chemical and mechanical treatment conditions on mechanical properties of nanocellulose films. **Industrial Crops and Products**, v. 83, p. 746–754, 2016.

RIEDEL, U.; NICKEL, J. Konstruktionswerkstoffe aus nachwachsenden Rohstoffen (BioVerbunde). **Materialwissenschaft und Werkstofftechnik**, v. 32, n. 5, p. 493–498, 1 maio 2001.

RODIONOVA, G.; ERIKSEN, Ø.; GREGERSEN, Ø. TEMPO-oxidized cellulose nanofiber films: Effect of surface morphology on water resistance. **Cellulose**, v. 19, n. 4, p. 1115–1123, 22 ago. 2012.

RUKA, D. R.; SIMON, G. P.; DEAN, K. M. Bacterial Cellulose and its Use in Renewable Composites. In: **Nanocellulose Polymer Nanocomposites: Fundamentals and Applications**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2014. p. 89–130.

SAITO, T. et al. Cellulose nanofibers prepared by TEMPO-mediated oxidation of native cellulose. **Biomacromolecules**, v. 8, n. 8, p. 2485–2491, ago. 2007.

SAITO, T. et al. Self-aligned integration of native cellulose nanofibrils towards producing diverse bulk materials. **Soft Matter**, v. 7, n. 19, p. 8804, 20 set. 2011.

SAITO, T.; ISOGAI, A. TEMPO-mediated oxidation of native cellulose. The effect of oxidation conditions on chemical and crystal structures of the water-insoluble fractions. **Biomacromolecules**, v. 5, n. 5, p. 1983–1989, 2004.

SANJAY, M. R. et al. **Characterization and properties of natural fiber polymer composites: A comprehensive review** *Journal of Cleaner Production* Elsevier, , 20 jan. 2018. Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0959652617323946>>.

Acesso em: 26 mar. 2018

SANTOS, T. M. et al. Fish gelatin films as affected by cellulose whiskers and sonication. **Food Hydrocolloids**, v. 41, p. 113–118, dez. 2014.

SCHRAMM, M.; HESTRIN, S. Factors affecting production of cellulose at the air/liquid interface of a culture of *Acetobacter xylinum*. **J. Gen. Microbiol.**, v. 11, n. 1, p. 123–9, ago. 1954.

SEGAL, L. et al. An Empirical Method for Estimating the Degree of Crystallinity of Native Cellulose Using the X-Ray Diffractometer. **Textile Research Journal**, v. 29, n. 10, p. 786–794, 2 out. 1959.

SERRO, M. **Industria Brasileira de Árvores** São Paulo, 2016.

SHAH, N. et al. Overview of bacterial cellulose composites: A multipurpose advanced material. **Carbohydrate Polymers**, v. 98, n. 2, p. 1585–1598, 6 nov. 2013.

SHANKAR, S.; RHIM, J.-W. Bionanocomposite Films for Food Packaging Applications. In: **Reference Module in Food Science**. [s.l.] Elsevier, 2018.

SHI, Z. et al. Utilization of bacterial cellulose in food. **Food Hydrocolloids**, v. 35, p. 539–545, mar. 2014.

SIQUEIRA, G.; BRAS, J.; DUFRESNE, A. Cellulose Whiskers versus Microfibrils: Influence of the Nature of the Nanoparticle and its Surface Functionalization on the Thermal and Mechanical Properties of Nanocomposites. **Biomacromolecules**, v. 10, n. 2, p. 425–432, 9 fev. 2009.

SONI, B. et al. Transparent bionanocomposite films based on chitosan and TEMPO-oxidized cellulose nanofibers with enhanced mechanical and barrier properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 151, p. 779–789, 2016.

SOUZA, V. C. DE. **Nanocristais de celulose como fase de reforço para filmes de quitosana: obtenção, caracterização e aplicação**. [s.l.] Universidade Federal de Santa Catarina, 2015.

SOYKEABKAEW, N. et al. All-cellulose nanocomposites by surface selective dissolution of bacterial cellulose. **Cellulose**, v. 16, n. 3, p. 435–444, 28 jun. 2009.

SOYKEABKAEW, N.; NISHINO, T.; PEIJS, T. All-cellulose composites of regenerated cellulose fibres by surface selective dissolution. **Composites Part A: Applied Science and Manufacturing**, v. 40, n. 4, p. 321–328, 1 abr. 2009.

SUHAS et al. **Cellulose: A review as natural, modified and activated carbon adsorbent** **Bioresource Technology**, set. 2016. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852416307659>>. Acesso em: 23 ago. 2017

TAIPINA, M. DE O. **Nanocristais De Celulose: Obtenção, Caracterização E Modificação De Superfície**. [s.l.] Universidade de Campinas, 2012.

TANG, X. Z. et al. Recent Advances in Biopolymers and Biopolymer-Based Nanocomposites for Food Packaging Materials. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 52, n. 5, p. 426–442, maio 2012.

TANPICHAI, S.; WITAYAKRAN, S. All-cellulose composites from pineapple leaf microfibers: Structural, thermal, and mechanical properties. **Polymer Composites**, p. n/a-n/a, mar. 2016.

TSOUKO, E. et al. Bacterial Cellulose Production from Industrial Waste and by-Product Streams. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 7, p. 14832–14849, 1 jul. 2015.

TURBAK, A. F.; SNYDER, F. W.; SANDBERG, K. R. Microfibrillated cellulose, a new cellulose product: properties, uses, and commercial potential. **J Poly Sc**, v. 37, p. 815–827, 1983.

UETANI, K.; YANO, H. Nanofibrillation of wood pulp using a high-speed blender. **Biomacromolecules**, v. 12, n. 2, p. 348–53, 14 fev. 2011.

UL-ISLAM, M.; KHAN, T.; PARK, J. K. Water holding and release properties of bacterial cellulose obtained by in situ and ex situ modification. **Carbohydrate Polymers**, v. 88, n. 2, p. 596–603, 2012.

ULLAH, H. et al. Advances in biomedical and pharmaceutical applications of functional bacterial cellulose-based nanocomposites. **Carbohydrate Polymers**, v. 150, p. 330–352, 2016.

VALENCIA, G. A. **Propriedades físicas de filmes à base de biopolímero reforçados com laponita**. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2017.

VASCONCELOS, N. F. et al. Bacterial cellulose nanocrystals produced under different hydrolysis conditions: Properties and morphological features. **Carbohydrate Polymers**, v. 155, p. 425–431, 2 jan. 2017.

VIEIRA, M. G. A. et al. **Natural-based plasticizers and biopolymer films: A review** *European Polymer Journal* Pergamon, , 1 mar. 2011. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014305710004763>>. Acesso em: 3 abr. 2018

WANG, W. et al. All cellulose composites based on cellulose diacetate and nanofibrillated cellulose prepared by alkali treatment. **Carbohydrate Polymers**, v. 179, p. 297–304, 1 jan. 2018a.

WANG, W. et al. All cellulose composites based on cellulose diacetate and nanofibrillated cellulose prepared by alkali treatment. **Carbohydrate Polymers**, v. 179, p. 297–304, 1 jan. 2018b.

XU, M.; MCCANNA, D. J.; SIVAK, J. G. Use of the viability reagent PrestoBlue in comparison with alamarBlue and MTT to assess the viability of human corneal epithelial cells. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 71, p. 1–7, 1 jan. 2015.

XU, X. et al. Cellulose nanocrystals vs. Cellulose nanofibrils: A comparative study on their microstructures and effects as polymer reinforcing agents. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 5, n. 8, p. 2999–3009, 24 abr. 2013.

YAMADA, Y. et al. Description of *Komagataeibacter* gen. nov., with proposals of new combinations (Acetobacteraceae). **The Journal of general and applied microbiology**, v. 58, n. 5, p. 397–404, 2012a.

YAMADA, Y. et al. Description of *Komagataeibacter* gen. nov., with proposals of new combinations (Acetobacteraceae). **The Journal of general and applied microbiology**, v. 58, n. 5, p. 397–404, 2012b.

YAMADA, Y. Transfer of *Gluconacetobacter kakiaceti*, *Gluconacetobacter medellinensis* and *Gluconacetobacter maltaceti* to the genus *Komagataeibacter* as *Komagataeibacter kakiaceti* comb. nov., *Komagataeibacter medellinensis* comb. nov. and *Komagataeibacter maltaceti* comb. nov. **INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY**, v. 64, n. Pt 5, p. 1670–1672, 1 maio 2014.

ZAFAR, R. et al. **Polysaccharide based bionanocomposites, properties and applications: A review** *International Journal of Biological Macromolecules* Elsevier, , 1 nov. 2016.

ZENG, M.; LAROMAINE, A.; ROIG, A. Bacterial cellulose films: influence of bacterial strain and drying route on film properties. **Cellulose**, v. 21, n. 6, p. 4455–4469, 2014.

ŽEPIČ, V. et al. Morphological, thermal, and structural aspects of dried and redispersed nanofibrillated cellulose (NFC). **Holzforschung**, v. 68, n. 6, 1 jan. 2014.

ZHANG, N. et al. A novel adsorbent TEMPO-mediated oxidized cellulose nanofibrils modified with PEI: Preparation, characterization, and application for Cu(II) removal. **Journal of Hazardous Materials**, v. 316, p. 11–18, 2016.

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