

UNIVERSIDADE DE ARARAQUARA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA EM MEDICINA REGENERATIVA  
E QUÍMICA MEDICINAL

AMANDA MARIA CLARO

NANOCRISTAIS DE CELULOSE BACTERIANA EXTRAÍDOS POR ROTAS ÁCIDA E ENZIMÁTICA  
PARA APLICAÇÃO COMO AGENTES DE REFORÇO EM MATRIZ POLIMÉRICA

Araraquara, SP  
2024

AMANDA MARIA CLARO

NANOCRISTAIS DE CELULOSE BACTERIANA EXTRAÍDOS POR ROTAS ÁCIDA E ENZIMÁTICA  
PARA APLICAÇÃO COMO AGENTES DE REFORÇO EM MATRIZ POLIMÉRICA

Tese de Doutorado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal da Universidade de Araraquara – UNIARA – como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Biotecnologia, Área de Concentração: Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal.

Orientador: Dr. Hernane da Silva Barud  
Coorientadores: Dr. Valdeir Arantes  
Dra. Rafaella Takehara Paschoalin

Araraquara, SP  
2024

## FICHA CATALOGRÁFICA

C547n Claro, Amanda Maria

Nanocristais de celulose bacteriana extraídos por rotas ácida e enzimática para aplicação como agentes de reforço em matriz polimérica/Amanda Maria Claro. – Araraquara: Universidade de Araraquara, 2024.

99f.

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química medicinal – UNIARA

1. Celulose bacteriana. 2. Nanocristais de celulose. 3. Hidrólise ácida. 4. Hidrólise enzimática. 5. Agente de reforço. I. Título.

CDU 577.4


## AMANDA MARIA CLARO

Tese apresentada a Universidade de Araraquara - UNIARA, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal.


Araraquara, 17 de maio de 2024.

## BANCA EXAMINADORA


Prof. Dr. HERNANE DA SILVA BARUD (Orientador)  
Universidade de Araraquara – UNIARA

Documento assinado digitalmente  
 HERNANE DA SILVA BARUD  
Data: 04/06/2024 16:52:36-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>


Prof. Dr. CLÓVIS AUGUSTO RIBEIRO  
Instituto de Química de Araraquara – UNESP

Documento assinado digitalmente  
 CLOVIS AUGUSTO RIBEIRO  
Data: 22/05/2024 17:10:08-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>


Dr. MARCOS VINICIUS LOREVICE  
Laboratório Nacional de Nanotecnologia (LNNano) – Centro Nacional de  
Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM) – Campinas/SP

Documento assinado digitalmente  
 MARCOS VINICIUS LOREVICE  
Data: 22/05/2024 16:30:45-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dr<sup>a</sup> HENRIETTE MONTEIRO CORDEIRO DE AZEREDO  
EMBRAPA Instrumentação – São Carlos/SP

Documento assinado digitalmente  
 HENRIETTE MONTEIRO CORDEIRO DE AZEREDO  
Data: 20/05/2024 14:46:17-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. GUILLERMO RAUL CASTRO  
Universidade Federal de ABC – Santo André/SP

Documento assinado digitalmente  
 GUILLERMO RAUL CASTRO  
Data: 29/05/2024 11:17:22-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

## AMANDA MARIA CLARO

### Formação Acadêmica

- 2020 - 2024** Doutorado em Biotecnologia.  
Universidade de Araraquara, UNIARA, Araraquara, Brasil  
Título: Nanocristais de Celulose Bacteriana Extraídos por Rotas Ácida e Enzimática para Aplicação como Agentes de Reforço em Matriz Polimérica  
  
Orientador: Hernane da Silva Barud  
Coorientadores: Dr. Valdeir Arantes  
Dra. Rafaella Takehara Paschoalin
- 2018 - 2019** Mestrado em Biotecnologia.  
Universidade de Araraquara, UNIARA, Araraquara, Brasil  
Título: Plataforma Multifuncional Baseada em Celulose Bacteriana para Aplicações Biomédicas  
  
Orientador: Hernane da Silva Barud  
Coorientador: Gustavo Claro Monteiro
- 2011 - 2017** Graduação em Química.  
Universidade Federal de São Carlos, UFSCar, São Carlos, Brasil  
com período sanduíche de 2014-2015 na DePaul University, Chicago, Estados Unidos  
Bolsista Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior  
  
Orientador UFSCar: Timothy John Brocksom  
Orientador DePaul University: Gregory B. Kharas

### Artigos Publicados em Periódicos

- 1. CLARO, AMANDA MARIA;** DIAS, ISABELLA KAROLINE RIBEIRO; FONTES, MARINA DE LIMA; COLTURATO, VITÓRIA MARIA MEDALHA; LIMA, LAIS RONCALHO; SÁVIO, LETÍCIA BORGES; BERTO, GABRIELA LEILA; ARANTES, VALDEIR; BARUD, HERNANE DA SILVA. Bacterial cellulose nanocrystals obtained through enzymatic and acidic routes: A comparative study of their main properties and in vitro biological responses. *Carbohydrate Research*, v. 539, p. 109104, 2024.
- 2. FARACO, THALES ALVES;** DE LIMA FONTES, MARINA; PASCHOALIN, RAFAELLA TAKEHARA; **CLARO, AMANDA MARIA;** GONÇALVES, ISABELLA SALGADO; CAVICCHIOLI, MAURICIO; DE FARIAS, RENAN LIRA; CREMONA, MARCO; RIBEIRO, SIDNEY JOSÉ LIMA; DA SILVA BARUD, HERNANE; LEGNANI, CRISTIANO. Review of Bacterial Nanocellulose as Suitable Substrate for Conformable and Flexible Organic Light-Emitting Diodes. *Polymers*, v. 15, p. 479, 2023
- 3. CLARO, A. M.;** ALVES, C. C.; SANTOS, K. S.; ROCHA, E. G.; FONTES, M. L.; MONTEIRO, G. C.; CARVALHO, G. S. G.; CAIUT, J. M. A.; MOROZ, A.; RIBEIRO, S. J. L.; BARUD, H. S. Regenerated cellulose sponge as sacrificial template for the synthesis of three-dimensional porous alumina-silica scaffold for tissue engineering. *Journal of Sol-Gel Science And Technology*, v. 105, p. 1-13, 2023.
- 4. CLARO, AMANDA MARIA;** DO AMARAL, NAYARA CAVICHIOLLI; COLTURATO, VITÓRIA MARIA MEDALHA; ALEIXO, NADIA ANDRADE; PAIVA, ROBERT; CRUZ, SANDRA ANDREA; MONTEIRO, GUSTAVO CLARO; DE CARVALHO, GUSTAVO SENRA GONÇALVES; NOGUEIRA, FLÁVIA APARECIDA RESENDE; DEFFUNE, ELENICE; IEMMA, MÔNICA ROSAS DA COSTA; BARUD, HERNANE DA SILVA. Siloxane-modified bacterial cellulose as a promising platform for cell culture. *Cellulose*, 2022.
- 5. COSTA, ISABELLA LM;** PEREIRA, PAULO HF; **CLARO, AMANDA MARIA;** AMARAL, NAYARA CAVICHIOLLI DO; Barud, Hernane da Silva; RIBEIRO, ROSINEI BATISTA ;MULINARI, DANIELLA REGINA. 3D-printing pen from

valorization of pine cone residues as reinforcement in acrylonitrile butadiene styrene (ABS): Microstructure and thermal properties. *Journal of Thermoplastic Composite Materials*, p. 089270572110127, 2021.

6. MARTINS, LARISSA S.; SILVA, NYCOLLE G.S.; **CLARO, AMANDA MARIA**; AMARAL, NAYARA C.; BARUD, HERNANE S.; MULINARI, DANIELLA R. Insight on açai seed biomass economy and waste cooking oil: Eco-sorbent castor oil-based. *Journal of Environmental Management*, v. 293, p. 112803, 2021.

7. MAIA, L. S.; ZANINI, NOELLE CARDOSO; **CLARO, A. M.**; AMARAL, N. C.; BARUD, H. S.; MULINARI, DANIELLA REGINA. ECO-FRIENDLY FOAMS OF CASTOR OIL BASED-POLYURETHANE WITH ARTEMISIA RESIDUE FILLERS FOR DISCARDED VEGETABLE OIL SORPTION. *Journal of Applied Polymer Science*, 2021.

8. DE CARVALHO, JÚLIA GOMES; ZANINI, NOELLE CARDOSO; **CLARO, AMANDA MARIA**; DO AMARAL, NAYARA CAVICHIOELLI; BARUD, HERNANE S.; MULINARI, DANIELLA REGINA. Composite filaments OF PHBV reinforced with  $ZrO_2 \cdot nH_2O$  particles for 3D printing. *Polymer Bulletin*, p. 1-20, 2021.

9. DO AMARAL, NAYARA C.; **CLARO, AMANDA M.**; MONTEIRO, GUSTAVO C.; BARUD, HERNANE S. Surface-Modified Bacterial Cellulose with Mercaptosilane as a Multifunctional Platform. *International Journal of Advances in Medical Biotechnology - IJAMB*, v. 2, p. 19-24, 2020.

10. AQUARONI, NAYARA AP. SIMEI; NAKAHATA, DOUGLAS H.; LAZARINI, SILMARA C.; RESENDE, FLÁVIA A.; CÂNDIDO, AMANDA L.P.; DA SILVA BARUD, HERNANE; **CLARO, AMANDA MARIA**; DE CARVALHO, JOÃO ERNESTO RIBEIRO, CAMILA M.; PAVAN, FERNANDO R.; LUSTRI, BRUNA C.; RIBEIRO, TAMARA RENATA MACHADO; MOREIRA, CRISTIANO G.; CÂNDIDO, TUANY ZAMBROTI; LIMA, CARMEN SILVIA PASSOS; RUIZ, ANA LÚCIA T.G.; CORBI, PEDRO P.; LUSTRI, WILTON R. Antibacterial activities and antiproliferative assays over a tumor cells panel of a silver complex with 4-aminobenzoic acid: Studies in vitro of sustained release using bacterial cellulose membranes as support. *Journal of Inorganic Biochemistry*, v. 212, p. 111247, 2020.

11. CHIOZZIN, G. C.; MENDES, G.; VANNI, F.; **CLARO, A. M.**; AMARAL, C. S. T.; AMARAL, N. C.; BARUD, H. S.; AMARAL, A. C. Bacterial nanocellulose membrane as bolus in radiotherapy: 'proof of concept'. *Cellulose*, 2020.

12. AZEREDO, HENRIETTE M. C.; BARUD, HERNANE; FARINAS, CRISTIANE S.; VASCONCELLOS, VANESSA M.; **CLARO, AMANDA M.** Bacterial Cellulose as a Raw Material for Food and Food Packaging Applications. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, v. 3, p. 1-14, 2019.

13. KHARAS, GREGORY B.; **CLARO, AMANDA M.**; GAO, YOUYA; BHANOT, JAY S.; BOSEK, PAULINA; CORWIN, TIMOTHY R.; GIDEON, CHRISTOPHER J.; FITZPATRICK, PAUL R.; FLORES, ISRAEL M.; RICKTER, JUSTIN M. Novel copolymers of styrene. 1. Alkyl ring-substituted propyl 2-cyano-3-phenyl-2-propenoates. *Journal of Macromolecular Science Part A-Pure and Applied Chemistry* v. 53, p. 595-599, 2016.

14. KHARAS, GREGORY B.; GAO, YOUYA ; **CLARA, AMANDA M.**; CURTIS, VIRGINIA J.; DA SILVA BECHARA SOARES, RAFAELA; DUGAN, BROOKE; DUNCAN, COURTNEY E.; GLUZMAN, EDWARD R.; GOMEZ, NAVELY; KAWARSKI, MARGARET Y.; KESTIN, DANIEL M. Novel copolymers of styrene. 13. Methyl and methoxy ring-trisubstituted butyl 2-cyano-3-phenyl-2-propenoates. *Journal of Macromolecular Science Part A-Pure and Applied Chemistry*, v. 53, p. 389-393, 2016.

## Capítulos de Livros Publicados

1. Borges, Marco Antonio Costa; Sousa, Ricardo Barbosa de; **CLARO, AMANDA MARIA**; Filho, Edson Cavalcanti da Silva; Barud, Héli da Gomes de Oliveira; Barud, Hernane da Silva. BIOPOLÍMEROS PARA REGENERAÇÃO ÓSSEA NA ODONTOLOGIA: UMA PROSPECÇÃO TECNOLÓGICA. CIÊNCIA E ENGENHARIA DE MATERIAIS: CONCEITOS, FUNDAMENTOS E APLICAÇÃO. 1ed.: , 2021, p. 128-146.

2. Sousa, Ricardo Barbosa de; **CLARO, AMANDA MARIA**; Barud, Hernane da Silva; Ribeiro, Sidney José Lima; Silva Filho, Edson Cavalcanti da. CELULOSE BACTERIANA PARA APLICAÇÕES BIOMÉDICAS: UMA PROSPECÇÃO TECNOLÓGICA. *Trabalhos nas Áreas de Fronteira da Química*. 1ed.: Atena Editora, 2021, p. 63-87.

## Patentes

1. BARUD, HERNANE S.; **CLARO, AMANDA M.**; AMARAL, A. C.; AMARAL, C. S. T.; VANNI, F.; CHIOZZIN, G. C.; MENDES, G.; DE OLIVEIRA BARUD, H. G.; DO AMARAL, N. C. MEMBRANA DE NANOCELULOSE BACTERIANA E SEU USO COMO BOLUS EM RADIOTERAPIA. 2020, Brasil. Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: BR10202002645, título: "MEMBRANA DE NANOCELULOSE BACTERIANA E SEU USO COMO BOLUS EM RADIOTERAPIA", Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial. Depósito: 22/12/2020

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Hernane Barud, pela amizade, pelas agradáveis conversas permeadas por reflexões e por me orientar neste trabalho acadêmico.

Ao Prof. Dr. Valdeir Arantes e à Dra. Rafaella Paschoalin, pela coorientação e direcionamento.

À Dra. Isabella Dias e à Dra. Gabriela Berto, pelo auxílio e ensinamentos com a preparação dos nanocristais obtidos por rota enzimática.

À Dra. Marina Fontes, pela contribuição com os ensaios celulares.

Ao Dr. Saulo Ozelin, pela colaboração com os ensaios mecânicos.

Aos membros do grupo BioPolMat, que contribuíram direta e indiretamente com este trabalho, em especial à Letícia Sávio e à Vitória Medalha por todo auxílio e dedicação.

À Universidade de Araraquara e a todos os servidores da instituição.

À Empresa BioSmart Nanotechnology LDTA, pelo fornecimento das membranas de celulose bacteriana.

À Anton Paar Brasil, pelas análises de AFM.

À Rosana Maria Nascimento de Assunção da Universidade Federal de Uberlândia - UFU e ao Prof. Dr. Lucas Alonso Rocha da Universidade de Franca - Unifran, pelas análises de DRX.

À Capes, pela bolsa concedida.

Ao CNPq (Processo: 309614/2021-0), ao MCTIC/CNPq (Processo: 406973/2022-9) através do INCT/Polissacarídeos (Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Polissacarídeos), ao INCT/INFO (Instituto Nacional de Fotônica) e ao Centro de Pesquisas em Óptica e Fotônica (CePOF, Processo: 2013/07276-1).

Ao meu esposo Flávio, meu porto seguro, pelo amor e apoio incondicionais.

Aos meus amados pais Edgard (*in memoriam*) e Ana Maria, por direcionarem e iluminarem meus caminhos.

Sobretudo à Deus, pelo dom da vida e por me amar especialmente.

*“A única coisa de que necessitamos para ser filósofos  
é a capacidade de nos admirarmos com as coisas”*

Trecho do livro “O Mundo de Sofia”, de Jostein Gaarder



## RESUMO

Nanocristais de celulose (CNCs), nanoestruturas cristalinas extraídas de fibras celulósicas, têm sido explorado em diversas aplicações, especialmente como carga de reforço para polímeros. A produção de CNCs a partir de subproduto de celulose é um processo que agrega valor a um material que seria descartado, diminui os custos de produção dos CNCs e contribui para minimizar os impactos ambientais gerados no processo. Nesse contexto, este trabalho explorou a obtenção de CNCs obtidos a partir de resíduos de celulose bacteriana (CB) advindos da indústria de curativos com a perspectiva de aplicação como agentes de reforço em matriz polimérica. Foram empregadas duas diferentes rotas na extração dos nanocristais: rota ácida utilizando solução de ácido sulfúrico 64% e rota enzimática empregando um *pull* comercial de celulases precedida por um pré-tratamento físico de moagem. O pré-tratamento de micronização no caso da via enzimática diminuiu o tamanho médio das partículas, o grau de polimerização e a estabilidade térmica da celulose, ao passo que a porção amorfa da celulose tornou-se mais acessível ao ataque enzimático. Nesse caso, os CNCs obtidos apresentaram formato de esferas com diâmetro médio de 48 – 56 nm enquanto os CNCs obtidos via hidrólise ácida apresentaram alta razão de aspecto, com formato de agulhas de comprimento médio de 158 nm e largura de 11 nm. O potencial zeta superficial dos CNCs obtidos por rota ácida foi de -30,8 mV enquanto no caso da rota enzimática esse valor foi inferior a 3 mV, indicando que os CNCs obtidos via hidrólise com ácido sulfúrico apresentam suspensão mais estável com a presença de cargas negativas geradas pela inserção de grupos sulfonatos na superfície dos CNCs. A goma gelana (GG), matriz polimérica empregada como modelo para se avaliar o efeito da incorporação dos CNCs nas propriedades mecânicas do polímero, foi modificada com 1%, 5% e 10% (m/m) de CNCs. A incorporação dessas nanopartículas resultou em uma diminuição na transmitância da GG de 8 – 48% em 550 nm, além de ter afetado o processo de degradação da matriz. Entretanto, apenas os CNCs obtidos via rota enzimática empregados na concentração de 10% promoveram aumento na rigidez da GG, que teve seu módulo de elasticidade aumentado de  $965 \pm 407$  MPa para  $2448 \pm 675$  MPa. Ainda, nenhum dos materiais produzidos apresentou efeito citotóxico sobre as células L929.

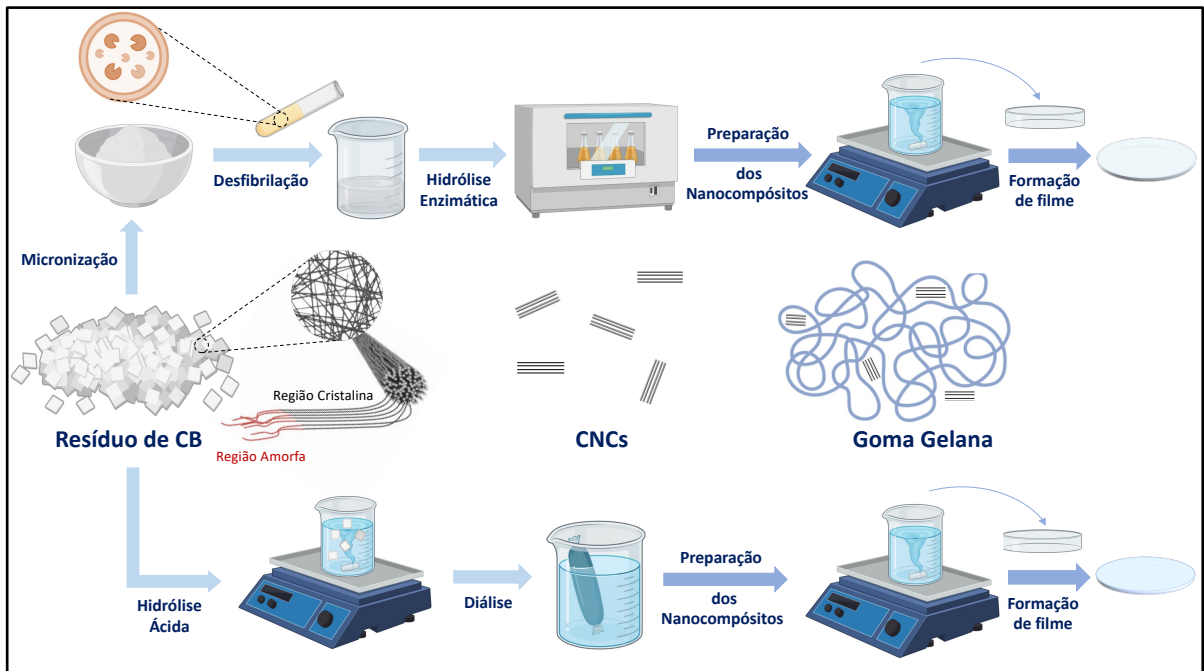
**Palavras-chave:** Celulose bacteriana, nanocristais de celulose, hidrólise ácida, hidrólise enzimática, agente de reforço

## ABSTRACT

Cellulose nanocrystals (CNCs), crystalline nanostructures extracted from cellulosic fibers, have been employed in several applications, especially as reinforcing fillers for polymers. The production of CNCs from pulp waste is an environmentally friendly process that aims to recycle underutilized materials, contributing to the reduction of environmental impacts. Therewith, the aim of this work is to obtain CNCs from bacterial cellulose (CB) waste from the wound dressing industry to apply it as reinforcing agents in a polymeric matrix. Two different extraction routes were employed: acidic route using 64% sulfuric acid and enzymatic route using a commercial cellulase enzyme mixture preceded by a physical milling pre-treatment. The micronization pre-treatment related to the enzymatic route decreased the average particle size, the degree of polymerization and the thermal stability of cellulose, while the amorphous portion of cellulose had become more accessible to enzymatic attack. In this case, the obtained CNCs were sphere-shaped nanoparticles with an average diameter of 48 – 56 nm while CNCs obtained through acid hydrolysis exhibited a high aspect ratio, with a needle shape with an average length of 158 nm and a width of 11 nm. The surface zeta potential of the CNCs obtained through acidic route was -30,8 mV while for enzymatic routes these values were lower than 3 mV, indicating that CNCs obtained by the hydrolysis using sulfuric acid were found to be a more stable suspension with negatively charged nanoparticles (sulfonate groups). Gellan gum (GG) was the polymeric matrix used as reference to evaluate the effect of CNCs on the mechanical properties of the polymer; GG was modified with 1%, 5% and 10% (m/m) of CNCs. The CNCs incorporation resulted in a decrease in GG transmittance in the range of 8 – 48% at 550 nm, and had affected the matrix degradation process. Only the GG composite modified with 10% of CNCs obtained through the enzymatic route had its stiffness increased, whose elastic modulus increased from  $965 \pm 407$  MPa to  $2448 \pm 675$  MPa. Furthermore, none of the produced materials showed cytotoxic effect against L929 cells.

**Keywords:** Bacterial cellulose, cellulose nanocrystals, acid hydrolysis, enzymatic hydrolysis, reinforcing agent

# GRAPHICAL ABSTRACT



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Imagem de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) da bactéria <i>K. xylinus</i> sob a superfície da membrana de celulose por ela produzida .....	19
<b>Figura 2.</b> Representação esquemática da extrusão de cadeias glucanas e formação da CB.....	20
<b>Figura 3.</b> Representação esquemática da via metabólica de produção de celulose por <i>K. xylinus</i> .....	21
<b>Figura 4.</b> Porções amorfas e cristalinas das nanofibras de CB, ligações de hidrogênio intermoleculares e intramoleculares (linhas pontilhadas) e numeração dos carbonos da unidade de glicose formadora do biopolímero.....	22
<b>Figura 5.</b> Estruturas cristalinas da celulose I <sub>α</sub> , I <sub>β</sub> , II e III <sub>I</sub> .....	23
<b>Figura 6.</b> Principais aplicações da CB no Brasil e no mundo.....	25
<b>Figura 7.</b> CNCs produzidos a partir de CB por hidrólise ácida com diferentes tipos de ácidos .....	27
<b>Figura 8.</b> Mecanismo de ação das celulasas.....	28
<b>Figura 9.</b> Esquemas de limiares de percolação em compósitos nanopartículas/matriz polimérica: Nanopartículas (a) desconectadas, (b) parcialmente conectadas e (c) totalmente conectadas .....	30
<b>Figura 10.</b> Estrutura química da goma gelana (a) altamente acetilada e (b) parcialmente desacetilada.....	33
<b>Figura 11.</b> Processo de gelificação da GG.....	34
<b>Figura 12.</b> MicroCell obtida a partir do processamento em moinho de bolas de curativos de CB .....	42
<b>Figura 13.</b> Microscopias de Força Atômica com imagem 2D e 3D da CB (a) em 50 μm <sup>2</sup> de material e (b) em 10 μm <sup>2</sup> de material, e da MicroCell (c) em 3 μm <sup>2</sup> de material e (d) em 1 μm <sup>2</sup> de material.....	43
<b>Figura 14.</b> Microscopias Eletrônicas de Varredura da CB com magnificação de (a) 500x e (b) 30.000x e da MicroCell com magnificação de (c) 500x e (d) 500x ...	45
<b>Figura 15.</b> Difratoogramas de raios-X da CB e da MicroCell.....	46
<b>Figura 16.</b> Espectro vibracional na região do infravermelho da CB e da MicroCell .	48
<b>Figura 17.</b> Caracterização Térmica: Curvas (a) TG da CB e da Microcell; (b) DTG da CB e da Microcell; (c) DSC da CB e da MicroCell.....	49
<b>Figura 18.</b> Microscopias Eletrônicas de Transmissão dos a-CNCs com (a) barra de escala = 500 nm e (b) barra de escala = 200 nm; Histogramas de distribuição de tamanho gerados a partir das micrografias referentes ao (c) comprimento dos a-CNCs e (d) espessura dos a-CNCs .....	58
<b>Figura 19.</b> Distribuição do tamanho hidrodinâmico dos a-CNCs.....	59
<b>Figura 20.</b> Microscopias Eletrônicas de Transmissão dos CNCs-MicroCell-25U-son30 com (a) barra de escala = 1 μm e (b) barra de escala = 500 nm; (c) Histograma de distribuição de diâmetro gerado a partir das micrografias .....	60
<b>Figura 21.</b> Distribuição do tamanho hidrodinâmico dos CNCs-MicroCell-25U-son30 .....	61
<b>Figura 22.</b> Microscopias Eletrônicas de Transmissão dos CNCs-MicroCell-50U-son30 com (a) barra de escala = 1 μm e (b) barra de escala = 500 nm; (c) Histograma de distribuição de diâmetro gerado a partir das micrografias .....	62
<b>Figura 23.</b> Distribuição do tamanho hidrodinâmico dos CNCs-MicroCell-50U-son30 .....	62

<b>Figura 24.</b> Microscopias Eletrônicas de Transmissão dos CNCs-MicroCell-50U-son60 com (a) barra de escala = 1 $\mu\text{m}$ e (b) barra de escala = 500 nm; (c) Histograma de distribuição de diâmetro gerado a partir das micrografias .....	63
<b>Figura 25.</b> Distribuição do tamanho hidrodinâmico dos CNCs-MicroCell-50U-son60 .....	64
<b>Figura 26.</b> Espectro vibracional na região do infravermelho dos CNCs obtidos via rotas ácida e enzimática .....	66
<b>Figura 27.</b> Caracterização Térmica: Curvas (a) TG/DTG dos a-CNCs e (c) DSC dos a-CNCs; Curvas .....	67
<b>Figura 28.</b> Microscopias Eletrônicas de Varredura da (a) seção transversal do filme GG, (b) superfície do filme GG, (c) seção transversal do filme GG1 a-CNCs, (d) seção transversal do filme GG5 a-CNCs, (e) seção transversal do filme GG10 a-CNCs, (f) seção transversal do filme GG1 e-CNCs, (g) seção transversal do filme GG5 e-CNCs, (h) seção transversal do filme GG10 e-CNCs.....	77
<b>Figura 29.</b> Fotos dos filmes (a) GG (b) GG1 a-CNCs, (c) GG5 a-CNCs, (d) GG10 a-CNCs, (e) GG1 e-CNCs, (f) GG1 e-CNCs na região mais translúcida (g) GG5 e-CNCs, (h) GG5 e-CNCs na região mais translúcida (i) GG10 e-CNCs, (j) GG10 e-CNCs na região mais translúcida .....	78
<b>Figura 30.</b> Espectros de transmissão no UV-Vis da GG e dos filmes nanocompósitos reforçados com (a) a-CNC e (b) e-CNCs .....	79
<b>Figura 31.</b> Difrátogramas de raios-X da GG e dos filmes nanocompósitos reforçados com (a) a-CNCs e (b) e-CNCs .....	80
<b>Figura 32.</b> Espectro vibracional na região do infravermelho da CB, GG e dos filmes nanocompósitos reforçados com (a) a-CNCs e (b) e-CNCs .....	81
<b>Figura 33.</b> Caracterização Térmica: Curvas (a) TG, (b) DTG e (c) DTG aproximada da GG e dos filmes nanocompósitos reforçados com a-CNCs; Curvas (d) TG, (e) DTG e (f) DTG aproximada da GG e dos filmes nanocompósitos reforçados com e-CNCs .....	83
<b>Figura 34.</b> Caracterização Térmica: Curvas DSC da GG e dos filmes nanocompósitos reforçados com (a) a-CNCs e (b) e-CNCs .....	84
<b>Figura 35.</b> Curvas tensão-deformação obtidas em um ensaio de tração [101] (Adaptado).....	84
<b>Figura 36.</b> Curvas tensão-deformação obtidas no ensaio de tração a partir de um corpo de prova de cada filme produzido .....	86
<b>Figura 37.</b> Módulo de elasticidade dos filmes nanocompósitos reforçados com (a) a-CNCs e (b) e-CNCs.....	87
<b>Figura 38.</b> Tensão de ruptura dos filmes nanocompósitos reforçados com (a) a-CNCs e (b) e-CNCs.....	88
<b>Figura 39.</b> Deformação na ruptura dos filmes nanocompósitos reforçados com (a) a-CNCs e (b) e-CNCs.....	88
<b>Figura 40.</b> Viabilidade de células L929 após 24 horas de exposição aos filmes nanocompósitos pelo teste de MTT .....	89

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Fontes de CB e rotas de produção empregadas na produção de CNCs e suas principais propriedades.....	29
<b>Tabela 2.</b> Valores de resistência à tração e módulo de elasticidade de algumas cargas utilizadas como reforço de matrizes poliméricas.....	31
<b>Tabela 3.</b> Dados referentes ao tempo de fluxo das soluções empregadas na determinação do grau de polimerização e os valores de GP obtidos para a CB e para a MicroCell.....	47
<b>Tabela 4.</b> Formato, tamanho médio e potencial zeta dos CNCs obtidos.....	64
<b>Tabela 5.</b> Módulo de elasticidade, tensão de ruptura e deformação na ruptura calculados a partir das curvas tensão x deformação dos materiais.....	87

## LISTA DE ABREVIATURAS

Abs: Absorbância

AFM: Microscopia de Força Atômica (do inglês *Atomic Force Microscopy*)

ANOVA: Análise de Variância

CB: Celulose bacteriana

CNCs: Nanocristais de celulose (do inglês, *Cellulose Nanocrystals*)

DLS: Espalhamento de Luz Dinâmico (do inglês, *Dynamic Light Scattering*)

DMEM: meio de Eagle Modificado por Dulbecco (do inglês *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*)

DSC: Calorimetria Diferencial de Varredura (do inglês *Differential Scanning Calorimetry*)

DTG: Termogravimetria Derivada (do inglês *Derivative Thermogravimetric*)

FDA: *Food and Drug Administration*

FTIR-ATR: Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier por Reflectância Total Atenuada (do inglês *Fourier Transform Infrared-Attenuated Total Reflectance*)

HS: Meio de cultivo Hestrin-Schramm

ICr: índice de cristalinidade relativo

MET: Microscopia Eletrônica de Transmissão

MEV: Microscopia Eletrônica de Varredura

MTT: (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide)

OLEDs: Diodo Emissor de Luz Orgânica (do inglês *Organic Light-Emitting Diode*)

PBS: tampão fosfato salino (do inglês *Phosphate Buffer Saline*)

Pdl: índice de polidispersividade (do inglês *polydispersive index*)

PHR: partes por cem de borracha (do inglês, *Parts per Hundred of Rubber*)

SFB : Soro Fetal Bovino

TGA: Análise Termogravimétrica (do inglês *Thermogravimetric Analysis*)

T<sub>endset</sub>: Temperatura de *Endset*

T<sub>onset</sub>: Temperatura de *Onset*

T<sub>pico</sub> - Temperatura de Pico

# SUMÁRIO

<b>Capítulo 1</b>	<b>18</b>
<b>Introdução</b>	<b>18</b>
1. <i>Seção Teórica</i>	18
1.1 Celulose	18
1.1.1 Celulose Bacteriana (CB)	18
1.1.2 Mecanismos Bioquímicos e Moleculares da Biossíntese de CB por <i>Komagataeibacter Xylinus</i>	19
1.1.3 Características e Propriedades da CB	21
1.1.4 Produção da CB	23
1.1.5 Aplicações da CB	24
1.2 Nanocristais de CB Obtidos por Hidrólise Ácida: Propriedades e Aspectos Gerais	26
1.3 Nanocristais de Celulose Bacteriana Obtidos por Hidrólise Enzimática: Propriedades e Aspectos Gerais	28
1.4 Nanocristais de Celulose Bacteriana como Agente de Reforço em Matrizes Poliméricas	30
1.5 Matriz Polimérica de Goma Gelana Reforçada com Celulose	32
2. <i>Objetivos do Trabalho</i>	35
<b>Capítulo 2</b>	<b>36</b>
<b>Produção e Caracterização de Celulose Bacteriana e Celulose Bacteriana Micronizada para Extração de Nanocristais</b>	<b>36</b>
1. <i>Resumo do Capítulo</i>	36
2. <i>Objetivos</i>	37
3. <i>Materiais e Métodos</i>	38
3.1 Membranas de Celulose Bacteriana	38
3.2 Preparo da Celulose Micronizada	38
3.3 Microscopia de Força Atômica	38
3.4 Microscopia Eletrônica de Varredura	38
3.5 Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier por Reflectância Total Atenuada	38
3.6 Difração de Raios-X	39
3.7 Determinação do Grau de Polimerização Médio das Amostras de Celulose	39
3.8 Caracterização Térmica	40
4. <i>Resultados e Discussão</i>	42
4.1 Microscopia de Força Atômica (AFM)	42
4.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	44
4.3 Difração de Raios-X (DRX)	45
4.4 Determinação do Grau de Polimerização (GP)	47
4.5 Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier por Reflectância Total Atenuada (FTIR-ATR)	47
4.6 Caracterização Térmica	48
5. <i>Conclusões do Capítulo</i>	51
<b>Capítulo 3</b>	<b>52</b>
<b>Produção e Caracterização de Nanocristais Extraídos de Celulose Bacteriana por Rotas Ácida e Enzimática</b>	<b>52</b>
1. <i>Resumo do Capítulo</i>	52
2. <i>Objetivos</i>	53
3. <i>Materiais e Métodos</i>	54
3.1 Preparo dos Nanocristais de Celulose via Hidrólise Ácida (a-CNCs)	54



3.2	Preparo dos Nanocristais de Celulose via Hidrólise Enzimática	54
3.3	Microscopia Eletrônica de Transmissão	55
3.4	Espalhamento de Luz Dinâmico	55
4.	<i>Resultados e Discussão</i>	57
4.1	Caracterização dos Nanocristais de Celulose via Hidrólise Ácida	57
4.1.1	Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	57
4.1.2	Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS) e Potencial Zeta	58
4.2	Caracterização dos Nanocristais de Celulose via Hidrólise Enzimática	59
4.2.1	CNCs-MicroCell-25U-son30	59
4.2.1.1	Microscopia Eletrônica de Transmissão	59
4.2.1.2	Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS) e Potencial Zeta	61
4.2.2	CNCs-MicroCell-50U-son30	61
4.2.2.1	Microscopia Eletrônica de Transmissão	61
4.2.2.2	Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS) e Potencial Zeta	62
4.2.3	CNCs-MicroCell-50U-son60	63
4.2.3.1	Microscopia Eletrônica de Transmissão	63
4.2.3.2	Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS) e Potencial Zeta	64
4.3	Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier por Reflectância Total Atenuada (FTIR-ATR)	65
4.4	Caracterização Térmica	66
5.	<i>Conclusões do Capítulo</i>	69
<b>Capítulo 4</b>		<b>70</b>
<b>Produção e Caracterização de Filmes Nanocompósitos de Goma Gelana Reforçados com Nanocristais de Celulose Bacteriana</b>		<b>70</b>
1.	<i>Resumo do Capítulo</i>	70
2.	<i>Objetivos</i>	71
3.	<i>Materiais e Métodos</i>	72
3.1	Preparo dos Filmes de GG	72
3.2	Preparo dos Filmes Nanocompósitos de GG	72
3.3	Microscopia Eletrônica de Varredura	72
3.4	Espectroscopia UV-Visível	73
3.5	Ensaio Mecânico	73
3.6	Avaliação da Citotoxicidade Celular dos Filmes	74
4.	<i>Resultados e Discussão</i>	76
4.1	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	76
4.2	Espectroscopia UV-Visível	77
4.3	Difração de Raios-X (DRX)	79
4.4	Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier por Reflectância Total Atenuada (FTIR-ATR)	80
4.5	Caracterização Térmica	81
4.6	Avaliação das Propriedades Mecânicas	84
4.7	Avaliação da Citotoxicidade Celular dos Filmes	88
5.	<i>Conclusões do Capítulo</i>	90
<b>Conclusões Finais</b>		<b>91</b>
<b>Perspectivas</b>		<b>92</b>
<b>Bibliografia</b>		<b>93</b>

## **Apresentação**

A celulose bacteriana (CB) é um polímero formado por uma cadeia longa e linear composta por monômeros de glicose. A CB pode ser sintetizada por determinadas bactérias, entre as quais pela bactéria acética *Komagataeibacter xylinus*, reconhecida como a principal cepa produtora de celulose. Devido a sua estrutura de rede tridimensional formada por nanofibras interconectadas e por apresentar alta pureza, a CB exhibe propriedades estruturais distintas da celulose vegetal. A CB tem sido utilizada como matriz biopolimérica para diversas aplicações, notadamente nas áreas médica e biomédica; na área biomédica a CB é amplamente utilizada na forma de biocurativos. Neste trabalho, retalhos de CB gerados durante a manufatura de biocurativos, considerados resíduo dessa indústria, foram utilizados como fonte de celulose para a extração de nanocristais de celulose (CNCs). Os CNCs geralmente apresentam boas propriedades de reforço devido a suas dimensões nanométricas e alta cristalinidade e, por essa razão, sua eficiência enquanto agentes de reforço foi avaliada em matriz polimérica de goma gelana.

Esta tese está dividida em quatro capítulos. O capítulo um é dedicado à introdução e versa sobre celulose bacteriana e nanocristais de celulose, notadamente sobre produção, propriedades e aplicações desses materiais. Ainda, este capítulo trata da goma gelana, matriz polimérica empregada como referência neste trabalho. Os capítulos dois e três se dedicam, respectivamente, à caracterização dos materiais de partida empregados na extração dos nanocristais de celulose e à produção e caracterização dos nanocristais por rotas ácida e enzimática. O capítulo quatro trata da produção e caracterização dos filmes de goma gelana modificados com os diferentes nanocristais de celulose e explora o efeito dessas nanopartículas na rigidez e no limite de resistência da matriz polimérica.

# Capítulo 1

## Introdução

### 1. Seção Teórica

#### 1.1 Celulose

Os polímeros naturais são altamente atraentes para serem empregados no desenvolvimento de materiais sustentáveis, notadamente por serem obtidos a partir de recursos renováveis. A celulose, um biopolímero abundante na Terra, tem uma produção anual estimada entre 75 – 100 bilhões de toneladas [1]. Este biomaterial tem sido empregado em diferentes áreas de aplicação, como produção de papel e embalagens, têxtil, alimentos, materiais biomédicos e eletrônica [2].

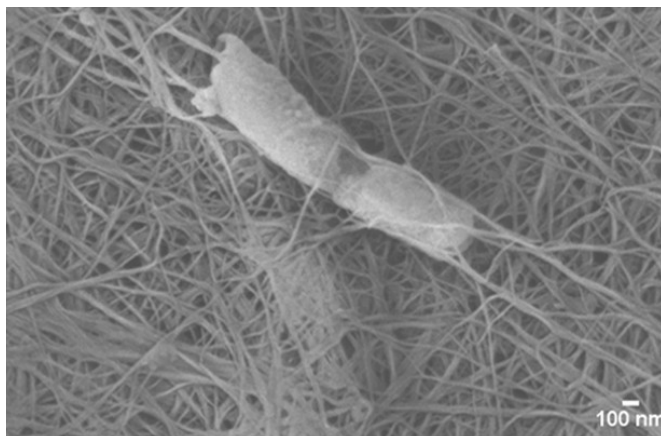
A celulose pode ser extraída de fonte vegetal ou sintetizada por determinados micro-organismos, entre eles bactérias *Komagataeibacter*, *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Alcaligene*, *Aerobacter* e *Azotobacter*. Bactérias do gênero *Komagataeibacter* (anteriormente denominadas *Gluconacetobacter/Acetobacter*) têm recebido grande destaque nos últimos anos, pois são capazes de produzir celulose com maior eficiência devido a sua capacidade de metabolizar uma ampla gama de fontes de carbono e nitrogênio [3, 4, 5, 6].

##### 1.1.1 Celulose Bacteriana (CB)

A CB foi relatada pela primeira vez por Adrian J. Brown em 1886 que identificou a formação de um filme gelatinoso na interface líquido - ar em um caldo de fermentação de vinagre. Esse filme, que descobriu-se mais tarde ter sido produzido pela bactéria *Gluconacetobacter xylinus* [atualmente denominada *Komagataeibacter xylinus* (*K. xylinus*)], apresentava composição química idêntica à celulose vegetal [7, 8].

A CB é produzida entre a membrana citoplasmática e a membrana externa das bactérias por meio de fermentação oxidativa em meio rico em carboidratos. Essas bactérias promovem a oxidação dos carboidratos sob condições aeróbicas, produzindo, além da celulose, ácido acético [7, 8]. Acredita-se que a produção de celulose seja um mecanismo de defesa bacteriana, servindo como uma barreira física que fornece proteção contra os efeitos danoso da radiação ultravioleta [9].

Dentre as cepas produtoras de celulose, a *K. xylinus* (**Fig. 1**) se destaca como a mais eficiente em meio líquido. Trata-se de uma bactéria Gram-negativa não-patogênica que apresenta formato de bastonete, cuja produção ótima de celulose se dá entre 25 – 30 °C e pH entre 3-7 [7, 8].

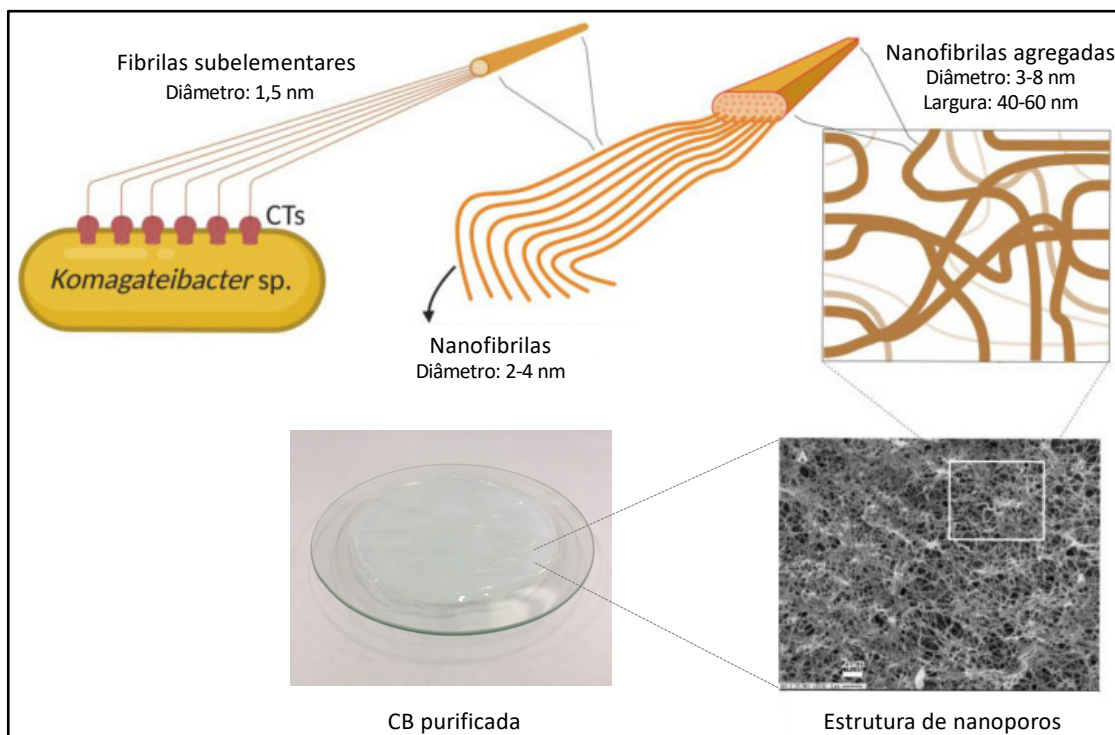


**Figura 1.** Imagem de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) da bactéria *K. xylinus* sob a superfície da membrana de celulose por ela produzida

**Fonte:** Basu A. et al. (2018) [10]

### **1.1.2 Mecanismos Bioquímicos e Moleculares da Biossíntese de CB por *Komagataeibacter Xylinus***

A via biossintética da CB começa com a polimerização de moléculas de glicose em cadeias  $\beta(1-4)$ -glucanas, a qual é catalisada pela celulose sintase, seguida pela excreção das cadeias através de complexos terminais presentes na membrana celular da bactéria. As cadeias formadas se arranjam linearmente e se cristalizam através de ligações de hidrogênio e forças de Van der Waals, formando fibrilas subelementares de aproximadamente 1,5 nm de diâmetro que se associam e formam nanofibrilas de 2-4 nm de diâmetro. Por fim, as nanofibrilas se organizam em estruturas nanofibrilares de 3-8 nm de diâmetro e de até 60 nm de comprimento [11, 12]. Essas nanoestruturas se entrelaçam aleatoriamente, formando uma rede de nanoporos [12] (**Fig. 2**).



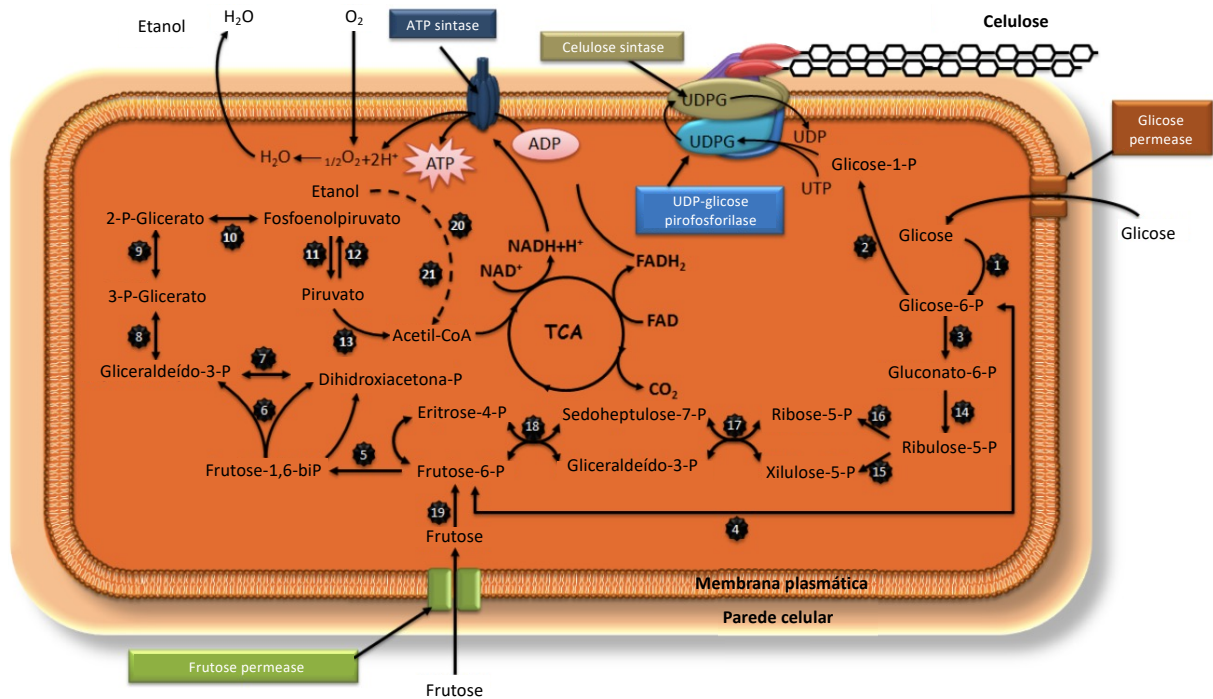
**Figura 2.** Representação esquemática da extrusão de cadeias glucanas e formação da CB

**Fonte:** Horue M. et al. (2023) [12] (Adaptado)

A produção da CB por *K. xylinus* ocorre via ciclo das pentoses e ciclo de Krebs. Quando a glicose é usada como substrato, essa molécula é inicialmente transportada do meio externo para o citoplasma e a síntese da celulose é catalisada por quatro enzimas bacterianas, da seguinte maneira: i) o carbono 6 da glicose é fosforilado pela glucoquinase, originando a glicose-6-fosfato; ii) a fosfoglucomutase catalisa a reação de isomerização da glicose-6-fosfato em glicose-1-fosfato; iii) a UDPG-pirofosforilase converte a glicose-1-fosfato em uridina 5'-difosfato glicose (UDP-glicose); iv) a UDP-glicose é polimerizada em celulose pela ação da celulose sintase [11, 13] (**Fig. 3**). Quando dissacarídeos, como a sacarose e maltose, são usados como as fontes de carbono, a biossíntese se inicia com a hidrólise desses dissacarídeos em monossacarídeos, como a glicose e a frutose [13].

A síntese da celulose também pode ocorrer a partir de fontes endógenas. Nesse caso, o processo tem início com a transformação do oxaloacetato em piruvato pela ação da enzima piruvato carboxilase. Em seguida, o piruvato é transformado em fosfoenolpiruvado pela ação da enzima fosfoenolpiruvato carboxiquinase. A síntese de celulose pela bactéria é dispendiosa para a célula, consumindo cerca de 10% da energia proveniente das reações catabólicas relacionadas ao metabolismo

bacteriano. Assim, a energia utilizada para a síntese da CB provém do metabolismo aeróbio [11].

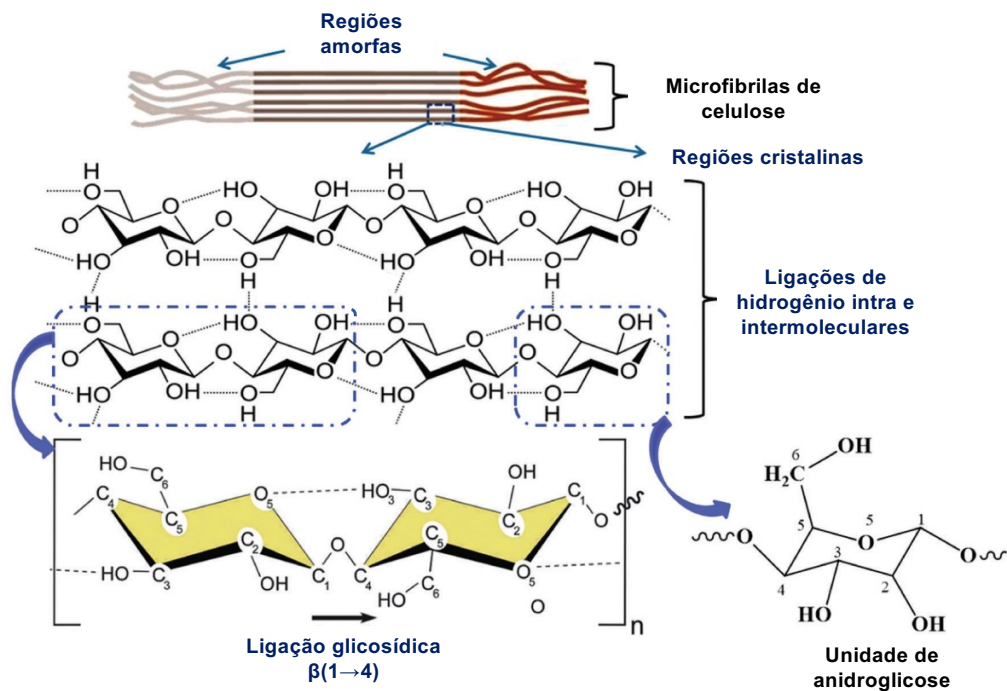


**Figura 3.** Representação esquemática da via metabólica de produção de celulose por *K. xylinus*

Fonte: Lustri W. R. et al. (2015) [11] (Adaptado)

### 1.1.3 Características e Propriedades da CB

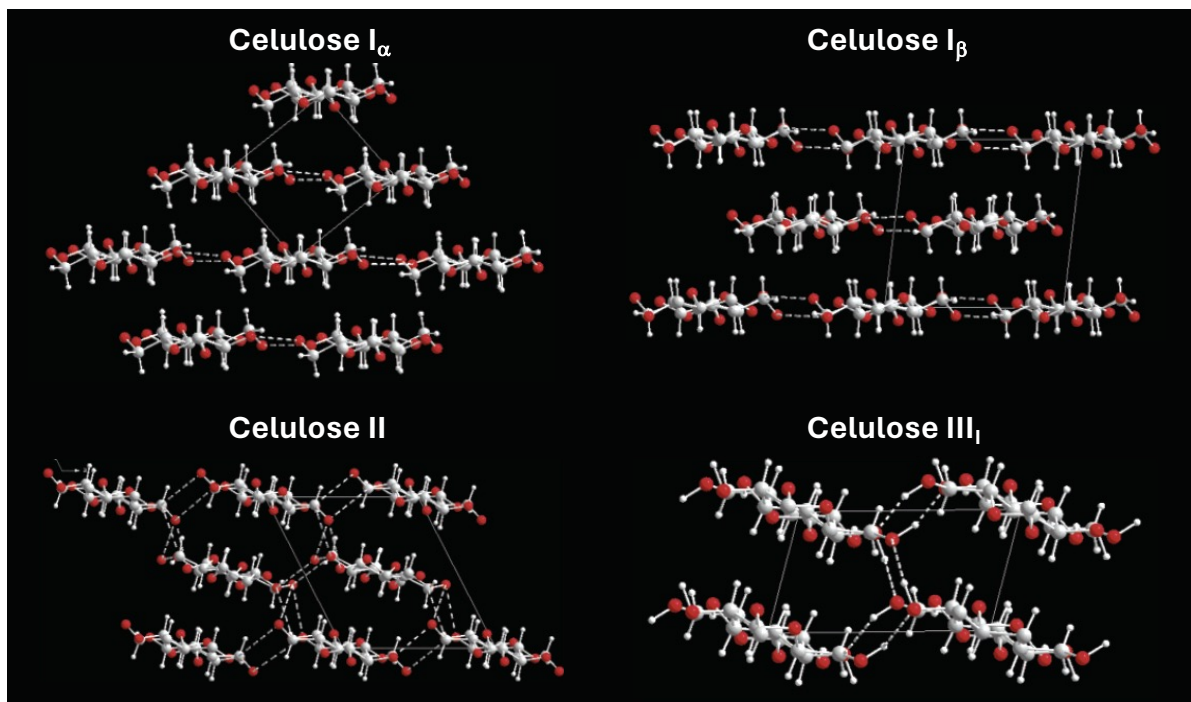
A CB é constituída por uma rede tridimensional de nanofibras de celulose firmemente compactadas de até 100 nm de comprimento e de 2-4 nm de diâmetro, composta por domínios ordenados (cristalinos) alternados com regiões desordenadas (amorfas), apresentando elevada cristalinidade (entre 70 e 89%) [4, 14, 15, 16]. A celulose é formada por moléculas de glicose unidas por ligações  $\beta$ -1,4-glicosídicas e apresenta três grupos hidroxila acessíveis por unidade de glicose [17], os quais interagem entre si por meio de ligações de hidrogênio intramoleculares e intermoleculares, que conferem rigidez à cadeia [18] e resultam em diferentes formas cristalinas. A celulose conta ainda com interações hidrofóbicas e de van der Waals, formando cadeias paralelas [18] (**Fig. 4**).



**Figura 4.** Porções amorfas e cristalinas das nanofibras de CB, ligações de hidrogênio intermoleculares e intramoleculares (linhas pontilhadas) e numeração dos carbonos da unidade de glicose formadora do biopolímero

**Fonte:** ISLAM, M. S. et al. (2018) [15] (Adaptado)

A estrutura cristalina da celulose apresenta quatro diferentes formas polimórficas: celulose tipo I, II, III e IV (**Fig. 5**). A celulose tipo I é a forma mais abundante encontrada na natureza e consiste de dois tipos de estruturas cristalinas: estrutura triclínica ( $I_\alpha$ ) e estrutura monoclínica ( $I_\beta$ ), que coexistem e cujas proporções dependem da origem da celulose. A celulose  $I_\alpha$  é a forma cristalina majoritária produzida por bactérias e algas enquanto a celulose  $I_\beta$  é o polímero predominante em plantas superiores. A celulose  $I_\alpha$  pode ser irreversivelmente convertida em celulose  $I_\beta$  quando submetida a tratamento hidrotérmico alcalino, o que sugere que o polímero  $I_\beta$  é termodinamicamente mais estável do que o  $I_\alpha$ . Dado que a estrutura cristalina da celulose I é termodinamicamente metaestável, ela pode ser convertida em celulose II ou III em função de tratamento químico e térmico [19, 20].



**Figura 5.** Estruturas cristalinas da celulose I<sub>α</sub>, I<sub>β</sub>, II e III<sub>i</sub>

Fonte: WADA, M. et al. (2004) (Adaptado) [21]

Entre algumas propriedades da CB, destacam-se sua baixa solubilidade em água e na maioria dos solventes orgânicos, alta resistência à tração (60 – 115 GPa), alto grau de polimerização (7.000 – 16.000 unidades de glicose por macromolécula), moldabilidade *in situ* e alta capacidade de retenção de líquido, sendo capaz de absorver quase 100 vezes sua própria massa em água [7, 22].

Por fim, a CB exibe inúmeras vantagens interessantes, como: *i)* obtenção na forma de nanofibras de celulose pura, *ii)* nanobiomaterial biocompatível, *iii)* não-alérgico, *iv)* biodegradável por enzimas naturalmente presentes na natureza, *v)* *eco-friendly* e *vi)* passível de ser produzida em larga escala por rota biotecnológica [4, 9, 14, 23, 24].

#### 1.1.4 Produção da CB

A produção da CB pode ser realizada utilizando cultivos em meios sólidos e em meios líquidos, em cultura estática ou em cultivo agitado, e em processo de batelada, batelada alimentada ou contínuo. No cultivo estático tradicional, o meio de cultura inoculado leva à formação de um hidrogel de celulose que flutua devido às bolhas de CO<sub>2</sub> aprisionadas na matriz que são geradas pela bactéria durante o processo fermentativo; o cultivo geralmente leva de 5 a 20 dias. Na cultura agitada,



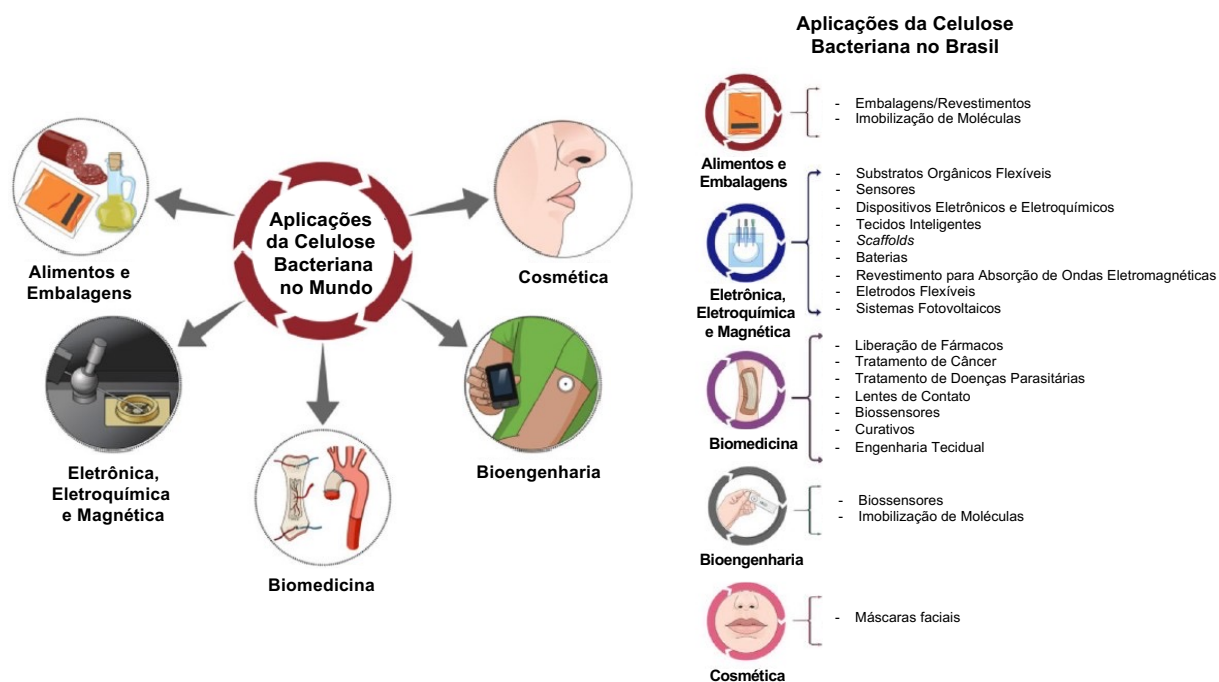
por sua vez, a celulose é produzida sob formas que variam de suspensão fibrosa a esferas e pellets, a depender da velocidade de rotação aplicada [6, 25, 26].

O meio de cultivo convencional utilizado para a produção da CB é o meio Hestrin-Schramm (HS), que contém glicose, peptona e extrato de levedura como fontes de carbono e nitrogênio, além de micro e macro nutrientes [6]. A glicose é usada como fonte de carbono para a produção de celulose. O nitrogênio é fundamental no metabolismo celular, e compreende entre 8 e 14% da massa seca de bactérias [7].

A CB produzida via processo biotecnológico é obtida quimicamente pura, livre de lignina, pectina, hemicelulose e demais subprodutos obtidos junto à celulose advinda de fonte vegetal [3, 14]. Enquanto o tratamento químico da polpa vegetal para obtenção de celulose está associado a um alto consumo de energia e inclui tratamento alcalino e ácido que geram resíduos e contaminantes agressivos ao meio ambiente, o processo de purificação da CB é realizado sob condições brandas, consistindo basicamente do tratamento a quente em meio alcalino diluído [14]. Além requerer um processo de purificação mais simples e de menor demanda energética, tem-se como uma vantagem adicional da celulose produzida por fermentação bacteriana, em comparação com a celulose vegetal, a possibilidade de produção em quaisquer regiões, independente da disponibilidade de recursos vegetais e de condições climáticas favoráveis ao cultivo de plantas fontes de celulose.

#### **1.1.5 Aplicações da CB**

A CB é um biopolímero versátil que encontra aplicação nas mais diversas áreas: i) na indústria alimentícia como aditivos de baixa caloria, na produção de embalagens e como estabilizante [6], ii) na indústria eletrônica como substrato para OLEDs (Diodo Emissor de Luz Orgânica, do inglês *Organic Light-Emitting Diode*) e dispositivos eletrônicos [27], iii) na área biomédica como curativo no tratamento de pele injuriada por queimaduras, feridas e úlceras e em sistemas de *drug delivery* [24], iv) na bioengenharia como substrato para sensores e imobilização de moléculas [9] e v) na indústria cosmética como máscaras faciais [28] (**Fig. 6**).



**Figura 6.** Principais aplicações da CB no Brasil e no mundo.

**Fonte:** Marestoni L. D. et al. (2020) [9] (Adaptado)

Particularmente, a indústria de curativos de CB gera grande quantidade de retalhos desse material durante a etapa de corte do processo produtivo, que é normalmente descartada. Entretanto, essa biomassa pode ser utilizada como fonte de celulose pura [29], o que contribui para o reaproveitamento e conversão dos resíduos dessas indústrias em produtos de alto valor agregado. Tal abordagem é explorada no presente trabalho e busca reciclar um material subutilizado de operações industriais para a extração de nanocristais de celulose (CNCs).

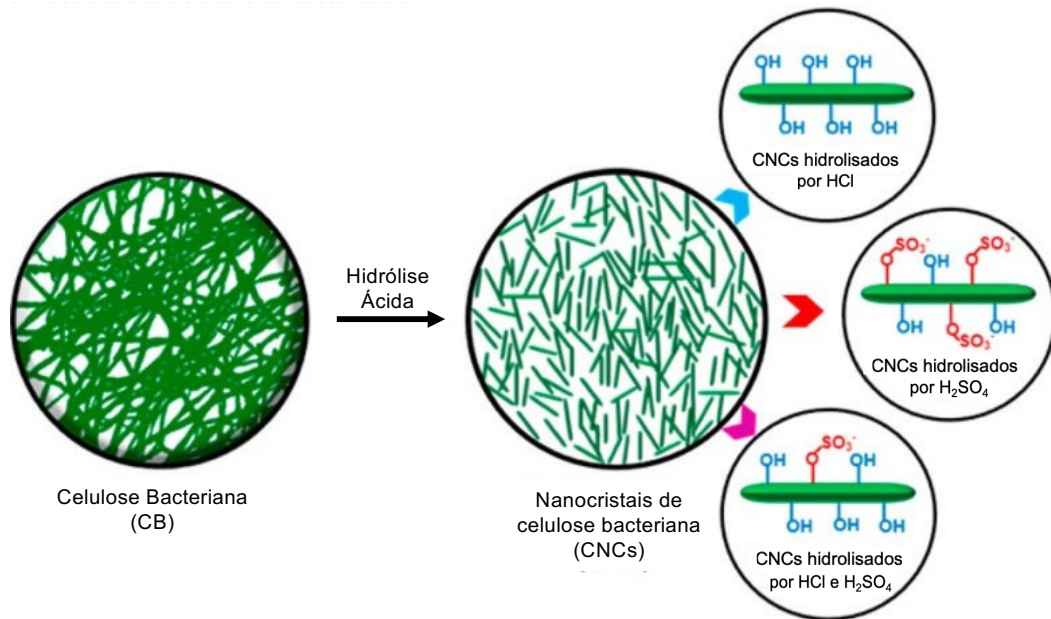
Além de ser utilizada em sua forma nativa, a CB pode ser empregada na produção de compósitos poliméricos, quer seja como matriz polimérica, quer seja como fonte de nanocelulose para atuar como agente de reforço. Nesse sentido, os CNCs são amplamente empregados por seu potencial em conferir melhorias nas propriedades mecânicas (aumento na resistência à tração e módulo de elasticidade) de matrizes poliméricas. Isso se deve principalmente às propriedades físicas singulares dos CNCs e à abundância de grupos hidroxila em sua superfície [30].

## 1.2 Nanocristais de CB Obtidos por Hidrólise Ácida: Propriedades e Aspectos Gerais

Os domínios cristalinos da CB podem ser extraídos por meio da desintegração das nanofibras por processos mecânicos, químicos ou enzimáticos, ou por meio de suas combinações, produzindo CNCs [15]. A depender da fonte de celulose e do método de preparação, CNCs com diferentes razão de aspecto (comprimento/diâmetro), cristalinidade e morfologia podem ser obtidos, apresentando propriedades distintas.

O principal processo de obtenção dos CNCs é baseado na hidrólise ácida. Neste processo do tipo *top-down*, as ligações glicosídicas das cadeias de celulose presentes nas regiões amorfas, mais acessíveis e suscetíveis a ataques químicos e biológicos, são clivadas, liberando os cristalitos individuais em forma de agulha ou bastão [15].

Diferentes ácidos ou mistura de ácidos podem ser empregados na extração dos CNCs, incluindo ácido sulfúrico, clorídrico, fosfórico, hexanoico e cítrico [31, 32]. Ácidos são extensivamente empregados na obtenção de CNCs negativamente carregados e neutros [33] (**Fig 7**). No entanto, o ácido sulfúrico é o mais comumente empregado devido a maior estabilidade coloidal da suspensão obtida [31]. Neste caso, o ácido sulfúrico reage com os grupos hidroxilas dos CNCs, produzindo superfícies negativamente carregadas com grupo sulfonato ( $-\text{SO}_3^-$ ). A repulsão eletrostática entre os CNCs carregados negativamente gera uma dispersão bastante uniforme e estável [15, 33].



**Figura 7.** CNCs produzidos a partir de CB por hidrólise ácida com diferentes tipos de ácidos

**Fonte:** Singhsa P. et al. (2017) [34] (Adaptado)

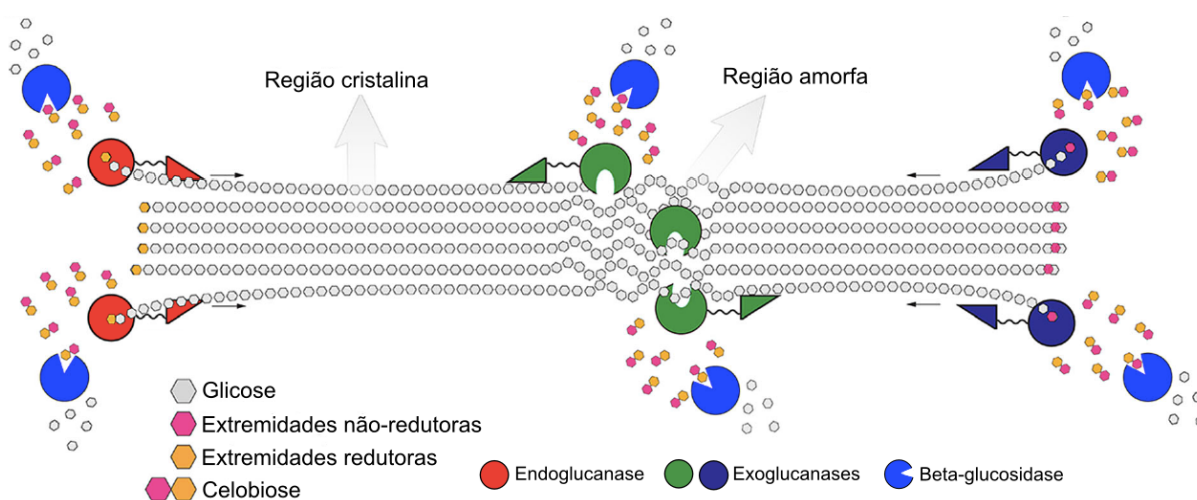
Assim como a CB, os CNCs são biocompatíveis, biodegradáveis e termicamente estáveis. As dimensões dos CNCs dependem do tratamento empregado e da fonte de celulose e geralmente variam de 2-50 nm de largura e 50-2000 nm de comprimento [15, 35]. Devido ao caráter nanométrico, os CNCs têm uma grande área de superfície relativa, de 150-250 m<sup>2</sup> g<sup>-1</sup>. Apresentam excelentes propriedades mecânicas, com módulo de elasticidade de 110-220 GPa e resistência à tração de 7,5-7,7 GPa [15]. Ainda, a química de superfície dos CNCs pode ser modificada pela adoção de diferentes estratégias sintéticas no processo de extração [31] bem como por reações de oxidação, esterificação, eterificação, sililação, carbamilação, amidação e *grafting* [36].

Embora a hidrólise com ácido sulfúrico seja a forma mais clássica e comercialmente empregada de obter CNCs, a presença de grupos sulfonatos na superfície dos CNCs diminuem a estabilidade térmica da celulose. Além disso, esse tratamento diminui o grau de polimerização, interferindo negativamente na resistência mecânica que os CNCs promovem enquanto agentes de reforço em compósitos. Por esta razão, o emprego de novos métodos de extração de CNCs que mantenham as propriedades intrínsecas da celulose mostram-se relevantes [33].

### 1.3 Nanocristais de Celulose Bacteriana Obtidos por Hidrólise Enzimática: Propriedades e Aspectos Gerais

A aplicação de práticas de química verde na síntese de nanopartículas é uma temática emergente em relação à sustentabilidade. As abordagens nesse campo envolvem especialmente rotas alternativas, mais seguras e que gerem menor quantidade de resíduos tóxicos [37]. Nesse sentido, a hidrólise enzimática empregada na obtenção de CNCs que utiliza água como solvente e não gera resíduos tóxicos é uma rota sintética ambientalmente ecológica com menor impacto ambiental.

A hidrólise enzimática ocorre na presença de celulases e se dá em domínios amorfos com falhas estruturais relativamente grandes. Celulases são um complexo enzimático constituído por três enzimas que atuam sinergeticamente ao romper ligações glicosídicas do tipo  $\beta$ -1,4 de microfibrilas da celulose: as endo- $\beta$ -1,4-glicanases, que hidrolisam as ligações glicosídicas aleatoriamente em regiões amorfas das fibras da celulose, criando fragmentos menores; as exo- $\beta$ -1,4-glicanases, que agem nas extremidades das cadeias gerados pela ação das endoglicanases, liberando celobiose; e as  $\beta$ -1,4-glicosidases que convertem os oligossacarídeos gerados em glicose [33, 38, 39] (**Fig. 8**).



**Figura 8.** Mecanismo de ação das celulases

**Fonte:** Pirich C. L. et al. (2020) [39] (Adaptado)

Devido a especificidade das enzimas, a hidrólise enzimática é mais seletiva a algumas regiões específicas nas fibras celulósicas. Portanto, ajustando as condições

reacionais, a taxa de hidrólise da celulose pode ser controlada, bem como a morfologia dos CNCs [40].

A metodologia e as condições reacionais aplicadas na produção dos CNCs afetam propriedades como morfologia, tamanho médio, distribuição de tamanho, estrutura e grau de cristalinidade das partículas. A **Tabela 1** a seguir exhibe as principais propriedades de CNCs extraídos a partir de CB por rotas ácida e enzimática de acordo com a literatura recente.

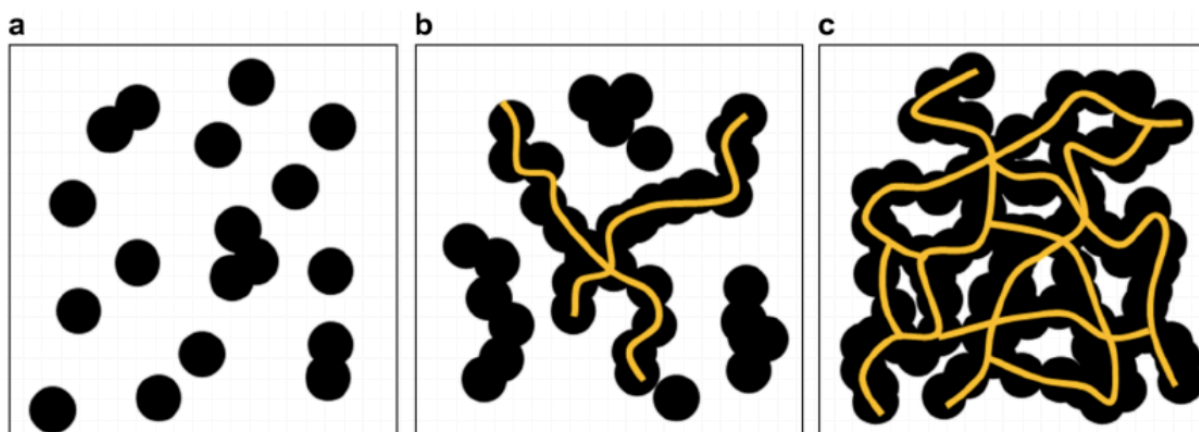
**Tabela 1.** Fontes de CB e rotas de produção empregadas na produção de CNCs e suas principais propriedades

Fonte	Rota de Produção	Morfologia	Tamanho (nm)	Cristalinidade (%)	Potencial Zeta (mV)	Referência
<i>K. xylinus</i>	Ácido sulfúrico	Agulhas	Comprimento 20 – 2500	86 – 91	NR	Lima, LR et al. (2015) [41]
CB (cepa NR)	i. Ácido sulfúrico	Agulhas	Comprimento 200 – 2100 Largura 16 – 50	i. 22 – 92	i. -53.6 – -24.7	Vasconcelos, NF et al. (2017) [42]
	ii. Ácido sulfúrico/ clorídrico			ii. 83	ii. -43.9	
<i>K. xylinus</i>	i. Ácido sulfúrico	Esferas	Comprimento 100 – 700 Largura 10 – 30	i. 85 – 89	i. -32.4 – -30.9	Singhsa, P, Ravin N, Manuspiya H (2017) [34]
	ii. Ácido clorídrico			ii. 86 – 88	ii. -11.0	
	iii. Ácido sulfúrico/ clorídrico			iii. 87 – 89	iii. -22.0	
<i>K. sucrofermentans</i> DSM 15973	Enzimática	Agulhas	Comprimento 200 – 800 Largura ~6	NR	NR	Rovera, C et al. (2018) [43]
<i>K. hansenii</i> (ATCC 23769)	Enzimática	Indefinida	NR	NR	NR	Brandes, R et al. (2019) [44]
<i>K. xylinus</i>	i. Ácido sulfúrico	Agulhas	Comprimento 831 – 1232 Largura 18 – 22	i. 71 – 87	i. -24.6 – -13.1	Arserim-Uçar, DK et al. (2020) [45]
	ii. Ácido clorídrico			ii. 86 – 91	ii. -6.0 – -3.2	
<i>K. xylinus</i>	Ácido sulfúrico	Agulhas	Comprimento 120 ± 31 Largura 13 ± 3	88	-45 ± 4	Melo, PTS et al. (2020) [29]
<i>K. xylinus</i> (ATCC 53,582)	Enzimática	Indefinida	37 – 242	NR	+15	Soeiro, VS et al. (2021) [46]
CB (cepa NR)	i. Ácido sulfúrico	Esferas/Agulhas	i. Comprimento 200 – 570 Largura ~22	NR	NR	Carullo, D et al. (2023) [47]
	ii. Ácido clorídrico					

NR: não reportado

#### 1.4 Nanocristais de Celulose Bacteriana como Agente de Reforço em Matrizes Poliméricas

O conceito de usar CNCs como reforço originou-se de suas propriedades físicas distintas, como baixa densidade ( $1,5-1,6 \text{ g/cm}^3$ ), alto módulo de elasticidade, alta área superficial relativa, alta razão de aspecto ( $\sim 10-70$ ) e superfície rica em grupos hidroxila que tem o potencial de formar uma rede de percolação em compósitos [48, 49]. O fenômeno de percolação é um dos grandes responsáveis pelo reforço produzido pela adição de CNCs em baixos níveis de carga em diversos polímeros [48], sendo resultante das fortes interações (ligações de hidrogênio) entre os CNCs e da grande proximidade entre eles [50]. Ainda, a possibilidade de modificação da superfície dos CNCs é uma estratégia amplamente empregada com a finalidade de melhorar sua interação com diferentes matrizes poliméricas, o que viabiliza a produção de diferentes tipos de nanocompósitos reforçados com CNCs [51, 52, 53]. A **Fig. 9** ilustra o fenômeno de percolação na estrutura de um nanocompósito polimérico.



**Figura 9.** Esquemas de limiares de percolação em compósitos nanopartículas/matriz polimérica: Nanopartículas (a) desconectadas, (b) parcialmente conectadas e (c) totalmente conectadas

**Fonte:** Choi H. J. et al. (2019) [54]

Compósitos são materiais formados por duas ou mais fases que exibem propriedades de todas as fases que os constituem [55]. Nanocompósitos, por sua vez, são uma classe de materiais compósitos multifásicos no qual pelo menos uma de suas fases possui dimensões na escala nanométrica ( $1 \text{ nm} = 10^{-9} \text{ m}$ ). A estrutura dos nanocompósitos geralmente consiste em uma matriz contendo reforços ou cargas [56]. Nesse contexto, as dimensões nanométricas dos CNCs permitem a

produção de filmes nanocompósitos reforçados com excelente transmitância de luz visível [57].

Nanocompósitos reforçados com CNCs geralmente exibem melhorias nas propriedades térmicas, mecânicas e de barreira quando comparados à matriz pura ou aos compósitos convencionais, mesmo com baixas cargas de CNCs [50].

Uma das mais atrativas propriedades dos CNCs é seu elevado valor de módulo de elasticidade. A **Tabela 2** a seguir apresenta valores de módulo de elasticidade e resistência à tração dos CNCS e de algumas cargas comumente utilizadas na produção de nanocompósitos. Os valores indicam que o emprego dos CNCs enquanto agente de reforço mostra-se como uma excelente alternativa a outras cargas mais convencionais.

**Tabela 2.** Valores de resistência à tração e módulo de elasticidade de algumas cargas utilizadas como reforço de matrizes poliméricas

Fonte: Durán N. (2011) [58]

<b>Material</b>	<b>Resistência à Tração (GPa)</b>	<b>Módulo de Elasticidade (GPa)</b>
Nanowhiskers de celulose	7,5	150
Nanofibras de celulose	~10	~100
Fibra de vidro	4,8	86
Kevlar	3,8	130
Nanotubos de carbono	11-73	270-970

A literatura apresenta um vasto número de estudos envolvendo o emprego de CNCs como agente de reforço no desenvolvimento de nanocompósitos poliméricos. Em 2014, Silvério e colaboradores [50] desenvolveram nanocompósitos de metilcelulose/CNCs extraídos de casca de soja. Em comparação com o filme de metilcelulose puro, foram observadas melhorias nas propriedades mecânicas e de barreira, enquanto a estabilidade térmica foi mantida. Particularmente, houve uma melhoria de 119,7% no módulo de armazenamento (característica da compactação do material) dos nanocompósitos quando 8% de CNCs foram incorporados à matriz. Em um trabalho mais recente de 2019, Shi e colaboradores [59] prepararam filmes de etilcelulose reforçados com CNCs extraídos do caule da planta de tabaco e modificados por óleo de soja epoxidado, um plastificante. Nesse estudo, foi



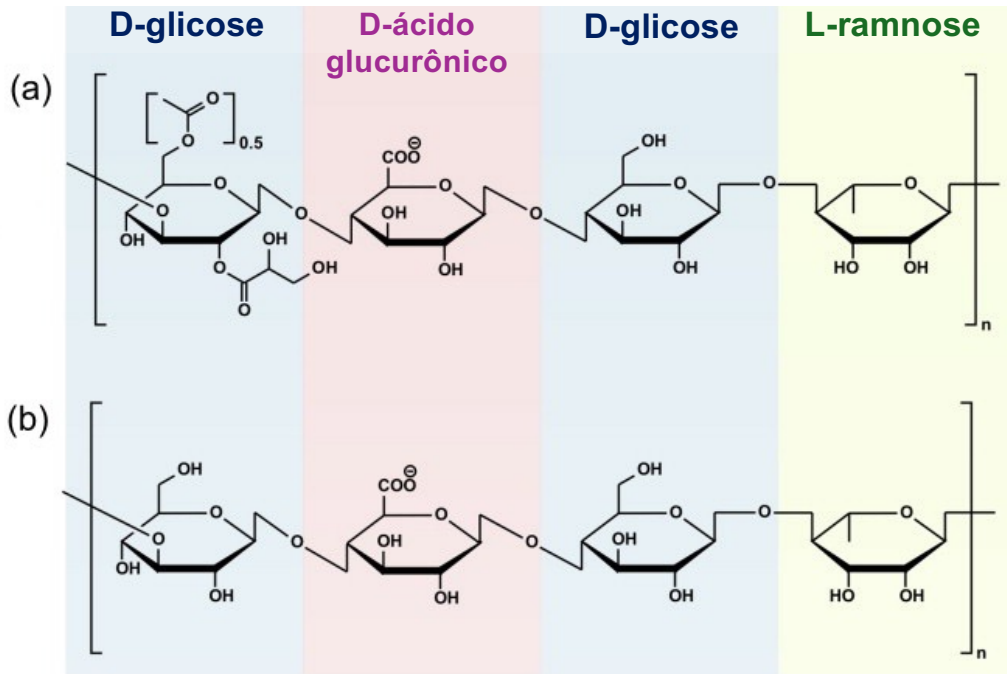
constatado que com adição de 4 partes por cem de borracha (phr, do inglês *parts per hundred of rubber*) de CNCs modificados, a resistência à tração do filme nanocompósito mostrou-se cerca de duas vezes maior em relação ao filme de etilcelulose plastificado, e, ainda, a estabilidade térmica do filme nanocompósito mostrou-se maior.

Mais recentemente, grande destaque tem sido dado a trabalhos em consonância com os preceitos da química verde de reaproveitamento e reciclagem de materiais e que visam a substituição de substratos derivados do petróleo por materiais renováveis e biodegradáveis. Nessa perspectiva, Melo e colaboradores [29] exploraram o emprego de sobras de biocurativos de CB resultantes de operações industriais de corte na extração de CNCs para a produção de filmes de hidroxipropilmetilcelulose reforçados com CNCs. Os materiais produzidos e reforçados com apenas 5% (m/m) de CNCs se mostraram transparentes e apresentaram maior resistência à tração (de  $61 \pm 6$  para  $86 \pm 9$  MPa) e módulo de elasticidade (de  $1,5 \pm 0,2$  a  $2,7 \pm 0,4$  GPa) e menor permeabilidade ao vapor de água (de  $0,40 \pm 0,02$  a  $0,31 \pm 0,01$  g mm h<sup>-1</sup> m<sup>-2</sup> kPa<sup>-1</sup>). Esse trabalho pioneiro abre caminho para a produção mais sustentável de CNCs através do uso integral de biomassa.

### **1.5 Matriz Polimérica de Goma Gelana Reforçada com Celulose**

A goma gelana (GG) é um polissacarídeo aniônico linear produzido por fermentação aeróbica de bactérias Gram-negativas do gênero *Sphingomonas*, notadamente por *S. elodea* e por *S. paucimobilis* em menor rendimento [60, 61]. A cadeia linear da GG é formada por duas unidades de β-D-glicose, uma unidade de β-D-ácido glucurônico e uma unidade de α-L-ramnose na proporção molar de 2:1:1 [60, 62]. A GG possui dois grupos acila, acetato e glicerato, ligados ao resíduo de glicose adjacente ao de ácido glucurônico. Esses grupos acila podem ser totalmente removidos durante o processo de produção da GG por tratamento alcalino, de forma a se obter a GG desacetilada. Atualmente, a obtenção comercial de GG parcialmente desacetilada também é possível pelo emprego de métodos mais brandos de extração [60, 63]. Ainda, subprodutos como proteínas e outros compostos orgânicos produzidos durante o processo fermentativo podem também

ser removidos por filtração ou centrifugação [60]. A estrutura química da GG altamente acetilada e parcialmente desacetilada está ilustrada na **Fig. 10**.

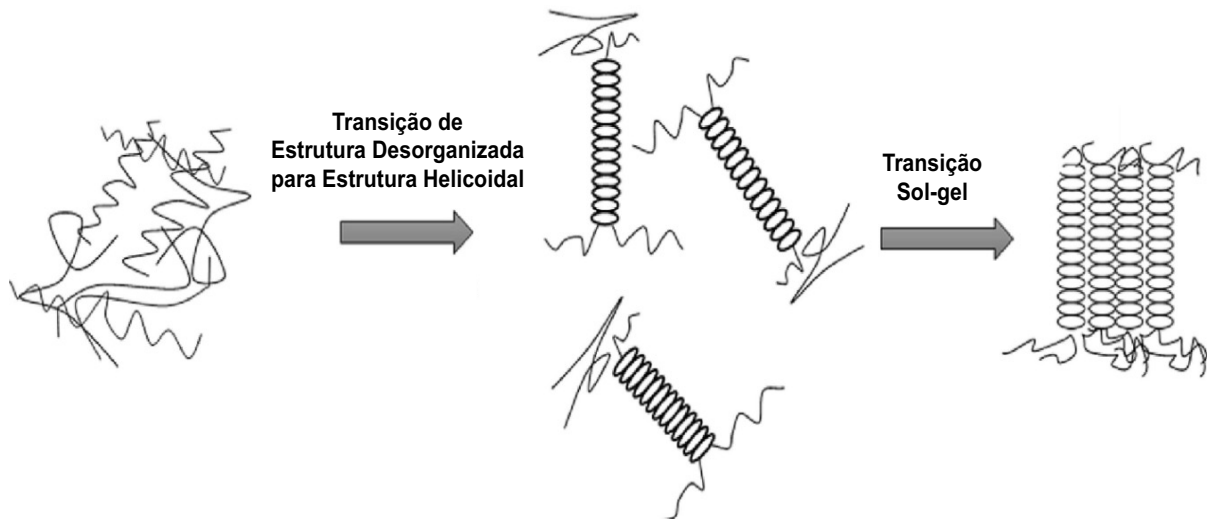


**Figura 10.** Estrutura química da goma gelana (a) altamente acetilada e (b) parcialmente desacetilada

**Fonte:** Osmalek T. et al. (2014) [62] (Adaptado)

Por ser um polímero aniônico, ambos os tipos de GG, altamente acetilada e parcialmente desacetilada, tem a capacidade de formar géis; a presença de cátions monovalentes, bivalentes e trivalentes favorece o processo de gelificação [60, 62]. A quantidade de grupos acila tem grande influencia nas características do filme produzido, notadamente na flexibilidade e na transparência [60]. A capacidade de gelificação da GG depende de sua concentração no meio, da presença e do tipo de cátion, do pH e da temperatura da solução [60, 61, 64]

O mecanismo de espessamento/gelificação da GG é termo-reversível. Em meio mais diluído e sob aquecimento, as cadeias poliméricas da GG se movimentam livremente. A medida que o meio sofre resfriamento, as cadeias poliméricas passam a se ordenar em estruturas helicoidais, as quais, posteriormente, se organizam em um retículo tridimensional de dupla-hélice [60, 64, 65], conforme mostra a **Fig. 11**.



**Figura 11.** Processo de gelificação da GG

**Fonte:** Gomes D. et al. (2023) [64] (Adaptado)

A presença dos grupos acila prejudica a formação das zonas de junção das cadeias poliméricas por impedimento estérico, limitando a homogeneidade do sistema gelificado [65]. Desse modo, filmes de GG acetilada tendem a ser flexíveis, enquanto filmes de GG desacetilada apresentam maior ordenamento conformacional e apresentam-se mais rígidos e quebradiços [60, 62, 65].

A GG é uma matéria-prima renovável, atóxica, biocompatível e biodegradável. Este biopolímero é largamente empregado na indústria alimentícia como espessante, componente de textura e no melhoramento das propriedades organolépticas dos alimentos, tendo sido aprovada para uso em alimentos pelo FDA (*Food and Drug Administration*) em 1992 [60, 64]. Devido a flexibilidade e dureza ajustáveis dos géis e filmes de GG, sua alta transmitância e por ser facilmente combinada com outras gomas/polímeros, materiais com propriedades intermediárias tem sido obtidos, ampliando o campo de aplicações da GG [60, 61]. Na área médica e farmacêutica, a GG tem sido explorada na engenharia tecidual na produção de *scaffolds* e hidrogéis e em sistemas de liberação de fármacos na forma de micro e nanopartículas [64]. Na área da biotecnologia, a GG tem sido empregada na produção de meios de cultura sólidos como substituto do ágar [60, 64]. Embora um estudo tenha explorado o emprego de CNCs como agente de reforço em hidrogel de GG [66], não há publicações que tenham investigado o emprego e a eficácia de CNCs com propriedades e morfologias diferentes como agente de reforço em filmes de GG.

## **2. Objetivos do Trabalho**

O objetivo deste estudo consistiu em avaliar a eficiência de nanocristais de celulose extraídos a partir de resíduos industriais de CB por rotas ácida e enzimática como agentes de reforço em matriz polimérica de GG, a qual foi empregada como modelo neste estudo.

## Capítulo 2

### Produção e Caracterização de Celulose Bacteriana e Celulose Bacteriana Micronizada para Extração de Nanocristais

#### 1. Resumo do Capítulo

A CB é um biopolímero sintetizado por diversas espécies de bactérias através de processos de fermentação na presença de fontes de carbono, nitrogênio e micronutrientes. A CB é geralmente produzida em cultivo estático na forma de filmes de nanofibras de celulose altamente puras e interconectadas. Embora sintetizada na forma de hidrogel, geralmente a CB é desidratada e empregada na forma de um filme resistente e flexível. Dado que a produção da CB envolve um elevado custo, o reaproveitamento de toda a biomassa de celulose é fundamental para aumentar a viabilidade comercial dos processos produtivos nas indústrias desse ramo biotecnológico. Nesse contexto, retalhos de CB que seriam descartados, foram cedidos pela indústria de curativos. De posse desse material, objetivou-se caracterizá-lo e submeter parte desses retalhos a um processo mecanoquímico de moagem em moinho de bolas para posterior utilização desses materiais na produção de CNCs. Tanto os retalhos de CB como o material micronizado foram caracterizados quanto aos aspectos morfológicos por MEV e AFM e estruturalmente por FTIR e DRX. As propriedades térmicas e o impacto da moagem no grau de polimerização do material também foram avaliados. A moagem dos retalhos de CB levou à formação de partículas com dimensões micro e nanométricas. Embora a estrutura química tenha se mantido a mesma após a micronização, o processamento mecânico causou um aumento no ICr de cerca de 8% e uma diminuição no GP (de 1576 para 1388) e na estabilidade térmica da CB, com diminuição de  $T_{\text{pico}}$  em 11 °C.

## **2. Objetivos**

Obter e caracterizar os materiais de partida utilizados na obtenção dos CNCs:

- i. Aparas de CB, material subutilizado de operações industriais, a serem empregados na hidrólise ácida
- ii. CB processada em moinho de bolas a serem empregados na hidrólise enzimática dada a necessidade de se facilitar o acesso das enzimas aos domínios amorfos da celulose

A caracterização dos substratos incluem as seguintes técnicas: Microscopia de Força Atômica, Microscopia Eletrônica de Varredura, Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier, Difratomia de Raios-X, Análise Termogravimétrica e determinação do grau de polimerização.

### **3. Materiais e Métodos**

#### **3.1 Membranas de Celulose Bacteriana**

Retalhos de membranas de CB resultantes de operações de corte para produção comercial de curativos foram gentilmente cedidos pela empresa BioSmart Nanotechnology LDTA.

#### **3.2 Preparo da Celulose Micronizada**

As aparas de curativos de CB foram moídas em um moinho de bolas (Impact Grinder, Polymix PX-IG 2000, Kinematica) durante 20 minutos na frequência de 10Hz, tendo-se obtido um pó de baixa granulometria. A amostra de CB micronizada foi nomeada como MicroCell.

#### **3.3 Microscopia de Força Atômica**

A análise de microscopia de força atômica (AFM, do inglês *Atomic Force Microscopy*) foi realizada em parceria com a Anton Paar Brasil com o microscópio TOSCA 400 com mesa de isolamento ativo de vibração para bancadas. Utilizou-se o modo *tapping* e *cantilever* tipo *Arrow™ NCR* da Nanoworld.

#### **3.4 Microscopia Eletrônica de Varredura**

A caracterização morfológica das amostras por meio da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) de Alta Resolução com Emissão por Campo foi realizada no microscópio eletrônico *Jeol JSM 7500F* com aceleração de voltagem de 2,00 kV. As amostras foram acomodadas em *stub* de latão com o auxílio de fita dupla face de carbono e recobertas com carbono no metalizador *Bal-Tec SCD 050 Sputter Coater*.

#### **3.5 Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier por Reflectância Total Atenuada**

A espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier no modo de reflexão total atenuada (FTIR-ATR) foi realizada no espectrofotômetro Bruker-Vertex 70 empregando-se 64 varreduras na faixa de absorção de 4000-650  $\text{cm}^{-1}$  com resolução de 2  $\text{cm}^{-1}$ .

### 3.6 Difração de Raios-X

Os materiais foram analisados pela técnica de difração de raios-X com um difratômetro Shimadzu XRD-6000 operando com radiação  $\text{CuK}\alpha$  ( $\lambda = 1,54148 \text{ \AA}$ ) a uma tensão de 40 kV e corrente de 40 mA no intervalo angular de  $2\theta$  entre 5 e  $40^\circ$ , velocidade de varredura de  $2^\circ\text{min}^{-1}$  e passo angular de  $0,02^\circ$ . O índice de cristalinidade relativo (ICr) dos materiais foram determinados a partir do método de Segal [67] com o auxílio do software *Origin 8.0*.

O cálculo do ICr pelo método de Segal foi realizado conforme a equação a seguir:

$$\text{ICr} = \left( \frac{I_{200} - I_{\text{am}}}{I_{200}} \right) \times 100$$

Onde  $I_{200}$  = intensidade máxima de difração do pico referente ao plano (200) em  $2\theta = 22,8^\circ$  relativo às regiões cristalinas e amorfas, e  $I_{\text{am}}$  = intensidade de difração em  $2\theta = 18^\circ$  relativo apenas à região amorfa.

### 3.7 Determinação do Grau de Polimerização Médio das Amostras de Celulose

Determinou-se o grau de polimerização (GP) da celulose através da viscosimetria. Secou-se a celulose a  $105^\circ\text{C}$  até massa constante. Pesou-se 0,125 g de celulose e transferiu-se para um Erlenmeyer. Com o auxílio de uma bureta, adicionou-se 12,5 mL de água destilada e colou-se o sistema em agitação orbital a 400 rpm sob atmosfera de nitrogênio até completa desagregação (cerca de 1 minuto). Com o auxílio da bureta, adicionou-se ao sistema 12,5 mL de etilenodiamina cúprica  $1 \text{ molL}^{-1}$  (N. ONU 1604, Lote 90454, Dinâmica Química Contemporânea Ltda.), obtendo-se uma solução  $0,5 \text{ molL}^{-1}$  de Cu. Colocou-se novamente o sistema em agitação orbital a 400 rpm sob atmosfera de nitrogênio por mais 2 horas. Adicionou-se 7mL da solução preparada ao viscosímetro capilar manual (Cannon-Fenske de fluxo direto N. 150, Special Glass) e manteve-se o sistema em banho termo estatizado a  $25^\circ\text{C}$  por 5 minutos. Feito isso, determinou-se o tempo de fluxo das soluções e do branco em triplicata ( $t_1$ ,  $t_2$  e  $t_3$ ) bem como o tempo médio ( $t$ ) de fluxo das soluções [68]. Os dados obtidos para a determinação do GP são apresentados no Item Resultados e Discussão.



A partir dos dados coletados, determinou-se, para cada caso, a viscosidade relativa ( $\eta_r$ ), específica ( $\eta_{sp}$ ) e intrínseca ( $\eta$ ), a massa molecular média de cada material (M) e, finalmente, o grau de polimerização conforme as equações abaixo [68].

#### **Viscosidade relativa ( $\eta_r$ )**

$$\eta_r = t / t_0$$

Onde  $t$  = tempo médio de fluxo da solução e  $t_0$  = tempo médio de fluxo do solvente, em segundos.

#### **Viscosidade específica ( $\eta_{sp}$ )**

$$\eta_{sp} = \eta_r - 1$$

#### **Viscosidade intrínseca ( $\eta$ )**

$$\eta = \frac{\sqrt{2(\eta_{sp} - \ln \eta_r)}}{c}$$

Onde  $c$  = concentração específica da celulose dissolvida na solução, em g/dL, ou seja,  $c = 0,5$ .

#### **Massa Molecular Média**

A massa molecular média (M), em cada caso, foi calculada a partir da equação empírica de Mark-Houwlin:

$$\eta = K \times M^\alpha$$

Onde  $\alpha = 0,905$  e  $K = 1,33 \times 10^{-4}$  dL/g para o sistema celulose-etilenodiamina cúprica nas condições empregadas [69].

#### **Grau de Polimerização**

O GP foi então calculado dividindo-se a massa molecular média de cada material pela massa molecular de uma unidade de anidroglicose (162):

$$GP = \frac{M}{162}$$

### **3.8 Caracterização Térmica**

As propriedades térmicas dos materiais foram determinadas por análise termogravimétrica (TGA, do inglês *Thermogravimetric Analysis*), termogravimetria

derivada (DTG, do inglês *Derivative Thermogravimetric*) e calorimetria diferencial de varredura (DSC, do inglês *Differential Scanning Calorimetry*). As medidas foram obtidas no equipamento SDT Q600 da *TA Instruments* sob atmosfera de nitrogênio com fluxo contínuo de 100 mL min<sup>-1</sup> e razão de aquecimento de 10 °C min<sup>-1</sup>, de 30-600 °C. Utilizou-se aproximadamente 5 mg de amostra e cadinho de alumina como referência.

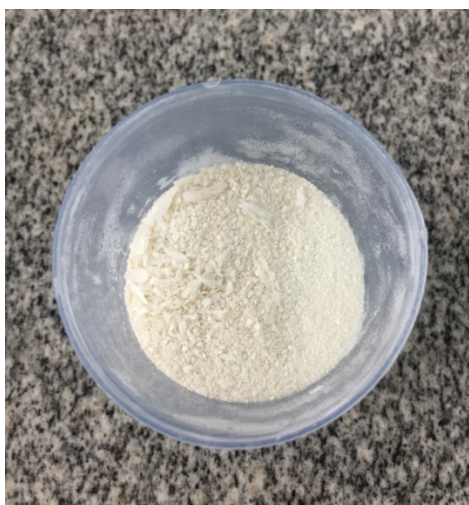
## 4. Resultados e Discussão

### 4.1 Microscopia de Força Atômica (AFM)

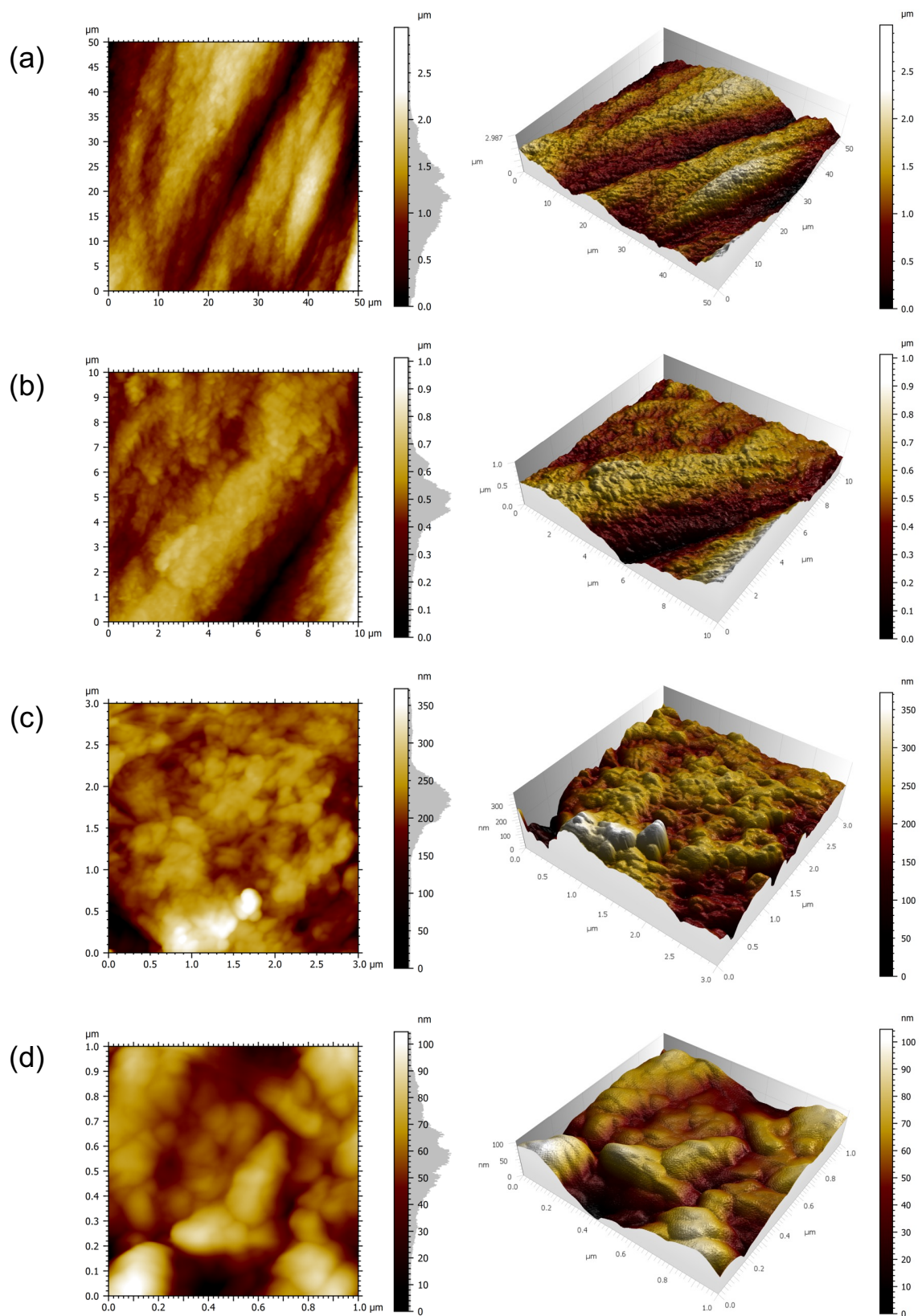
AFM é uma técnica capaz de medir quantitativamente as três dimensões da superfície de uma amostra: o plano (eixo xy) e a altura (eixo z). Assim, a AFM oferece informações qualitativas e quantitativas da amostra, incluindo tamanho e morfologia das partículas, topografia da superfície e rugosidade. As micrografias obtidas por essa técnica incluem imagens bidimensionais (2D) e tridimensionais (3D) de alta resolução do material [70].

Na **Fig. 12** é exibida uma fotografia da MicroCell. As **Figs. 13a** e **13b** apresentam as imagens 2D e 3D referentes à topografia da superfície da CB obtidas com a técnica de AFM em 50 e em 10  $\mu\text{m}^2$  de material, respectivamente. Na **Fig. 13a** é possível observar a sobreposição de fibras menores, formando um emaranhado de diâmetro maior, da ordem de 20-30  $\mu\text{m}$ . Na **Fig. 13b** observa-se que as fibras menores de celulose apresentam diâmetro de 5-8  $\mu\text{m}$ .

As **Figs. 13c** e **13d** apresentam as imagens 2D e 3D da MicroCell em 3 e em 1  $\mu\text{m}^2$  de material, respectivamente. Essas imagens permitem observar que o micronizado apresenta grande irregularidade no tamanho e no formato das partículas. Particularmente, as partículas de celulose apresentam dimensões nanométricas, cujo tamanho varia de 60-200 nm.



**Figura 12.** MicroCell obtida a partir do processamento em moinho de bolas de curativos de CB



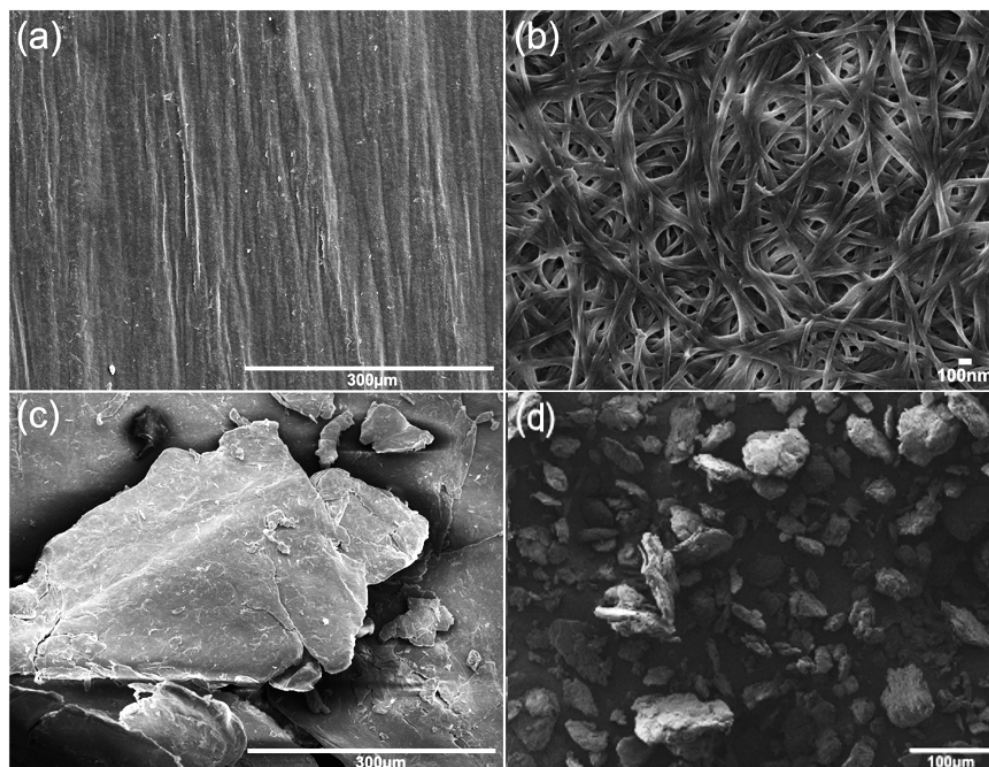
**Figura 13.** Microscopias de Força Atômica com imagem 2D e 3D da CB (a) em  $50 \mu\text{m}^2$  de material e (b) em  $10 \mu\text{m}^2$  de material, e da MicroCell (c) em  $3 \mu\text{m}^2$  de material e (d) em  $1 \mu\text{m}^2$  de material

## 4.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Assim como a AFM, a MEV é uma técnica amplamente utilizada para caracterizar a morfologia e a topografia de materiais sólidos. A obtenção de imagens em alta resolução e magnificação de MEV permite a visualização detalhada da estrutura nanométrica da CB.

As **Figs. 14a** e **14b** apresentam as micrografias da CB. Observa-se na **Fig. 14a** que as fibras estão orientadas na mesma direção, corroborando com as informações extraídas da análise de AFM. Entretanto, na micrografia de maior magnificação (**Fig. 14b**) verifica-se que tais fibras são, na realidade, formadas por nanofibras aleatoriamente dispostas cujo diâmetro gira em torno de 50 nm.

As **Figs. 14c** e **14d** apresentam as micrografias da MicroCell. Observa-se em ambas as figuras que as fibras celulósicas foram desfibriladas pelas forças de cisalhamento do processo de moagem/micronização, tendo fragmentado tais fibras tanto em aglomerados nanométricos, conforme apontado com a análise de AFM, quanto em partículas de dimensões micrométricas. Vale destacar que a celulose micronizada obtida neste trabalho se assemelha muito à celulose microcristalina, derivado celulósico amplamente empregado na indústria como excipiente farmacêutico, tanto na aparência visual (pó de coloração branca) quanto no aspecto morfológico (partículas micrométricas) [71]. Entretanto, ao contrário da celulose microcristalina que é obtida a partir da hidrólise da celulose usando ácidos minerais diluídos, a obtenção da celulose micronizada requer apenas tratamento mecânico.



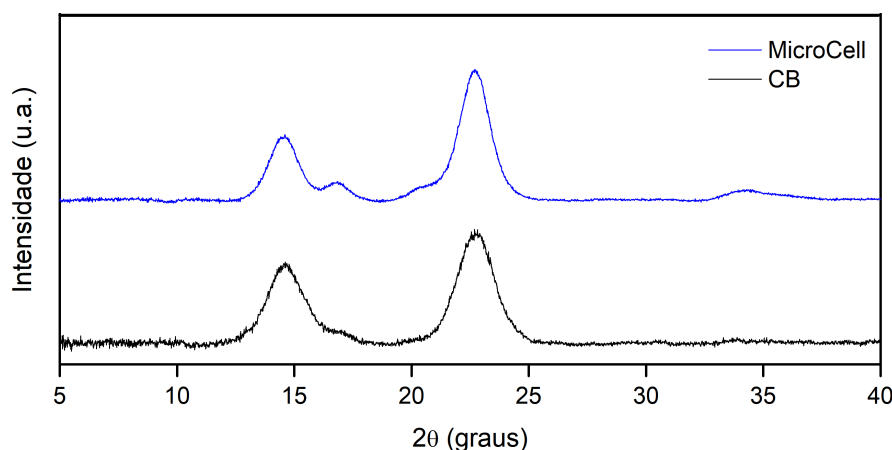
**Figura 14.** Microscopias Eletrônicas de Varredura da CB com magnificação de (a) 500x e (b) 30.000x e da MicroCell com magnificação de (c) 500x e (d) 500x

### 4.3 Difração de Raios-X (DRX)

As propriedades físicas da celulose, assim como seu comportamento químico e reatividade, são fortemente influenciadas pelo arranjo das moléculas de celulose e pelo índice de cristalinidade do material. A interação de água, enzimas e demais reagentes acontece preferencialmente nas regiões amorfas da celulose e é somente nessas regiões com baixo nível de organização e na superfície dos cristalitos que as reações químicas acontecem [72].

A análise de DRX foi utilizada para categorizar a forma cristalina da celulose e para se obter informações acerca do grau de cristalinidade dos materiais. O índice de cristalinidade relativo (ICr) é um parâmetro usado para descrever a quantidade relativa de material cristalino no polímero e pode ser determinado com diferentes técnicas, incluindo DRX, ressonância magnética nuclear de carbono 13 ( $^{13}\text{C}$  RMN), espectroscopia no infravermelho e espectroscopia Raman [73]. Nesse estudo, o ICr dos materiais foi calculado a partir do método desenvolvido por Segal e colaboradores [67] que considera a altura dos picos para determinação do grau de cristalinidade dos materiais. Os difratogramas da CB e da MicroCell são exibidos na **Fig. 15** a seguir.

O padrão de difração dos materiais é similar, mas há diferenças a serem destacadas. Ambos apresentam picos em  $2\theta = 14,5^\circ$  e  $22,7^\circ$ , os quais correspondem aos planos cristalográficos da celulose tipo  $I_\alpha$  e tipo  $I_\beta$ :  $(100)_{I_\alpha}$ ,  $(110)_{I_\beta}$  e  $(010)_{I_\beta}$  em  $14,5^\circ$  e  $(110)_{I_\alpha}$  e  $(200)_{I_\beta}$  em  $22,7^\circ$  [74]. No difratograma da MicroCell observa-se com maior evidência os picos em  $16,8^\circ$  e  $34,3^\circ$  também presentes no difratograma da CB, os quais correspondem, respectivamente, aos planos  $(110)_{I_\alpha}$  e  $(004)_I$  [75, 76]; a maior definição desses picos é um indicativo de aumento no grau de cristalinidade do polímero. Dessa forma, tem-se que ambos os materiais são constituídos majoritariamente de celulose tipo I em uma mistura de duas formas cristalinas distintas: celulosas  $I_\alpha$  (triclínica) e  $I_\beta$  (monoclínica).



**Figura 15.** Difratogramas de raios-X da CB e da MicroCell

Os valores de ICr da CB e da MicroCell foram determinados em 70,5% e 79,2%, respectivamente. Os resultados estão em consonância com o aparecimento de novos picos no difratograma da MicroCell (em  $16,8^\circ$  e em  $34,3^\circ$ ) e mostram que o tratamento mecânico aplicado para a obtenção do micronizado causou um aumento no ICr da CB. Assim, o tratamento mecânico em moinho de bolas é uma estratégia comum empregada para diminuir a cristalinidade e o grau de polimerização de substratos celulósicos [77, 78]. Entretanto, presume-se que, nas condições aplicadas, o tratamento mecânico levou à quebra das ligações de hidrogênio intercadeias na região amorfa da celulose, causando um aumento da cristalinidade do polímero. Essa metodologia simplificada e livre de solvente é uma alternativa interessante capaz de facilitar o acesso de enzimas ao substrato, por exemplo [78].

#### 4.4 Determinação do Grau de Polimerização (GP)

O termo grau de polimerização refere-se ao número de unidades monoméricas que constitui um polímero. Valores mais altos de GP estão associados a melhores propriedades mecânicas [79].

O tempo de fluxo das soluções em triplicata ( $t_1$ ,  $t_2$  e  $t_3$ ) bem como os valores de tempo médio ( $t$ ) de fluxo obtidos no ensaio de viscosimetria e o GP correspondente das amostras são exibidos na **Tabela 3** abaixo. O GP determinado para a CB (1576) mostrou-se muito próximo ao valor apresentado na literatura em um estudo onde a bactéria *Komagataeibacter sucrofermentans* (mesmo gênero da cepa produtora das membranas de CB desse estudo) foi empregada na produção de celulose e cujo GP foi de 1620 [68]. Essa proximidade de valores indica que o ensaio de viscosimetria empregado apresenta boa reprodutibilidade. Vê-se, ainda, que o processo de moagem da CB levou a uma diminuição no GP do polímero (1388), conforme previsto na literatura [77, 78], indicando a clivagem da celulose em suas regiões amorfas.

**Tabela 3.** Dados referentes ao tempo de fluxo das soluções empregadas na determinação do grau de polimerização e os valores de GP obtidos para a CB e para a MicroCell

	Tempo de fluxo (s)				GP
	$t_1$	$t_2$	$t_3$	$t$	
CB	988	977	967	977	1576
MicroCell	796	798	801	798	1388
Etilenodiamina cúprica + Água 1:1	31	31	31	31	

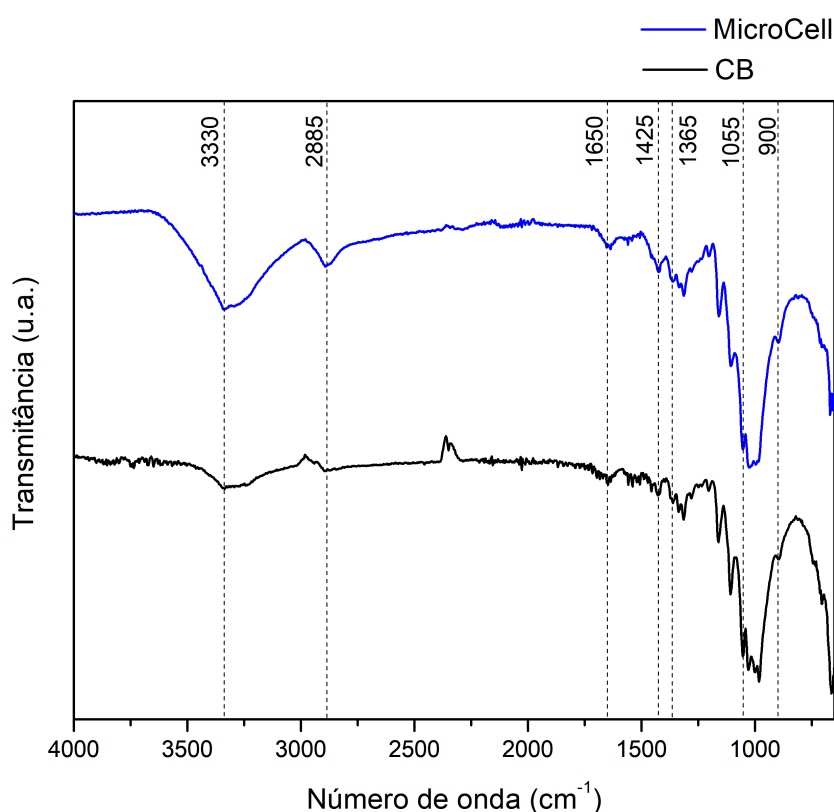
#### 4.5 Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier por Reflectância Total Atenuada (FTIR-ATR)

A espectroscopia vibracional é uma técnica capaz de identificar grupos funcionais e auxiliar no estudo da estrutura de macromoléculas. A maior parte dos estudos referentes a absorção no infravermelho referem-se à região média, de 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$ , onde se localizam as frequências vibracionais fundamentais [80].

Na **Fig. 16** é apresentado o espectro de FTIR-ATR da CB e da MicroCell. Observa-se que os substratos celulósicos apresentam bandas de absorção correspondentes com o mesmo perfil. Esse resultado é um indício de que os grupos funcionais da celulose foram mantidos após o tratamento mecânico, ou seja, a estrutura química da celulose se manteve a mesma pós micronização.



A banda alargada em  $3300\text{ cm}^{-1}$  é atribuída à deformação axial da ligação O-H e é mais intensa para a MicroCell provavelmente devido a maior exposição dos grupos hidroxila; a banda em  $1650\text{ cm}^{-1}$  se refere à deformação angular da ligação O-H. A banda em  $2885\text{ cm}^{-1}$  é atribuída ao estiramento C-H dos grupos  $\text{CH}_2$  e  $\text{CH}_3$  enquanto a banda em  $1425\text{ cm}^{-1}$  se refere à deformação angular simétrica do  $\text{CH}_2$ . A banda em  $1365\text{ cm}^{-1}$  é atribuída à deformação angular do grupo C-H enquanto as bandas em  $1055\text{ cm}^{-1}$  e  $900\text{ cm}^{-1}$  se referem, respectivamente, à deformações axiais da ligação C-O e deformações axiais das ligações glicosídicas C-O-C existentes entre as unidades de glicose [74].



**Figura 16.** Espectro vibracional na região do infravermelho da CB e da MicroCell

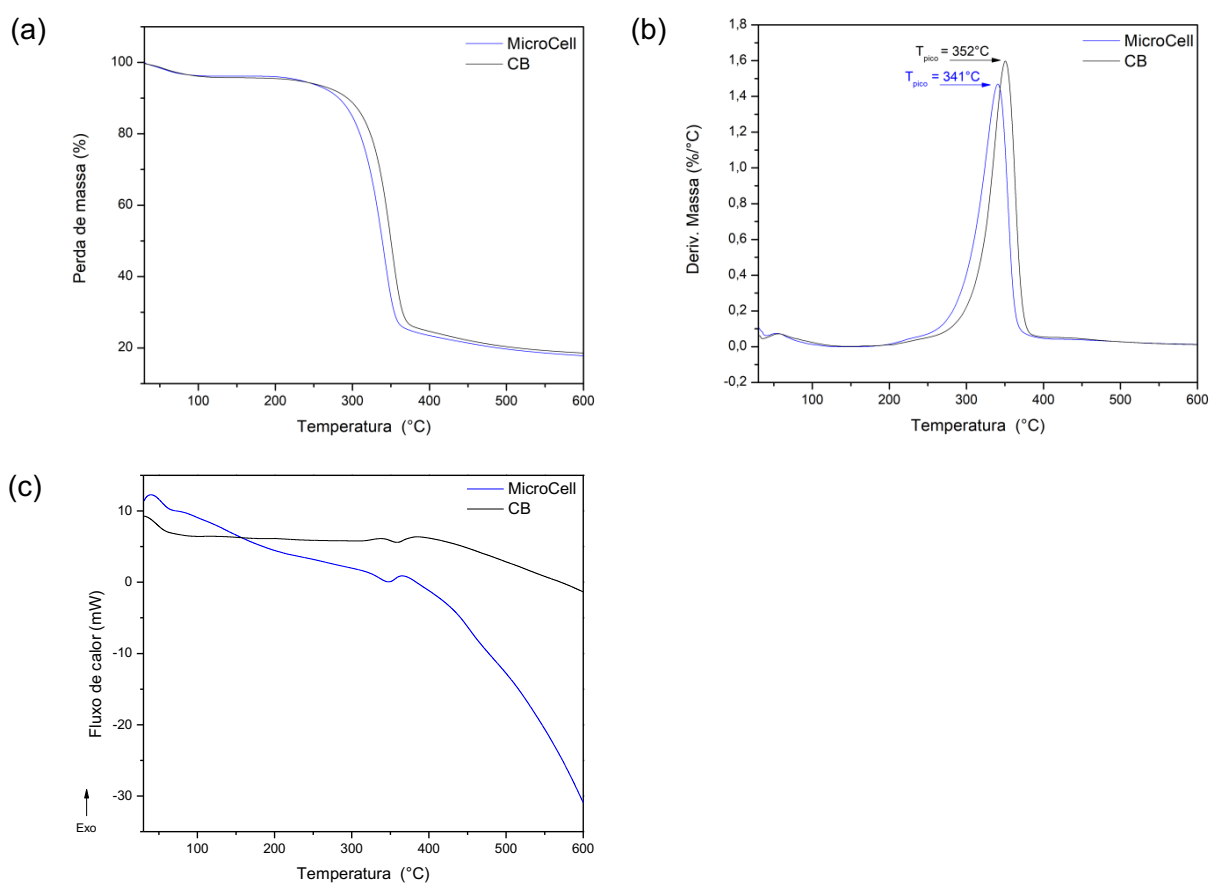
#### 4.6 Caracterização Térmica

A análise termogravimétrica (TGA) é uma técnica de análise térmica que monitora o comportamento de uma amostra submetida a uma programação controlada de temperatura. Através da detecção de alterações da massa da amostra em função da temperatura e/ou tempo, é possível monitorar reações de desidratação, oxidação, combustão, decomposição, etc. As curvas referentes à termogravimetria derivada (DTG) ao evidenciarem as inflexões da TG, permitem a determinação das temperaturas nas quais a taxa de variação de massa é máxima,  $T_{\text{pico}}$ , bem como das

temperaturas onde são observados o início e o fim da deflexão das curvas térmicas,  $T_{onset}$  e  $T_{endset}$ , respectivamente [81].

A Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC), por sua vez, é utilizada para avaliar eventos que envolvam fluxo de calor na amostra. Em geral, transições de fase, desidratações, reduções e algumas reações de decomposição estão associados a eventos endotérmicos ao passo que cristalização, oxidação e outras reações de decomposição se relacionam a eventos exotérmicos [81].

Na **Fig. 17** são apresentadas as curvas de TGA, DTG e DSC da CB e da MicroCell.



**Figura 17.** Caracterização Térmica: Curvas (a) TG da CB e da Microcell; (b) DTG da CB e da Microcell; (c) DSC da CB e da MicroCell

Na **Fig. 17a** observa-se que os materiais apresentam perfil de perda de massa semelhante. O primeiro evento de perda de massa (aproximadamente 4%) ocorre entre 30-125 °C e se refere à perda de moléculas de água retidas na superfície do material; a evaporação é um processo físico que demanda energia, sendo, portanto um evento endotérmico, conforme observado nas curvas DSC (**Fig. 17c**). O segundo

evento de perda de massa (cerca de 70%) que ocorre entre 180-400 °C está associado à decomposição da celulose: processos de despolimerização, quebra das ligações glicosídicas e formação de resíduos carbonáceos. Conforme observado nas curvas DSC, trata-se de um evento endotérmico [82].

Conforme mostrado nas curvas DTG (**Fig. 17b**), o processo de micronização causou uma diminuição no valor de  $T_{\text{pico}}$  e, portanto, uma diminuição das temperaturas de decomposição (redução da estabilidade térmica). Isso porque o tratamento mecânico levou à quebra de ligações de hidrogênio majoritariamente nas porções amorfas do polímero e conseqüente formação de cadeias poliméricas menores (dado a diminuição no GP). Assim, os resultados estão em consonância pois o conseqüente aumento da entropia do sistema diminui a estabilidade térmica do material [78].

## **5. Conclusões do Capítulo**

A moagem de retalhos de CB em moinho de bolas, um processo mecanoquímico alternativo para o reaproveitamento e uso integral da celulose, levou à formação de partículas de diferentes formatos e tamanhos, cujas dimensões atingiram as escalas micro e nanométrica. Embora a estrutura química tenha se mantido a mesma após a micronização, o processamento mecânico desfibrilou a CB e alterou suas propriedades intrínsecas, causando um aumento no ICr (de 70,5% para 79,2%) e uma diminuição no GP (de 1576 para 1388) e na estabilidade térmica do polímero ( $T_{\text{pico}}$  passou de 352 °C para 341 °C).

## Capítulo 3

### Produção e Caracterização de Nanocristais Extraídos de Celulose Bacteriana por Rotas Ácida e Enzimática

#### 1. Resumo do Capítulo

Os CNCs são nanoestruturas cristalinas de celulose extraídas por meio da desintegração das nanofibras por processos mecânicos, químicos ou enzimáticos, ou por meio de suas combinações. Esses nanomateriais possuem características e propriedades físico-químicas únicas, como alta resistência mecânica, alta área superficial, baixa densidade e biodegradabilidade, além de grande quantidade de grupos hidroxila passíveis de sofrerem modificações químicas. Os CNCs encontram aplicação em diversos setores, notadamente nas áreas biomédica, farmacêutica e eletrônica, além de serem empregados na produção de nanocompósitos e de filmes com propriedades mecânicas e de barreira melhoradas. Nesse cenário, objetivou-se extrair CNCs a partir dos retalhos de CB cedidos pela indústria de biocurativos e da CB micronizada, através de tratamento com ácido sulfúrico 64% e com enzimas comerciais Cellubrix-L, respectivamente. Os CNCs produzidos foram caracterizados quanto aos aspectos morfológicos por MET e estruturalmente por FTIR, e as propriedades térmicas e eletroquímicas de superfície foram determinadas por TG/DTG-DSC e via Potencial Zeta por DLS. Através da hidrólise ácida foram obtidos CNCs em formato de agulhas, com comprimento médio de 158 nm e largura de 11 nm, enquanto a hidrólise enzimática levou à obtenção de CNCs esféricos, com diâmetro médio variando de 48-56 nm. Os CNCs obtidos por rota ácida apresentaram maior estabilidade em suspensão e menor estabilidade térmica.

## 2. Objetivos

O objetivo principal deste capítulo do trabalho é extrair CNCs a partir de resíduos de CB por rota ácida e rota enzimática e caracterizá-los quanto à morfologia, ao tamanho de partícula, sua estabilidade térmica e em solução. Os objetivos específicos incluem:

- a) obter CNCs via hidrólise ácida empregando-se solução de ácido sulfúrico 64% utilizando aparas de CB como material de partida;
- b) obter CNCs via hidrólise enzimática empregando-se um pull comercial de enzimas utilizando CB micronizada como material de partida;
- c) caracterizar os CNCs quanto a sua morfologia e tamanho de partícula por MET;
- d) obter dados referente à carga elétrica superficial dos CNCs e à estabilidade das suspensões via Potencial Zeta por DLS;
- e) analisar a estabilidade térmica dos CNCs por TG/DTG-DSC e avaliar possíveis mudanças em estrutura química por FTIR;
- f) estudar a influência de duas diferentes cargas enzimáticas, 25U e 50U, nas propriedades dos CNCs.

### **3. Materiais e Métodos**

#### **3.1 Preparo dos Nanocristais de Celulose via Hidrólise Ácida (a-CNCs)**

Os a-CNCs foram preparados conforme protocolo pré-estabelecido e otimizado em nosso grupo de pesquisa, o Laboratório de Biopolímeros e Biomateriais (BioPolMat). Os resíduos de curativos de CB foram triturados em moinho de facas IKA A11 Basic a fim de aumentar a superfície de contato do material. Para a extração dos a-CNCs, as membranas trituradas foram submetidos à reação de hidrólise ácida. Para tanto, preparou-se uma solução de ácido sulfúrico 64% (m/m). Aqueceu-se 17,5 mL da solução ácida 64% até 50 °C e após a estabilização da temperatura e sob vigorosa agitação, adicionou-se 1 grama de CB. Manteve-se a temperatura e a agitação constantes por 30 minutos [41].

Para cessar a reação de hidrólise ácida, foi adicionado ao béquer contendo a solução de a-CNCs um volume de água destilada gelada 10 vezes maior em relação ao volume de ácido utilizado (175 mL água destilada gelada). Para remoção do excesso de ácido e concentração dos nanocristais, a suspensão foi centrifugada a 8000rpm (8560G) durante 10 minutos. Feito isso o precipitado foi resuspendido em 60 mL de água milliQ com o auxílio de um vortex. A suspensão final foi então submetida à diálise com água milliQ, utilizando-se membranas semipermeáveis de acetato de celulose. A água foi trocada algumas vezes durante 2 dias até que o sistema tivesse atingido pH 5,0. A suspensão foi sonicada durante 10 min (545 W, pulso 5 segundos ligado e 2 segundos desligado) em um ultrassom de ponteira da Ecosonics, modelo Ultronique 20kHz, em banho de gelo.

#### **3.2 Preparo dos Nanocristais de Celulose via Hidrólise Enzimática**

O preparo dos nanocristais por rota enzimática se deu no Laboratório de Nanobiotecnologia e Bioprodutos (Nanobiotech), localizado na Escola de Engenharia de Lorena (USP Lorena) e coordenado pelo Prof. Dr. Valdeir Arantes. Inicialmente processou-se 10,0g de MicroCell em um ultra-refinador de discos SuperMassColloider (Masuko, modelo MKCA6-5J) na concentração de 1% m/m de celulose seca/água. Misturou-se a celulose em 1L (1000g) de água, obtendo-se a concentração final de 1% m/m. No ultra-refinador, foi realizados um total de 12 ciclos. Feito isso, a porcentagem de sólidos foi determinada com o auxílio da balança de infravermelho. A massa seca foi determinada em 1,46%.

A hidrólise enzimática foi realizada colocando-se um pull de enzimas Cellubrix-L (Novozymes, Araucária-PR, Brasil) com atividade de 1448 U/g em contato com a polpa a 0,5% m/m de celulose seca/água. Como a massa seca da polpa foi determinada em 1,46%, ajustou-se a concentração para 0,5% m/m. Duas cargas de enzimas foram testadas: 25U e 50U (25U/1g de celulose seca e 50U/1g de celulose seca). Para tanto, colocou-se a polpa a 0,5% m/m em agitação orbital a 250 rpm a 50 °C até homogeneização. Em seguida, adicionou-se a carga de enzimas e diminuiu-se a agitação para 150rpm. Manteve-se o sistema nessa condição (150 rpm a 50 °C) por 72h. Para cessar a reação, colocou-se o meio em um banho de água em ebulição por 10 minutos. O processo de lavagem para retirada de açúcar, enzimas, surfactantes e demais subprodutos se deu por centrifugação a 4300rpm (4258G) por 15 minutos (rampa com subida a 1 min e parada a 3 min) por três vezes.

Determinou-se novamente o teor de massa seca do produto final e ajustou-se a concentração da polpa para 0,1%. Para cada 1L de polpa a 0,1%, sonicou-se o meio durante 30 minutos no Sonicador Sonics Vibra-cell Modelo CV33 [83]4 (1h de equipamento operando com pulso 10seg on e 10seg off) e filtrou-se. Analisou-se o líquido filtrado no Mastersizer 3000 e Hydro MV para determinação do tamanho médio das partículas obtidas. Quando necessário (obtenção de partículas grandes), sonicou-se novamente o meio na mesma condição por mais 30 minutos. Finalmente, concentrou-se os meios com a utilização de um Amicon de 400 mL empregando-se uma membrana de celulose regenerada de 10KDa.

### **3.3 Microscopia Eletrônica de Transmissão**

A análise de microscopia eletrônica de transmissão (MET) foi realizada com o microscópio Philips CM200 no Instituto de Química da Unesp Araraquara. As amostras foram submetidas ao ultrassom, gotejadas no porta amostra e secas para serem analisadas.

### **3.4 Espalhamento de Luz Dinâmico**

As medidas referentes a diâmetro hidrodinâmico e potencial zeta para os CNCs extraídos por rota ácida foram realizadas com o analisador de partículas Litesizer 500 da Anton Paar e as curvas de distribuição de diâmetro hidrodinâmico foram



geradas no software Kalliope. As medidas para os CNCs extraídos por rota enzimática foram realizadas com o analisador de partículas Zetasizer Nano ZS da Malvern Instruments modelo ZEN3600. As curvas de distribuição de diâmetro hidrodinâmico foram geradas no software Zetasizer Nano APS versão 7.10 da Malvern. As medidas foram realizadas em triplicata.

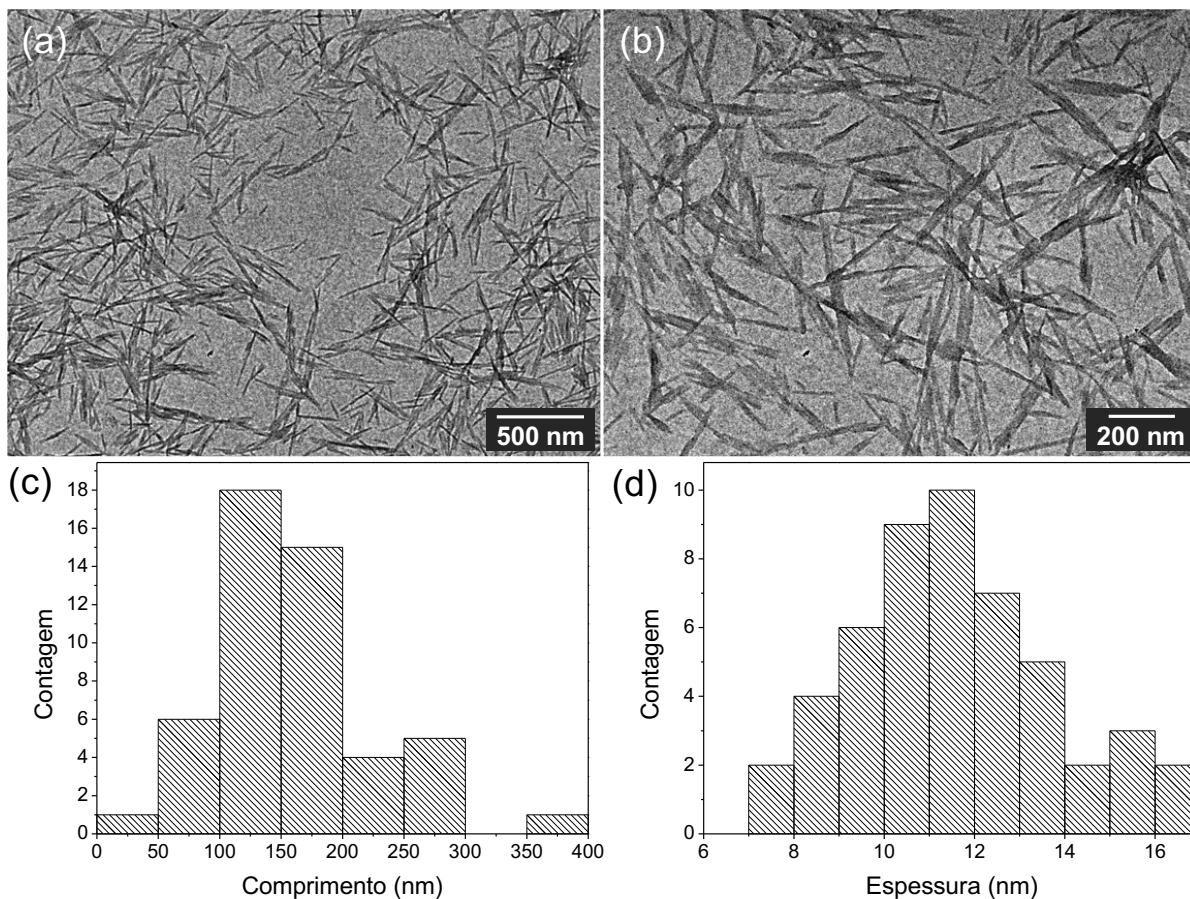
## 4. Resultados e Discussão

### 4.1 Caracterização dos Nanocristais de Celulose via Hidrólise Ácida

#### 4.1.1 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

A MET é uma técnica largamente empregada na análise microestrutural de materiais, permitindo a obtenção de imagens da microestrutura e padrões de difração de sistemas cristalinos bem como informações microestruturais quantitativas. Através da análise digital de imagens é possível calcular o diâmetro equivalente das partículas. Embora a MET apresente melhor resolução em relação à MEV, as áreas observadas são restritas [81].

As **Figs. 18a e 18b** exibem as imagens de MET dos a-CNCs e as **Figs. 18c e 18d** apresentam os histogramas de distribuição de comprimento e espessura das partículas. Observa-se que os a-CNCs apresentam dimensões nanométricas e formato de agulhas, com comprimento de  $158 \pm 64$  nm e largura de  $11 \pm 2$  nm. Dessa forma, a razão de aspecto, ou seja, a razão entre o comprimento e a espessura, foi determinada em  $14 \pm 6$ . Estudos anteriores demonstram que CNCs derivados de CB e extraídos por rota ácida apresentam mesma morfologia de agulha/bastão e dimensões/razão de aspecto semelhantes [41, 29]. Assim, os resultados obtidos corroboram com estudos anteriores [29, 84] que demonstram a viabilidade do uso de resíduos celulósicos na extração de CNCs e sua contribuição com a economia circular.



**Figura 18.** Microscopias Eletrônicas de Transmissão dos a-CNCs com (a) barra de escala = 500 nm e (b) barra de escala = 200 nm; Histogramas de distribuição de tamanho gerados a partir das micrografias referentes ao (c) comprimento dos a-CNCs e (d) espessura dos a-CNCs

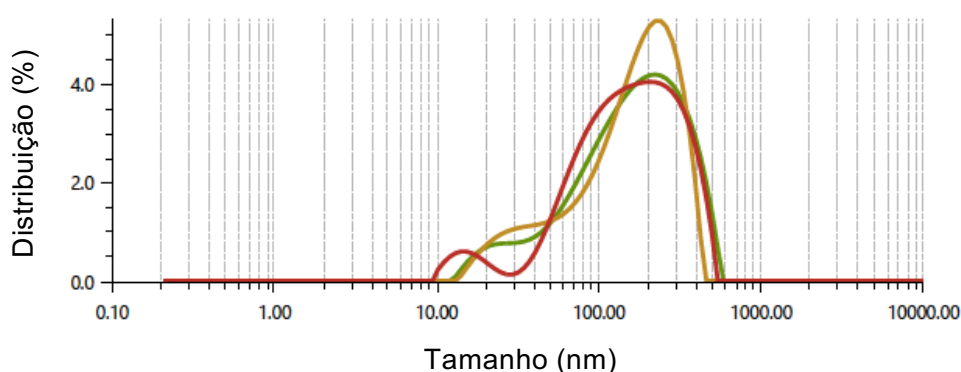
#### 4.1.2 Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS) e Potencial Zeta

A técnica de DLS e medidas de potencial zeta são comumente empregadas na caracterização físico-química de sistemas coloidais. Ao medir, no decorrer do tempo, as flutuações da intensidade de luz espalhada causada pelos movimentos das partículas em solução, a técnica de DLS permite obter informações de distribuição de tamanhos de nanopartículas [81]. O potencial zeta, por sua vez, permite obter informações acerca da carga superficial de nanoparticulados. Valores de potencial zeta menores que -20 mV ou maiores que +20 mV refletem uma alta força repulsiva entre as nanopartículas e, portanto, alta estabilidade coloidal [85].

Os a-CNCs isolados neste trabalho apresentaram potencial zeta de  $-30,8 \pm 1,73$  mV. Esse resultado está em consonância com os valores obtidos por Singhsa, P, Ravin N, Manuspiya H (2017) [34] e Melo PTS et al. (2020) [29] que prepararam CNCs em condições semelhantes e obtiveram suspensões estáveis (potencial zeta entre -45 e -30,9 mV). O valor obtido ( $-30,8 \pm 1,73$  mV) indica alta estabilidade e a

carga negativa é resultante da substituição de grupos hidroxila por grupos sulfonatos na superfície dos a-CNCs.

A **Fig. 19** a seguir exhibe as curvas geradas via DLS da distribuição do diâmetro hidrodinâmico dos a-CNCs em suspensão. Observa-se a presença de duas populações, sendo uma delas majoritária. O diâmetro hidrodinâmico médio foi determinado em 144 nm e o índice de polidispersividade (Pdl, do inglês *polydispersive index*) em 27%. Como se trata de CNCs de morfologia não esférica, o diâmetro hidrodinâmico determinado pelo DLS não deve ser confundido com seu comprimento. Além disso, os valores de diâmetro hidrodinâmico que incluem as camadas de contra-íons e de hidratação, mesmo para partículas esféricas não estão necessariamente relacionados aos nanocristais individuais, mas podem refletir valores relacionados a aglomerados.



**Figura 19.** Distribuição do tamanho hidrodinâmico dos a-CNCs

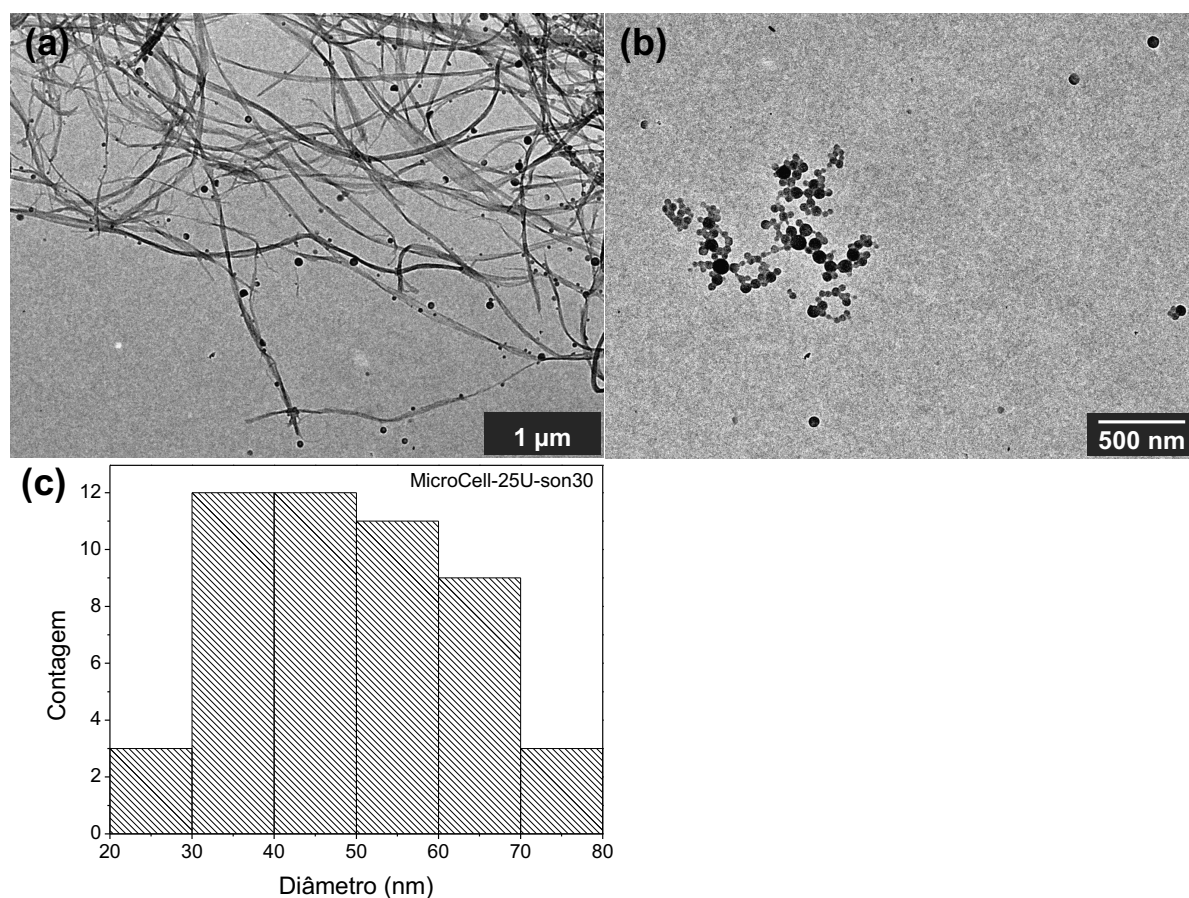
## 4.2 Caracterização dos Nanocristais de Celulose via Hidrólise Enzimática

### 4.2.1 CNCs-MicroCell-25U-son30

#### 4.2.1.1 Microscopia Eletrônica de Transmissão

As **Figs. 20a** e **20b** exibem as imagens de MET dos CNCs obtidos por rota enzimática com carga de 25U e sonicados por 30 minutos e a **Fig. 20c** apresenta o histograma de distribuição do diâmetro das partículas. Observa-se que os CNCs apresentam morfologia esférica e dimensões nanométricas com diâmetro de  $48 \pm 14$  nm, e que esta medida varia de 20-80nm. Vê-se, ainda, a presença de nanofibras de celulose na amostra. Em trabalhos anteriores que exploraram a utilização de enzimas na produção de CNCs, a morfologia das nanopartículas se

mostrou significativamente distinta dos *whiskers* obtidos por rota ácida, com formatos e tamanhos heterogêneos [46, 44].

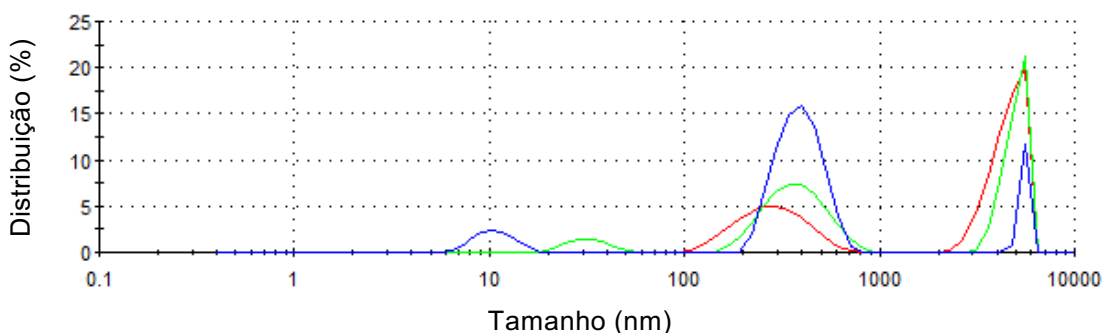


**Figura 20.** Microscopias Eletrônicas de Transmissão dos CNCs-MicroCell-25U-son30 com (a) barra de escala = 1  $\mu\text{m}$  e (b) barra de escala = 500 nm; (c) Histograma de distribuição de diâmetro gerado a partir das micrografias

A literatura aponta que, no geral, a absorção de nanocelulose nas células é geralmente baixa, sem efeitos citotóxicos e genotóxicos significativos. No entanto, os macrófagos que, devido a sua função fagocitária, internalizam CNCs em formato de agulhas/bastões, podem desencadear uma reação inflamatória de moderada a grave, a depender também da funcionalização dos CNCs [86]. Dessa forma, tem-se que, devido a morfologia esférica, os CNCs obtidos por hidrólise enzimática no presente trabalho tem grande potencial de aplicação em áreas como biomedicina e embalagem de alimentos.

#### 4.2.1.2 Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS) e Potencial Zeta

A **Fig. 21** exibe as curvas geradas por DLS da distribuição do diâmetro hidrodinâmico dos CNCs. Observa-se a presença de três populações, sendo uma delas (a de menor diâmetro) minoritária. O diâmetro hidrodinâmico médio foi de 1200 nm e o Pdl de 82%. O alto Pdl sugere que a distribuição do tamanho de partícula é heterogênea, corroborando com os dados referentes à distribuição de diâmetro gerado a partir das micrografias de MEV (**Fig. 20c**). Ainda, a análise conjunta dos dados sugere a presença de aglomerados, incluindo aglomerados de nanofibras de celulose.



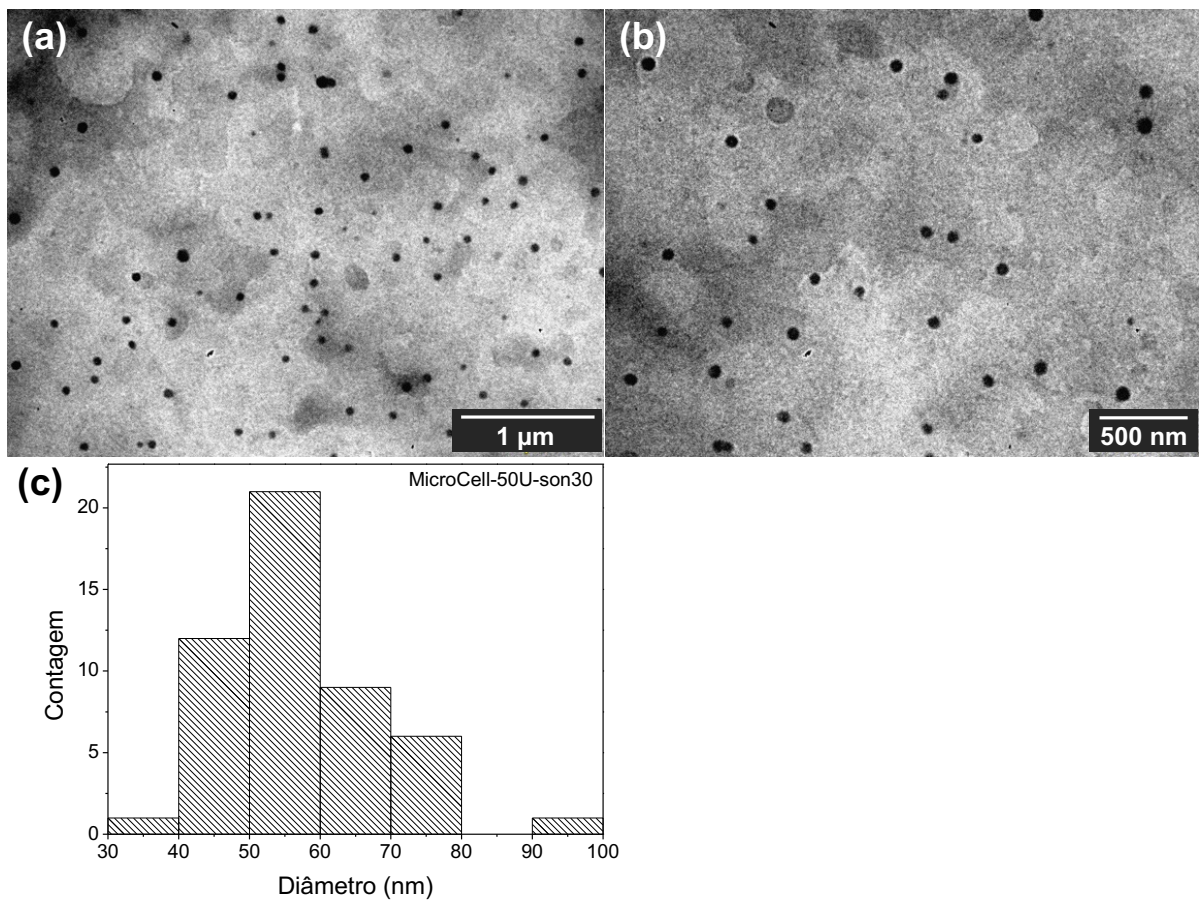
**Figura 21.** Distribuição do tamanho hidrodinâmico dos CNCs-MicroCell-25U-son30

Os CNCs extraídos nas presentes condições (carga enzimática de 25U seguido de sonicação por 30 minutos) apresentaram um potencial zeta de  $1,41 \pm 3,77$  mV. O valor obtido indica baixa estabilidade e ausência de carga.

#### 4.2.2 CNCs-MicroCell-50U-son30

##### 4.2.2.1 Microscopia Eletrônica de Transmissão

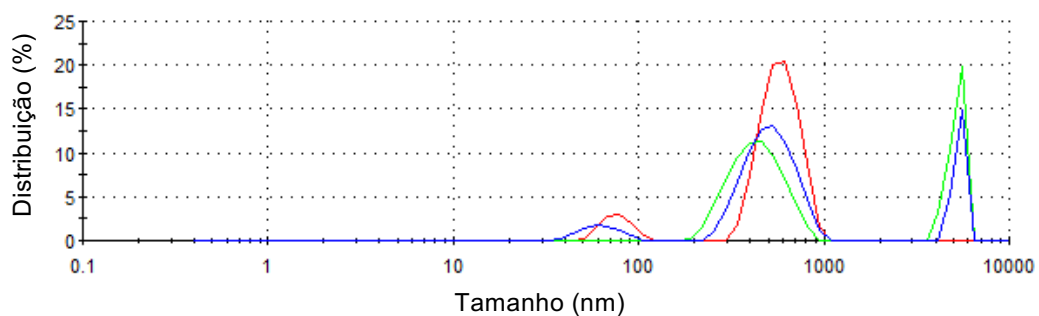
As **Figs. 22a** e **22b** exibem as imagens de MET dos CNCs obtidos por rota enzimática com carga de 50U e sonicação de 30 minutos e a **Fig. 22c** apresenta o histograma de distribuição do diâmetro das partículas. Assim como observado na condição anterior, os CNCs apresentam morfologia esférica e dimensões nanométricas, porém com diâmetro um pouco maior de  $56 \pm 11$  nm, cuja medida varia de 30-100nm.



**Figura 22.** Microscopias Eletrônicas de Transmissão dos CNCs-MicroCell-50U-son30 com (a) barra de escala = 1 μm e (b) barra de escala = 500 nm; (c) Histograma de distribuição de diâmetro gerado a partir das micrografias

#### 4.2.2.2 Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS) e Potencial Zeta

A **Fig. 23** exibe as curvas geradas por DLS da distribuição do diâmetro hidrodinâmico dos CNCs. Observa-se, assim como no caso anterior, três populações e diâmetro hidrodinâmico médio similar, neste caso de 1149 nm, e Pdl um pouco menor, de 73%. Ainda assim, esses dados sugerem a presença de aglomerados.



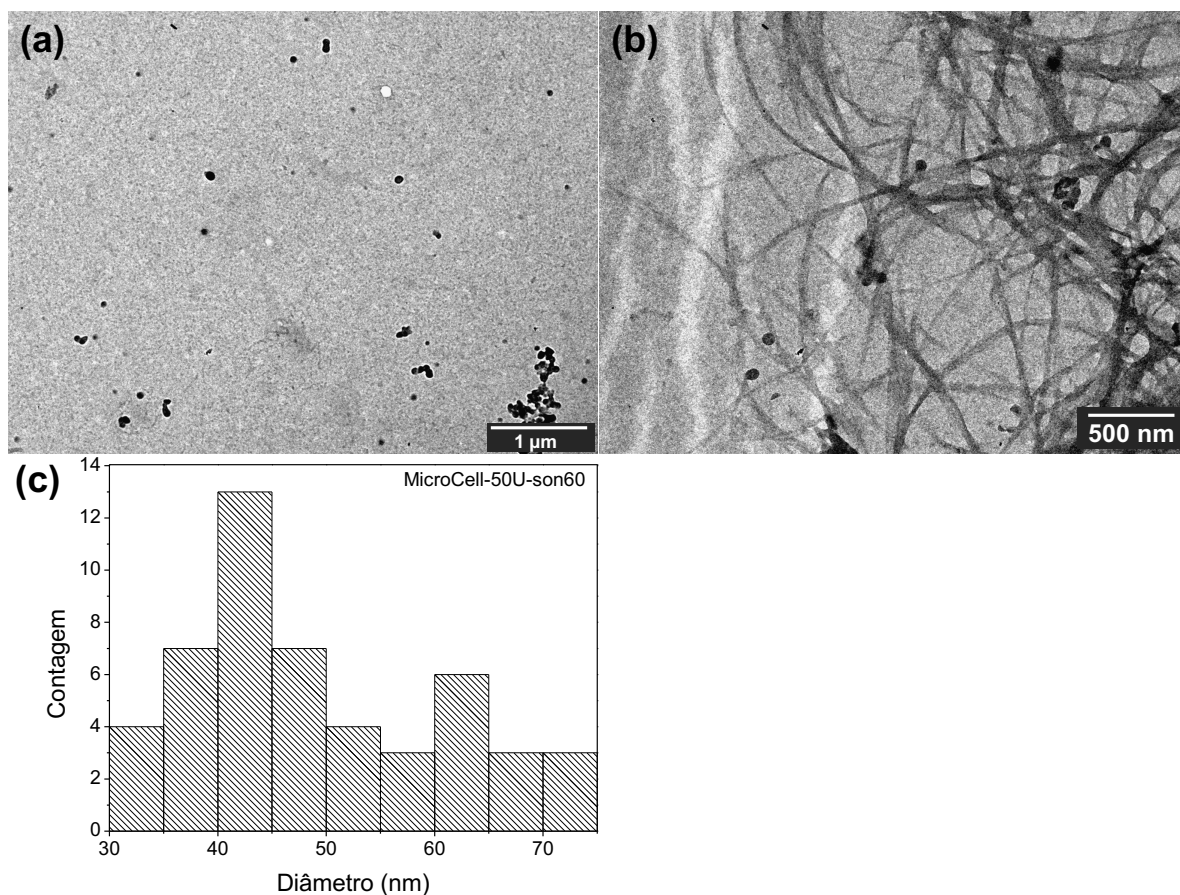
**Figura 23.** Distribuição do tamanho hidrodinâmico dos CNCs-MicroCell-50U-son30

Os CNCs extraídos nas presentes condições (carga enzimática de 50U seguido de sonicação durante 30 minutos) apresentaram um potencial zeta de  $2,70 \pm 3,32$  mV. O baixo valor obtido reflete a baixa estabilidade da suspensão. Os dados obtidos até aqui demonstram, portanto, que o aumento da carga enzimática mantendo-se o mesmo tempo de sonicação teve pouco efeito sobre o tamanho das nanopartículas e a estabilidade da suspensão.

### 4.2.3 CNCs-MicroCell-50U-son60

#### 4.2.3.1 Microscopia Eletrônica de Transmissão

As **Figs. 24a** e **24b** exibem as imagens de MET dos CNCs obtidos por rota enzimática com carga de 50U e sonicação de 60 minutos, e a **Fig. 24c** apresenta o histograma de distribuição do diâmetro das partículas. Tal qual observado nas condições anteriores, os CNCs apresentam morfologia esférica e dimensões nanométricas, e, particularmente, diâmetro de  $49 \pm 11$  nm que variou de 30-75nm.

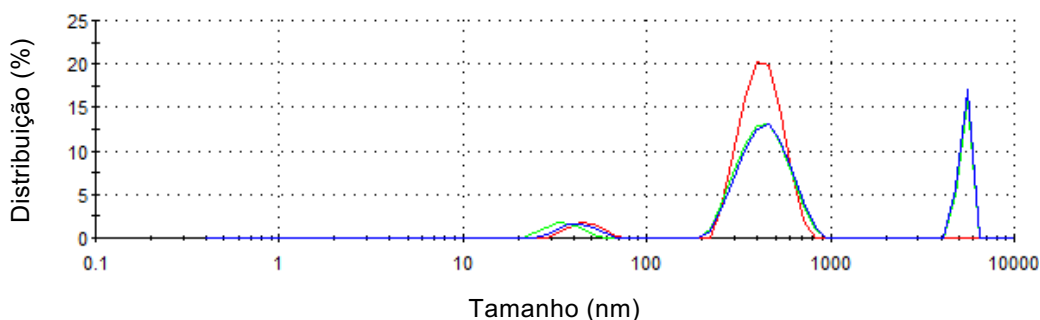


**Figura 24.** Microscopias Eletrônicas de Transmissão dos CNCs-MicroCell-50U-son60 com (a) barra de escala = 1 μm e (b) barra de escala = 500 nm; (c) Histograma de distribuição de diâmetro gerado a partir das micrografias



#### 4.2.3.2 Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS) e Potencial Zeta

A Fig. 25 apresenta as curvas geradas por DLS da distribuição do diâmetro hidrodinâmico dos CNCs. Vê-se, assim como nas condições anteriores, três populações e diâmetro hidrodinâmico médio semelhante, de 1235 nm, além de um Pdl de 78%, o que também sugere a presença de aglomerados.



**Figura 25.** Distribuição do tamanho hidrodinâmico dos CNCs-MicroCell-50U-son60

Os CNCs extraídos com carga enzimática de 50U seguido de sonicação por 60 minutos apresentaram um potencial zeta de  $1,17 \pm 3,81$  mV, refletindo a baixa estabilidade da suspensão. Dessa forma, os dados obtidos até aqui demonstram que tanto aumento da carga enzimática (de 25U para 50U) quanto o aumento na sonicação (de 30 para 60 minutos) teve pouco efeito sobre o tamanho das nanopartículas e estabilidade das suspensões.

A Tabela 4 exibe os dados de morfologia, tamanho e potencial zeta apresentados pelos CNCs extraídos em todas as condições testadas.

**Tabela 4.** Formato, tamanho médio e potencial zeta dos CNCs obtidos

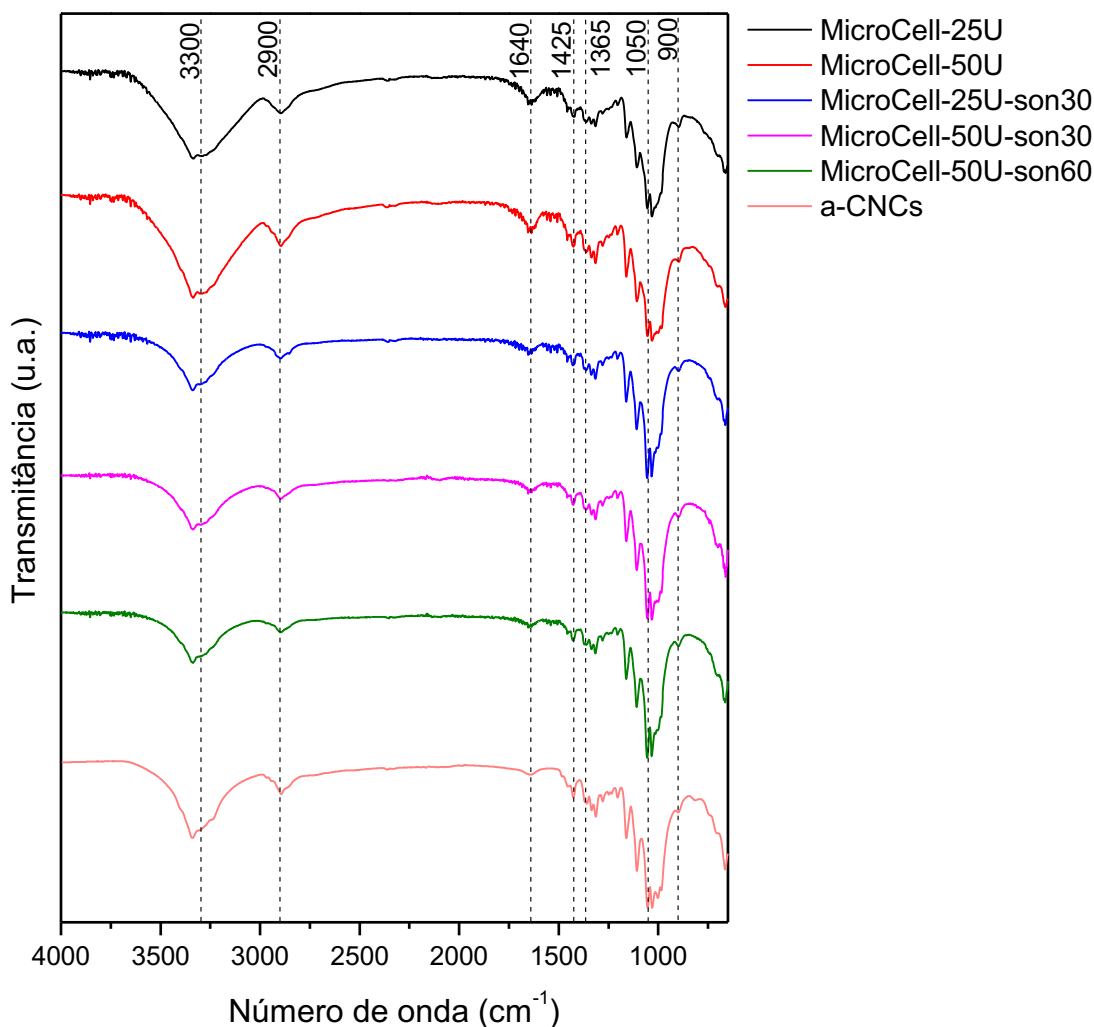
CNCs	Formato	Diâmetro (nm)	Potencial zeta (mV)
Rota Ácida	Agulhas	Comprimento: $158 \pm 64$ Largura: $11 \pm 2$	$-30,8 \pm 1,73$
MicroCell-25U-son30	Esferas	$48 \pm 14$	$1,41 \pm 3,77$
MicroCell-50U-son30	Esferas	$56 \pm 11$	$2,70 \pm 3,32$
MicroCell-50U-son60	Esferas	$49 \pm 11$	$1,17 \pm 3,81$

Conforme apresentado, as propriedades dos CNCs obtidos via rotas ácida e enzimática mostraram-se significativamente diferentes entre si. Entretanto, nas condições empregadas de hidrólise enzimática, os CNCs apresentaram mesma morfologia esférica bem como valores de diâmetro médio e potencial zeta próximos

entre si. Poucos estudos na literatura exploraram o emprego da CB na produção de CNCs [46, 44, 43] e, a princípio, em nenhum deles nanopartículas de morfologia esférica foram obtidas. No entanto, CNCs esféricos com tamanho semelhante foram previamente sintetizados por hidrólise com ácido sulfúrico a partir de cascas de sementes de sagu [87] e algodão [88].

#### **4.3 Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier por Reflectância Total Atenuada (FTIR-ATR)**

Na **Fig. 26** são apresentados os espectros de FTIR-ATR dos a-CNCs e dos CNCs antes e após o processo de sonicação. Observa-se que os materiais apresentam as mesmas bandas de absorção características da celulose, ou seja, o mesmo perfil de absorção. Esse resultado indica que os tratamentos empregados não afetaram a estrutura química da celulose. As bandas de absorção presentes são:  $3300\text{ cm}^{-1}$  - deformação axial da ligação O-H;  $2900\text{ cm}^{-1}$  - estiramento C-H dos grupos  $\text{CH}_2$  e  $\text{CH}_3$ ;  $1425\text{ cm}^{-1}$  - deformação angular simétrica de C-H;  $1365\text{ cm}^{-1}$  - deformação angular do grupo C-H;  $1050\text{ cm}^{-1}$  - deformações axiais da ligação C-O e  $900\text{ cm}^{-1}$  - deformações axiais das ligações glicosídicas C-O-C [74].



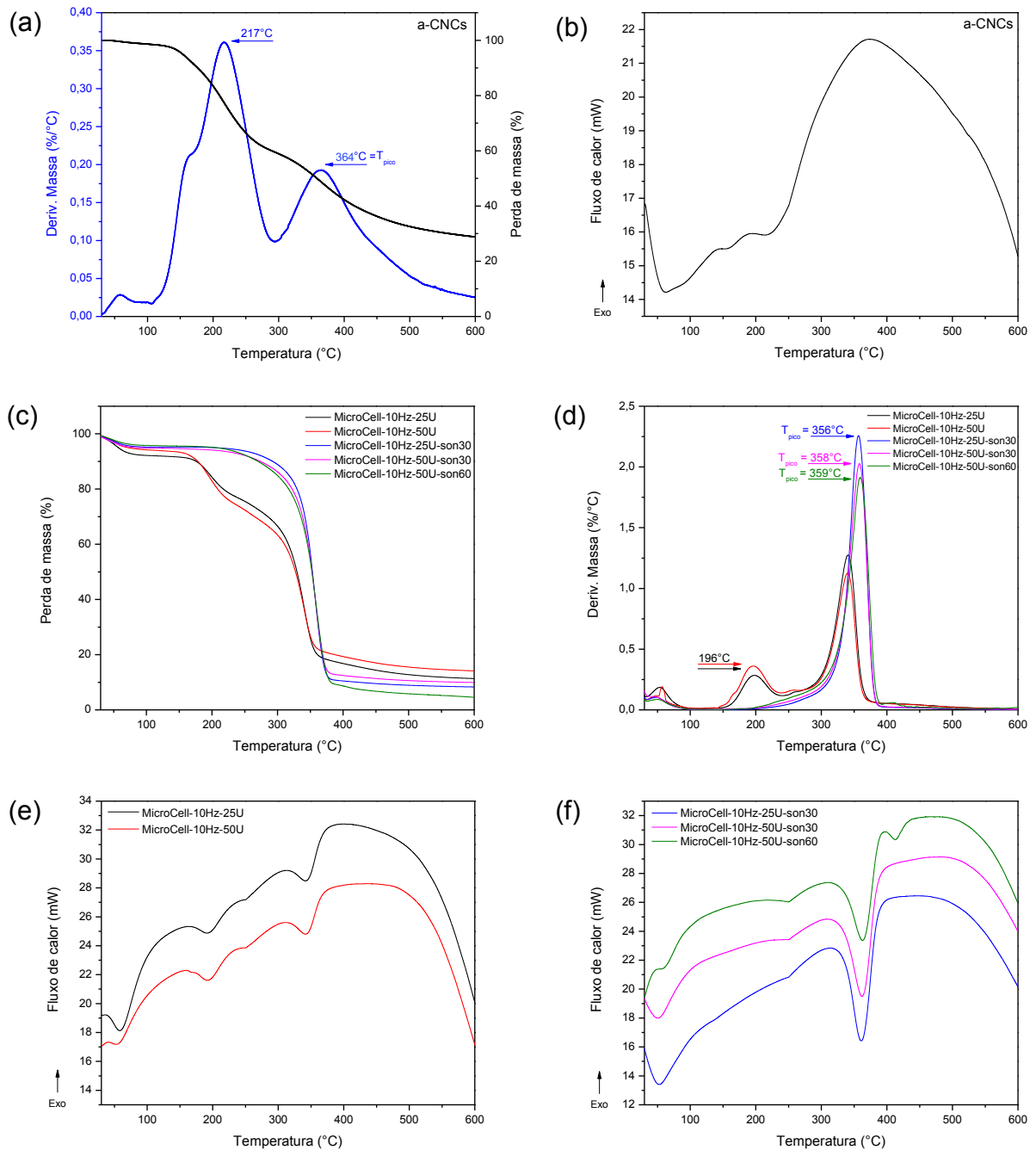
**Figura 26.** Espectro vibracional na região do infravermelho dos CNCs obtidos via rotas ácida e enzimática

#### 4.4 Caracterização Térmica

Na **Fig. 27** são apresentadas as curvas de TGA, DTG e DSC dos a-CNCs e dos CNCs extraídos por rota enzimática.

Conforme observado na **Fig. 27a**, os a-CNCs apresentam duas etapas principais de perda mássica acima de 100 °C. A primeira etapa (entre 100-300 °C aproximadamente) está associada ao processo de desidratação e degradação de possíveis impurezas. Em temperaturas mais elevadas ocorre a degradação das cadeias de celulose, com  $T_{\text{pico}} = 364$  °C. Observa-se que a quantidade de resíduos carbonáceos a 600 °C é aproximadamente 10% maior do que o resíduo deixado pela CB na mesma condição. Isso acontece porque o ácido sulfúrico facilita a remoção de grupos hidroxila do anel, o que, por sua vez, diminui a despolimerização e a quantidade de voláteis liberados durante a degradação térmica, contribuindo para a

formação do resíduo. Além disso, a presença de grupos sulfonatos enxertados na celulose também contribui para o aumento da massa do resíduo [89, 41].



**Figura 27.** Caracterização Térmica: Curvas (a) TG/DTG dos a-CNCs e (c) DSC dos a-CNCs; Curvas (c) TG e (d) DTG das amostras de celulose submetidas à hidrólise enzimática antes e após o processo de sonicação; Curvas (e) DSC das amostras de celulose submetidas à hidrólise enzimática antes do processo de sonicação e (f) DSC das amostras de celulose submetidas à hidrólise enzimática após o processo de sonicação;

Na **Fig. 27c** observa-se que o perfil de perda de massa dos CNCs obtidos por rota enzimática antes e após o processo de sonicação é diferente, possivelmente devido a presença de impurezas nas amostras não filtradas e não sonicadas e de

partículas de diferentes tamanhos/propriedades. A sonicação é uma técnica amplamente empregada na extração de nanocelulose por promover desfibrilação, transferência de massa, homogeneização do meio e desaglomeração, o que resulta em suspensões mais homogêneas, com distribuições de tamanho de partícula menores [90] e, nesse caso em particular, contribui com a liberação dos CNCs presos aos emaranhados de fibras de celulose. Conforme se observa nas curvas DTG (**Fig. 27d**), as amostras sonicadas e filtradas apresentam decomposição em etapa única, assim como a CB, ao passo que as amostras não-sonicadas e não-filtradas apresentaram perfil de perda mássica distinto. Nesse caso, presume-se que a perda mássica entre 170-270 °C esteja relacionada à decomposição de impurezas e em temperaturas mais elevadas (entre 250-400 °C) ocorre a decomposição da celulose.

As curvas DSC apresentadas nas **Figs. 27b, 27e e 27f** mostram um pico endotérmico entre 30-125 °C referente à evaporação de água de superfície. Os demais picos endotérmicos estão associados à eliminação de moléculas de água, à decomposição de impurezas e à decomposição da celulose e formação de resíduos carbonáceos [82].

Quantos aos CNCs obtidos por rota enzimática, dentro do mesmo grupo (não-sonicados e sonicados), a mudança na carga enzimática (de 25U para 50U) não afetou o comportamento térmico das amostras. Entretanto, observa-se que o tratamento enzimático seguido da sonicação e filtração aumentou a estabilidade térmica do produto final, o que pode estar associado a menor concentração de impurezas e de particulados amorfos nesse material.

## **5. Conclusões do Capítulo**

As condições de hidrólise empregadas permitiram a obtenção de particulados celulósicos com dimensões nanométricas, os CNCs. A partir da hidrólise ácida obteve-se CNCs em formato de agulhas, com comprimento médio de 158 nm e largura de 11 nm, enquanto as condições empregadas de hidrólise enzimática levaram a obtenção de CNCs esféricos, com diâmetro médio variando de 48-56 nm. A estabilidade da suspensão de CNCs obtidos por rota ácida foi significativamente superior, mas todas as condições analisadas levaram a formação de aglomerados. Entre os CNCs produzidos, os a-CNCs apresentaram a menor estabilidade térmica.

## Capítulo 4

### Produção e Caracterização de Filmes Nanocompósitos de Goma Gelana Reforçados com Nanocristais de Celulose Bacteriana

#### 1. Resumo do Capítulo

A GG é um polissacarídeo aniônico linear atóxico, biocompatível e biodegradável produzido por fermentação aeróbica de bactérias Gram-negativas do gênero *Sphingomonas*. Tradicionalmente utilizada na indústria alimentícia como agente espessante, a GG tem sido amplamente explorada nas áreas médica e farmacêutica, notadamente na engenharia tecidual, no desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos e na produção de meios de cultura sólidos alternativos. Composta por  $\beta$ -D-glicose,  $\beta$ -D-ácido glucurônico e  $\alpha$ -L-ramnose, a GG tem a capacidade de formar géis e filmes transparentes e flexíveis. Nesse contexto, objetivou-se produzir filmes nanocompósitos de GG reforçados com os CNCs obtidos pelas duas diferentes rotas exploradas neste trabalho empregando-se diferentes concentrações de carga a fim de avaliar a influência dos diferentes CNCs nas propriedades dos filmes de GG. Os materiais produzidos foram caracterizados quanto aos aspectos morfológicos por MEV e estruturalmente por FTIR e DRX. As propriedades térmicas e o impacto dos CNCs na transparência e na homogeneidade dos filmes também foram avaliados por termogravimetria e UV-Vis, respectivamente. Ainda, a citotoxicidade dos filmes produzidos foi avaliada em cultura de fibroblastos e o efeito dos CNCs na rigidez e no limite de resistência desses materiais foi investigado através dos resultados extraídos dos ensaios mecânicos de tração. A incorporação dos a-CNCs e e-CNCs na matriz de GG diminuiu a transmitância dos filmes de 8 – 48% em 550 nm. Os filmes nanocompósitos reforçados com e-CNCs nas concentrações de 5% e 10% tiveram sua temperatura inicial de degradação diminuída e passaram a apresentar decomposição térmica em duas etapas. Quanto às propriedades mecânicas dos filmes, apenas os e-CNCs empregados na concentração de 10% promoveram aumento na rigidez da matriz polimérica. No que se refere aos ensaios celulares, nenhum dos filmes apresentou efeito citotóxico sobre as células L929 testadas.

## 2. Objetivos

O objetivo principal deste capítulo do trabalho é produzir filmes de GG reforçados com os CNCs extraídos por rotas ácida (a-CNCs) e enzimática e avaliar a influência dos diferentes CNCs na aparência e nas propriedades físicas, químicas e mecânicas dos filmes de GG, bem como avaliar a citotoxicidade dos filmes nanocompósitos produzidos. Haja vista as propriedades semelhantes dos CNCs extraídos por rota enzimática, elencou-se os CNCs obtidos com o emprego de carga enzimática de 50U e sonicação de 30 minutos (MicroCell-50U-son30), mais estável em suspensão, como referência dessa condição. Neste capítulo, esses CNCs passam a ser denominados e-CNCs.

Os objetivos específicos incluem:

- a) analisar o aspecto visual dos filmes e sua transparência através da análise por UV-Vis;
- b) avaliar a morfologia superficial e a seção transversal dos filmes;
- c) analisar a estabilidade térmica dos filmes por TG/DTG-DSC e avaliar possíveis mudanças na estrutura química por FTIR;
- d) avaliar a citotoxicidade *in vitro* dos filmes nanocompósitos produzidos em cultura de fibroblastos derivados de tecido conjuntivo;
- e) avaliar a rigidez dos filmes preparados por meio dos valores de módulo de elasticidade, bem como a tensão de ruptura e deformação na ruptura dos materiais.



### **3. Materiais e Métodos**

#### **3.1 Preparo dos Filmes de GG**

Os filmes de GG foram preparados conforme metodologia desenvolvida por Faraco, TA et al. (2021) [91] dado ser um procedimento de preparação simples por *casting* que levou a obtenção de filmes finos flexíveis e transparentes, propriedades estas fundamentais em aplicações como substratos para dispositivos flexíveis emissores de luz, embalagens transparentes e películas protetoras, por exemplo. Em um béquer contendo 17 mL de água destilada, adicionou-se 34 mg de glicerina (Neon, Lote 65926). Colocou-se o sistema sob vigorosa agitação a 70 °C e adicionou-se lentamente 340 mg de GG em pó (CP Kelco Brasil, Lote1C8430A); manteve-se o meio sob aquecimento e agitação até completa homogeneização. Em seguida, verteu-se a solução em uma placa de Petri de 10 cm de diâmetro. Após secagem à temperatura ambiente de 21 °C, os filmes formados foram removidos por destacamento [91].

#### **3.2 Preparo dos Filmes Nanocompósitos de GG**

Em um béquer contendo 17 mL de água destilada, adicionou-se 34 mg de glicerina (Neon, Lote 65926) Colocou-se o sistema sob vigorosa agitação a 70 °C e adicionou-se lentamente 340 mg de GG em pó (CP Kelco Brasil, Lote1C8430A). Em seguida, foi adicionada a suspensão de CNCs contendo 3,4 mg, 17 mg e 34 mg de CNCs, o que corresponde a 1%, 5% e 10% da quantidade total de GG, respectivamente. Manteve-se o meio sob aquecimento e agitação até completa homogeneização. Em seguida, verteu-se a solução em uma placa de Petri de 10 cm de diâmetro. Após secagem à temperatura ambiente de 21 °C, os filmes formados foram removidos por destacamento. Os filmes de GG reforçados com 1%, 5% e 10% de a-CNCs foram nomeados GG1 a-CNCs, GG5 a-CNCs e GG10 a-CNCs, respectivamente. Os filmes de GG reforçados com 1%, 5% e 10% de e-CNCs foram nomeados GG1 e-CNCs, GG5 e-CNCs e GG10 e-CNCs, respectivamente.

#### **3.3 Microscopia Eletrônica de Varredura**

A caracterização morfológica da seção transversal das amostras por meio da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) de Alta Resolução com Emissão por Campo foi realizada no microscópio eletrônico *Jeol JSM 7500F* com aceleração de

voltagem de 2,00 kV. A amostra foi previamente congelada em nitrogênio líquido para evitar danos à seção transversal e quebra por flexão. As amostras foram acomodadas em *stub* de latão com o auxílio de fita dupla face de carbono e recobertas com carbono no metalizador *Bal-Tec SCD 050 Sputter Coater*.

### **3.4 Espectroscopia UV-Visível**

A transparência dos filmes foi analisada por medidas de transmitância de luz em um espectrômetro de UV-Visível PerkinElmer modelo LAMBDA 365. As medidas de absorção foram obtidas no intervalo de 200 a 700 nm com resolução de 1 nm e taxa de varredura de 600 nm/min. Posto que houve pequena variação na espessura dos filmes, conforme verificado através da medição empregando-se o micrômetro digital, a espessura do filme GG foi utilizado como padrão para normalizar a transmitância dos demais materiais.

### **3.5 Ensaio Mecânico**

O teste mecânico para determinação dos valores de módulo de elasticidade, alongamento total e tensão de ruptura foi realizado de acordo com a norma ASTM D882-02, que é empregada especificamente para materiais com menos de 1mm de espessura. As medidas de espessura dos filmes foram realizadas em triplicata com o auxílio de um micrômetro digital (Mitutoyo, Modelo 293-821-30, capacidade de 0-25 mm, resolução 0,001 mm). Para a produção dos corpos de prova, os filmes foram preparados em fôrmas de silicone retangulares e cortados em tiras retangulares de dimensão 10 cm x 2,5 cm. Os corpos de prova foram armazenados em dessecador em ambiente controlado nas 48 horas anteriores ao teste mecânico. O ensaio foi realizado em um texturômetro (TA XT.plus) nas dependências do Centro Multiusuário de Funcionalidade de Macromoléculas (CEMFUM/ZEA – USP, Campus Pirassununga), nas seguintes condições: velocidade de estiramento de  $0,06 \text{ mms}^{-1}$  ( $3,6 \text{ mmmin}^{-1}$ ), distância entre as garras de 6 cm e célula de carga de 5 kgf (49 Newton). Foram ensaiados quatro corpos de prova de cada amostra. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e ao teste de Tukey em um nível de confiança de 95% para verificar possíveis diferenças entre pares de médias em relação ao módulo de elasticidade, tensão de ruptura e deformação na ruptura, utilizando-se o software OriginPro 8.5.

### 3.6 Avaliação da Citotoxicidade Celular dos Filmes

Para o ensaio, utilizou-se fibroblastos murino derivados de tecido conjuntivo (L929) adquiridos da ATCC (American Type Culture Collection), que foram gentilmente cedidas pelo laboratório da Prof<sup>a</sup>. Gisele Faria da Faculdade de Odontologia de Araraquara/UNESP.

Inicialmente, as células foram cultivadas em meio de Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM, do inglês *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) e antibióticos (penicilina 100 U/mL; estreptomicina 0,1 mg/mL), com posterior incubação em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após dois repiques consecutivos, iniciou-se o ensaio de citotoxicidade, empregando-se uma concentração de 2x10<sup>4</sup> células/poço em placa de 96 poços. A placa foi mantida por 24 horas em incubadora, respeitando-se os mesmos parâmetros de temperatura e porcentagem de CO<sub>2</sub> descritos anteriormente.

Paralelamente ao plaqueio das células, os meios de extração empregando-se os filmes foram preparados de acordo com a ISO 10993-12 [83]. Para tal, 1 cm<sup>2</sup> de cada amostra foi disposto em tubo cônico de 15 mL e mantido sob radiação ultravioleta por 30 minutos. Em seguida, 1 mL de meio de cultura (DMEM + 10% de SFB) foram adicionados em cada tubo. As amostras em contato com os meios foram deixadas sob agitação por 24 horas a 37 °C. Finalizado o período de agitação, os meios foram filtrados em filtro de seringa 0.22 µm. Após a filtragem, os meios de extração oriundos de cada amostra foram adicionados sobre a monocamada celular empregando 100 µL/poço, seguido da incubação em estufa de CO<sub>2</sub> por mais 24 horas. Decorridas as 24 horas de tratamento, os meios de extração foram removidos, seguido da lavagem com tampão fosfato salino (PBS, do inglês Phosphate Buffer Saline) por duas vezes consecutivas. Finalizada essa etapa, 100 µL de MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) previamente diluída na concentração de 1 mg/mL foram adicionados em cada poço. A placa foi novamente incubada a 37°C, ao abrigo da luz, até a formação dos cristais violeta de formazana (3 horas). Finalizado o período de incubação, o MTT foi retirado dos poços e os cristais de formazana formados foram dissolvidos adicionando-se 50 µL de álcool isopropílico absoluto.

Os valores de absorvância (Abs) foram obtidos em espectrofotômetro de microplacas (SoftMax® Pro 5), com leitura em comprimento de onda a 570 nm.

Como controle de sobrevivência, as células foram tratadas com DMEM + 10% SFB, enquanto para o branco, os poços foram mantidos somente com os reagentes empregados em cada etapa do ensaio. Os experimentos foram conduzidos em triplicata, em três ensaios independentes, incluindo os controles [92]. Com os valores de Abs, calculou-se a média da porcentagem de viabilidade celular em relação ao controle de sobrevivência (100%), conforme apresentado pela equação abaixo (norma ISO 10993-5) [93]:

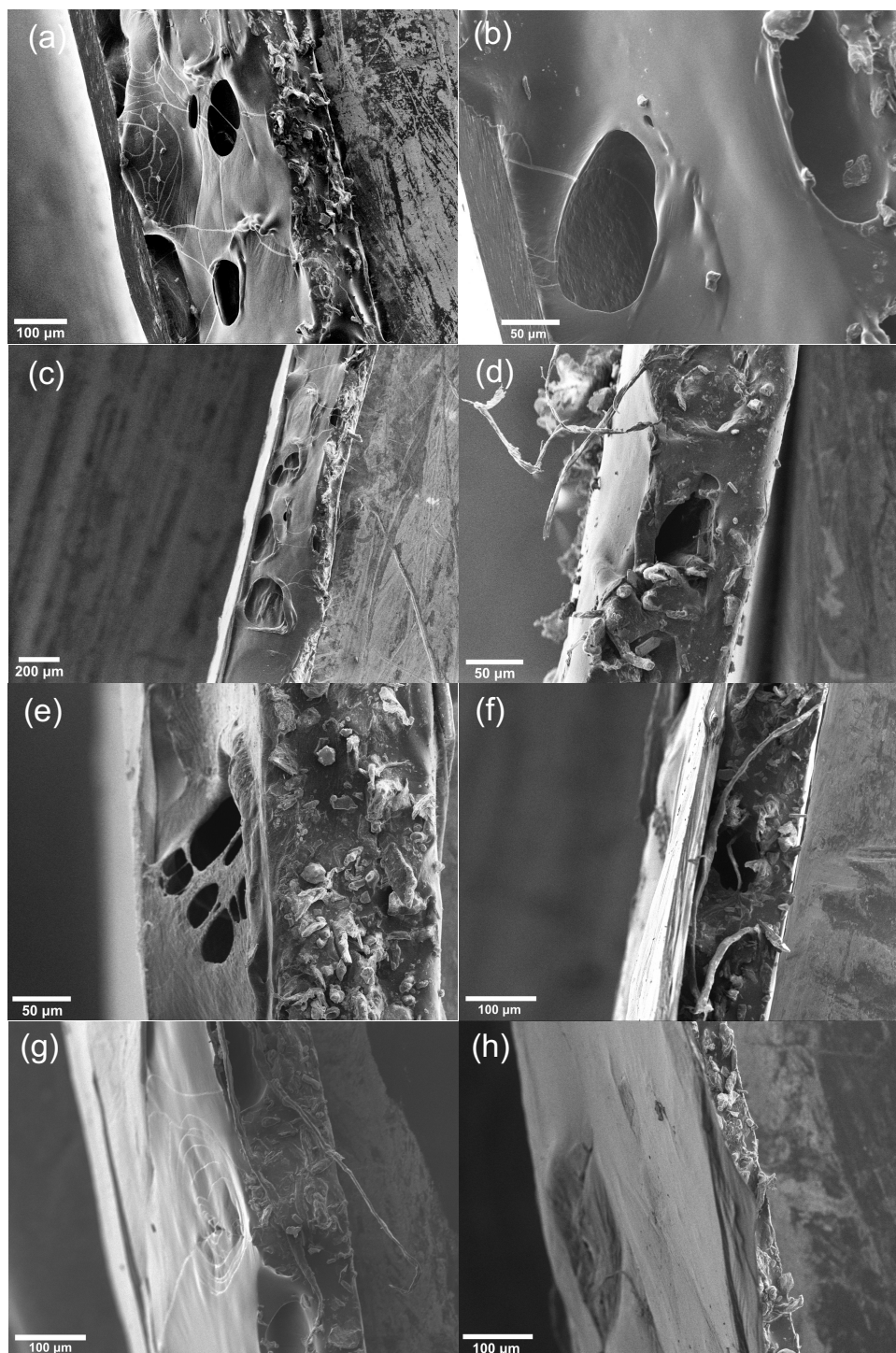
$$\frac{(Abs\ da\ amostra - Abs\ branco)}{(Abs\ do\ controle\ de\ sobrevivência - Abs\ branco)} \times 100$$

## 4. Resultados e Discussão

### 4.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A **Fig. 28** exibe as micrografias dos filmes GG e compósitos reforçados com a-CNCs e e-CNCs. Nas **Figs. 28a** e **28b** observa-se que o filme de GG apresenta superfície densa, lisa e não-uniforme, com presença de poros micrométricos. Ainda, se verifica que a matriz é permeada por partículas de GG de tamanhos variados e formato irregular firmemente compactadas. Essa mesma morfologia foi observada em estudos anteriores [94, 95] nos quais se constatou, tal qual no presente estudo, que o processo de gelificação termo-induzido não foi capaz de produzir uma matriz de GG homogênea nas condições empregadas.

Nas **Figs. 28c - 28h** é possível observar que os filmes nanocompósitos apresentam morfologia similar ao filme de GG. Entretanto, as micrografias revelam a presença de estruturas filiformes incorporadas à matriz, possivelmente nanofibras de celulose haja vista que tais estruturas foram observadas previamente nas imagens de MET dessas partículas.

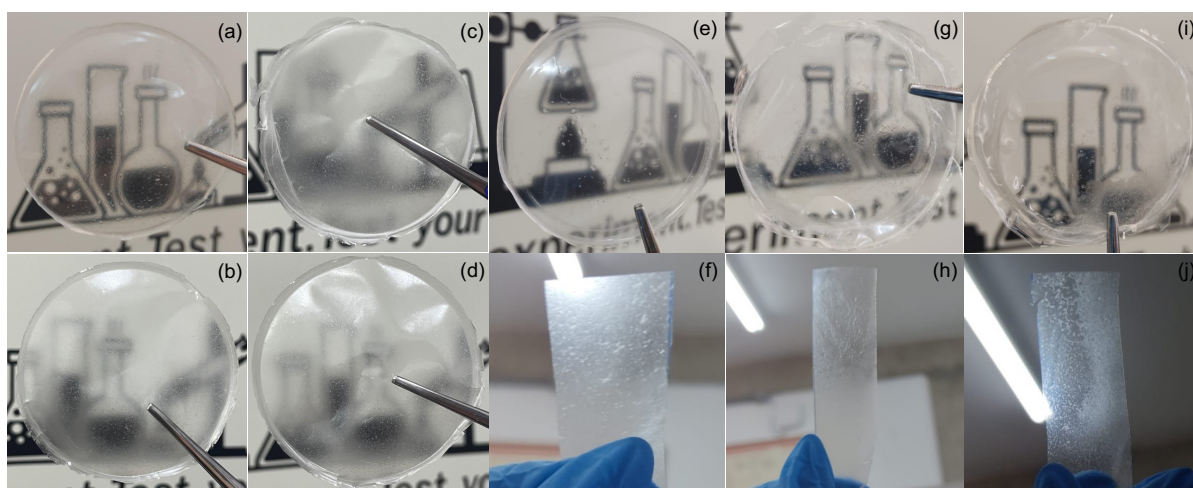


**Figura 28.** Microscopias Eletrônicas de Varredura da (a) seção transversal do filme GG, (b) superfície do filme GG, (c) seção transversal do filme GG1 a-CNCs, (d) seção transversal do filme GG5 a-CNCs, (e) seção transversal do filme GG10 a-CNCs, (f) seção transversal do filme GG1 e-CNCs, (g) seção transversal do filme GG5 e-CNCs, (h) seção transversal do filme GG10 e-CNCs

## 4.2 Espectroscopia UV-Visível

A **Fig. 29** apresenta os filmes obtidos após o processo de secagem. Observa-se que o filme de GG apresenta boa transparência e homogeneidade. Os filmes

nanocompósitos reforçados com a-CNCs se mostram homogêneos, porém se observa com menos detalhes a imagem atrás dos materiais, o que indica que esses filmes são menos transparentes (mais translúcidos) do que o filme de GG. Isso acontece, possivelmente, devido à presença de microbolhas de ar e/ou baixa dispersão dos a-CNCs na matriz polimérica haja vista que, a princípio, essas nanoestruturas não interferem na transparência do material dado que suas dimensões são menores que o comprimento de onda da luz visível. Os filmes nanocompósitos reforçados com e-CNCs, por sua vez, se mostram menos homogêneos: observa-se no material algumas regiões transparentes e outras mais translúcidas, notadamente nas bordas dos filmes, possivelmente devido a e-CNCs/nanofibras de celulose aglomerados nessas regiões.

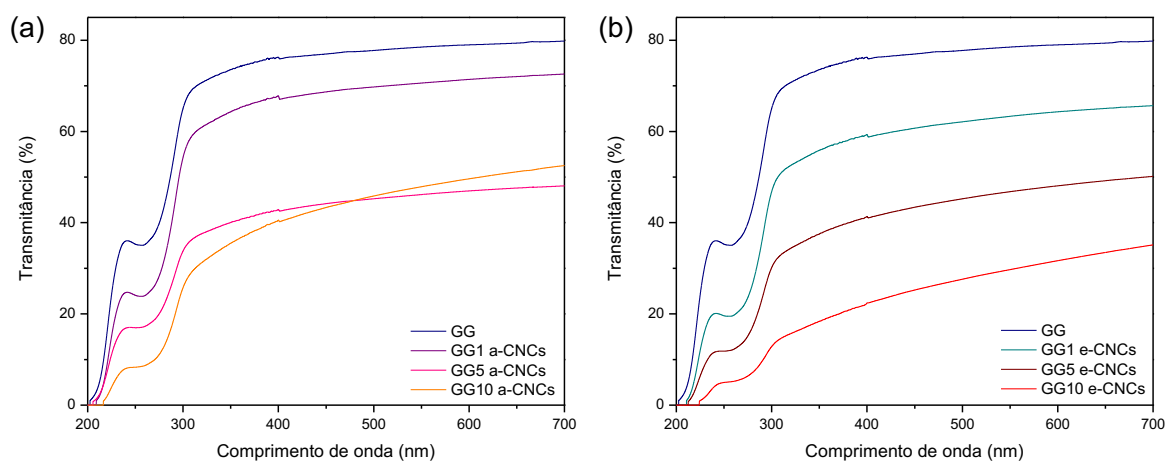


**Figura 29.** Fotos dos filmes (a) GG (b) GG1 a-CNCs, (c) GG5 a-CNCs, (d) GG10 a-CNCs, (e) GG1 e-CNCs, (f) GG1 e-CNCs na região mais translúcida (g) GG5 e-CNCs, (h) GG5 e-CNCs na região mais translúcida (i) GG10 e-CNCs, (j) GG10 e-CNCs na região mais translúcida

A **Fig. 30** exibe os espectros UV-Vis obtidos para os filmes puro e compósitos de GG. Em consonância com o aspecto visual dos filmes, as curvas obtidas indicam que os filmes reforçados com a-CNCs apresentam, na mesma porcentagem de reforço, maior transmitância do que os reforçados com e-CNCs nas regiões mais translúcidas. Particularmente, observa-se que em 550 nm os filmes nanocompósitos reforçados com a-CNCs exibem transmitância entre 45 – 70%, enquanto que os reforçados com e-CNCs exibem transmitância entre 30 – 65%; o filme de GG se mostra como o mais transparente em 550 nm, com transmitância de 78%.

Filmes poliméricos de alta transparência, como é o caso do filme de GG, são materiais de considerável interesse no meio acadêmico e na indústria por serem

amplamente empregados no desenvolvimento de dispositivos eletrônicos flexíveis. Produtos de alto valor agregado como telas e sensores flexíveis são exemplos de dispositivos que requerem esse tipo de plataforma [96]. A indústria alimentícia também tem grande interesse em desenvolver embalagens que apresentem alta transmitância uma vez que elas permitem que o consumidor veja com clareza o produto e avalie diretamente seu aspecto, o que é necessário em diversas ocasiões para a tomada de decisão do cliente [97].



**Figura 30.** Espectros de transmissão no UV-Vis da GG e dos filmes nanocompósitos reforçados com (a) a-CNC e (b) e-CNCs

### 4.3 Difração de Raios-X (DRX)

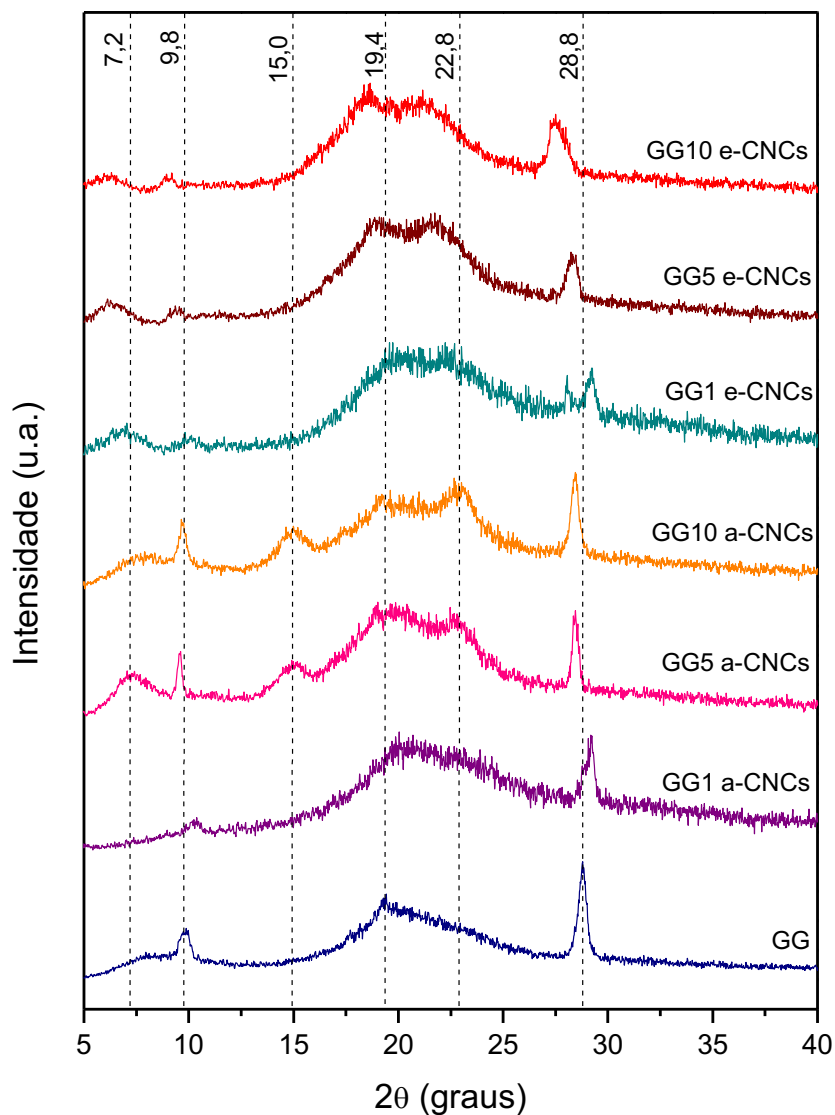
Os difratogramas dos materiais são exibidos na **Fig. 31** a seguir. O filme GG apresenta picos alargados em  $2\theta = 9,8^\circ$  e  $19,4^\circ$ , conforme reportado na literatura [98, 99, 100]. O pico em  $28,8^\circ$  característico da porção cristalina do polímero indica a formação de ligações de hidrogênio entre as cadeias de GG, que apresenta estrutura heterogênea composta por regiões amorfas intercaladas por regiões cristalinas [100].

Nos difratogramas dos filmes nanocompósitos de GG com maior concentração de CNCs é observado um padrão de difração diferente. No caso dos materiais compósitos modificados com a-CNCs, observa-se novos picos alargados em  $2\theta = 7,2^\circ$  característico da GG [98, 99], em  $2\theta = 15^\circ$  que corresponde aos planos cristalográficos (100), (110) e (010) da celulose tipo  $I\alpha$  e  $I\beta$  [74] e em  $2\theta = 22,8^\circ$  referente à contribuição da porção amorfa da GG [98, 99, 100] e dos planos (110) e (200) da celulose tipo  $I\alpha$  e  $I\beta$  [74]. O padrão de difração dos materiais modificados com e-CNCs é semelhante ao reportado anteriormente, porém os picos de difração



se mostram deslocados para a esquerda em aproximadamente um grau. Essa diferença se deve a uma alteração na rede cristalina da GG, que gera uma mudança na posição angular dos picos de difração.

Assim, tem-se que, de maneira geral, os filmes nanocompósitos apresentam contribuições de ambos os componentes e que a presença dos CNCs não alterou significativamente a GG em termos estruturais.

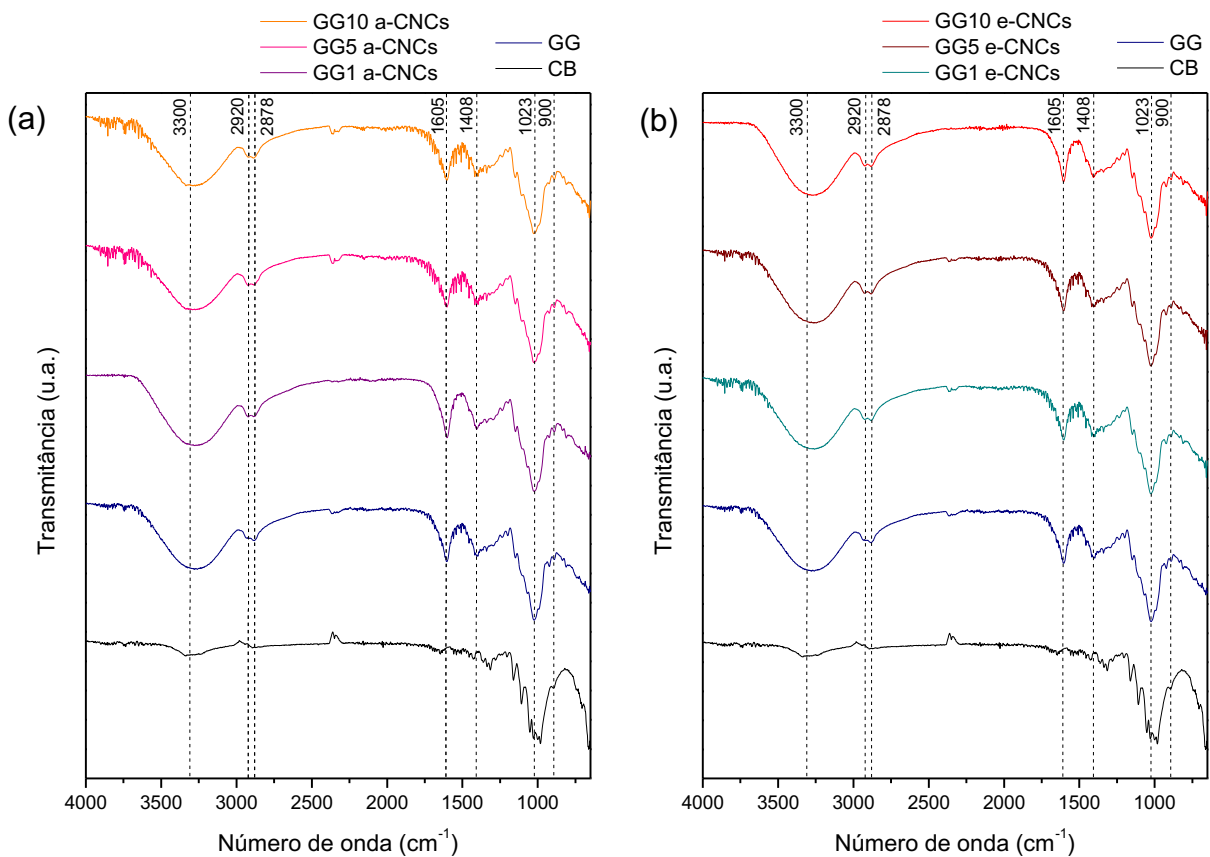


**Figura 31.** Difratogramas de raios-X da GG e dos filmes nanocompósitos reforçados com (a) a-CNCs e (b) e-CNCs

#### 4.4 Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier por Reflectância Total Atenuada (FTIR-ATR)

Nas **Figs. 32a e 32b** são apresentados os espectros de FTIR-ATR dos filmes GG e compósitos de GG reforçados com a-CNCs e e-CNCs, respectivamente. Observa-

se que os filmes nanocompósitos apresentam as mesmas bandas de absorção características da GG e celulose, notadamente com o mesmo perfil de absorção da matriz de GG. As bandas de absorção presentes são:  $3300\text{ cm}^{-1}$  - deformação axial da ligação O-H;  $2920\text{ cm}^{-1}$  e  $2878\text{ cm}^{-1}$  - estiramento C-H dos grupos  $\text{CH}_2$  e  $\text{CH}_3$ ;  $1408\text{ cm}^{-1}$  - deformação angular simétrica de C-H;  $1023\text{ cm}^{-1}$  - deformações axiais da ligação C-O;  $1605\text{ cm}^{-1}$  e  $900\text{ cm}^{-1}$  - deformações axiais das ligações glicosídicas C-O-C [74, 98]. A banda alargada em  $3300\text{ cm}^{-1}$  é mais intensa para os filmes de GG devido a maior quantidade de moléculas de água adsorvidas na superfície desses materiais.



**Figura 32.** Espectro vibracional na região do infravermelho da CB, GG e dos filmes nanocompósitos reforçados com (a) a-CNCs e (b) e-CNCs

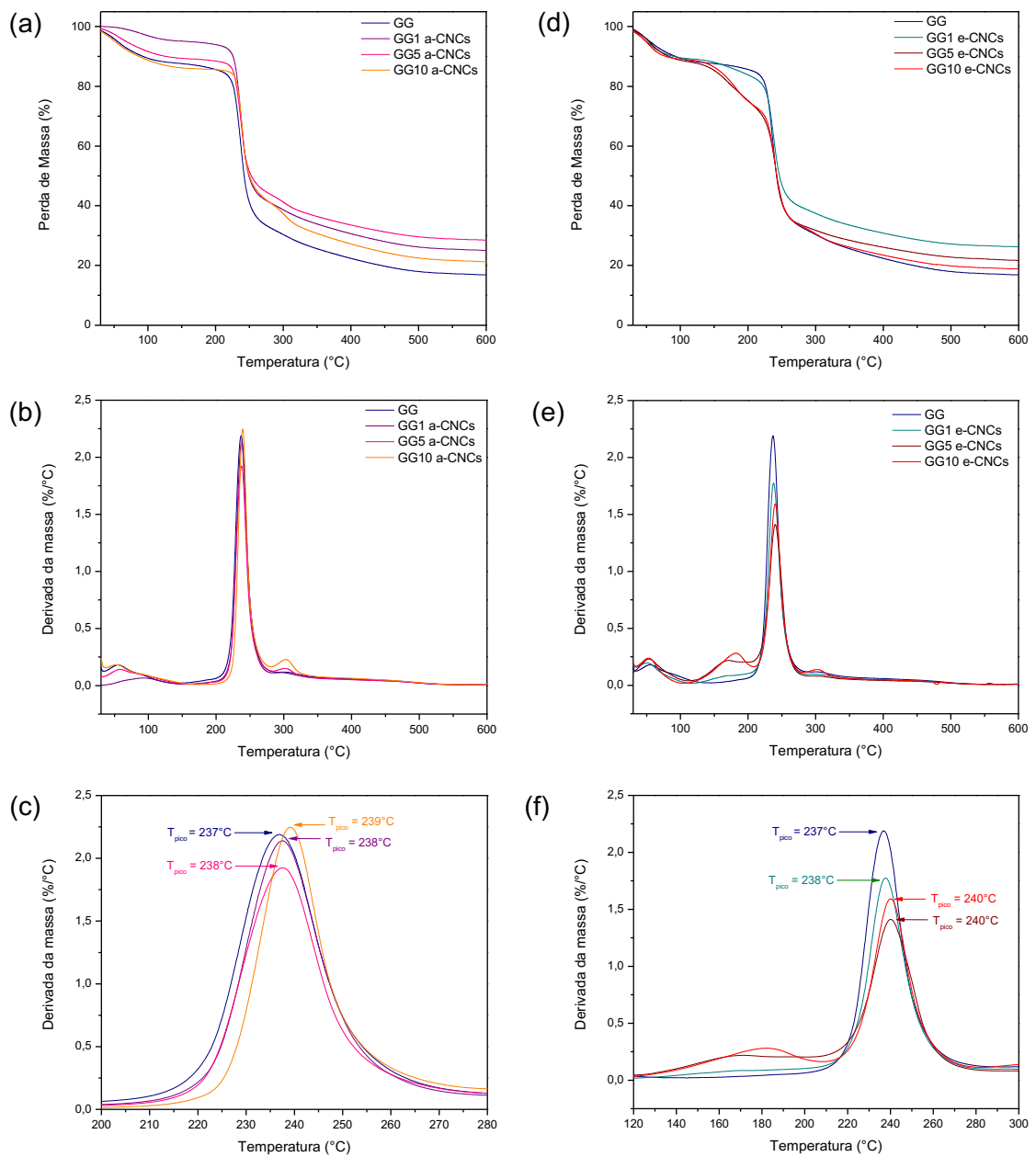
#### 4.5 Caracterização Térmica

Na **Fig. 33** são apresentadas as curvas TG e DTG dos filmes obtidos e na **Fig. 34** são exibidas as curvas DSC dos materiais.

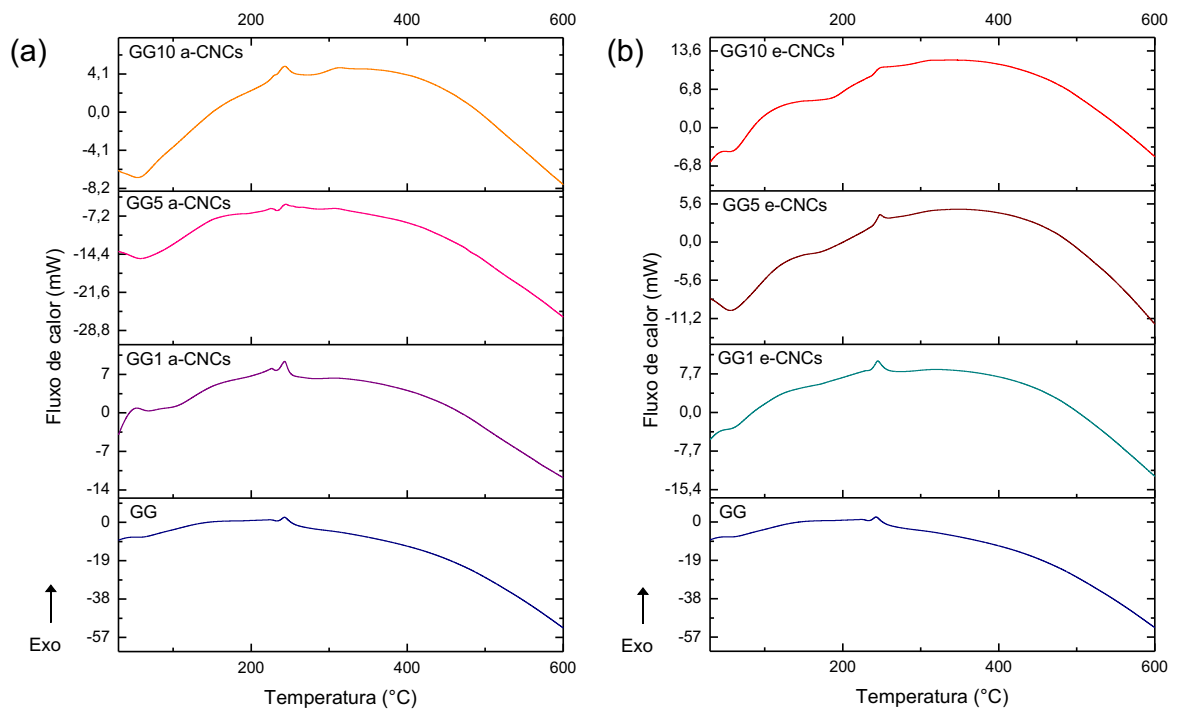
Na **Fig. 33a** observa-se que o perfil de perda de massa dos filmes nanocompósitos reforçados com a-CNCs é semelhante ao do filme de GG. O

primeiro evento de perda de massa, que ocorre entre 30-115 °C, se refere à perda de água na superfície dos materiais. Essa perda de massa foi de 11,5% para a GG e de 4,0%, 9,4% e 12,4% para os filmes nanocompósitos GG1 a-CNCs, GG5 a-CNCs e GG10 a-CNCs, respectivamente. Dessa forma, tem-se que os a-CNCs adicionados em menor quantidade diminuíram a perda de água de superfície das amostras, que é um evento endotérmico e pode ser observado nas curvas DSC (**Fig. 34a**). O segundo evento de perda de massa (endotérmico) ocorre entre 200-280 °C e está associado à decomposição da GG, notadamente da cadeia carbônica do polímero [100]; essa perda foi de 52,9% para GG e GG1 a-CNCs e de 44,4% para os filmes GG5 a-CNCs e GG10 a-CNCs. Conforme observado nas curvas DTG (**Fig. 33b e 33c**), a presença dos a-CNCs não altera expressivamente o processo e a temperatura de degradação da matriz polimérica de GG. Após 280 °C, a perda de massa é contínua e gradual; a massa residual foi de 16,8% para a GG e de 25%, 28,5% e 21,2 % para os filmes nanocompósitos GG1 a-CNCs, GG5 a-CNCs e GG10 a-CNCs, respectivamente.

Na **Fig. 33d** observa-se que o perfil de perda de massa dos filmes nanocompósitos reforçados com 5% e 10% de e-CNCs divergem significativamente do filme de GG, apresentando decomposição em duas etapas. A perda de massa associada à água superficial (evento endotérmico, conforme observado na **Fig. 34b**) foi de 10,7%, 11,9% e 11,2% para os filmes nanocompósitos GG1 e-CNCs, GG5 e-CNCs e GG10 e-CNCs, respectivamente, tendo os e-CNCs pouca influência sobre a perda de água de superfície da GG. Conforme observado nas curvas DTG (**Fig. 33e e 33f**), a presença dos e-CNCs nas concentrações de 5% e 10% altera expressivamente o processo e a temperatura inicial de degradação dos filmes poliméricos de GG, possivelmente devido à presença de aglomerados de nanofibras residuais de celulose e de e-CNCs. Após 280 °C, entretanto, a perda de massa é contínua e gradual para todos os filmes; a massa residual foi de 26,2%, 21,7% e 18,98% para os filmes nanocompósitos GG1 e-CNCs, GG5 e-CNCs e GG10 a-CNCs, respectivamente.



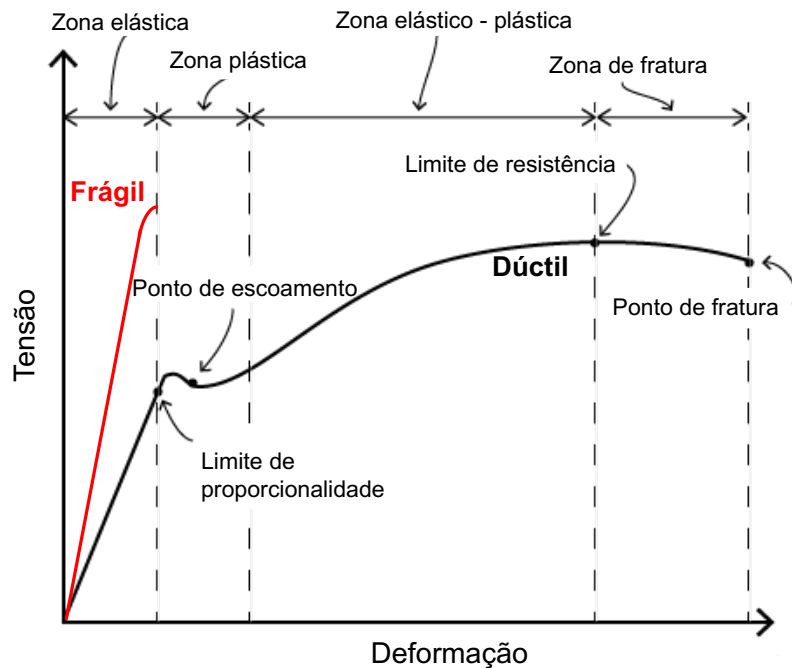
**Figura 33.** Caracterização Térmica: Curvas (a) TG, (b) DTG e (c) DTG aproximada da GG e dos filmes nanocompósitos reforçados com a-CNCs; Curvas (d) TG, (e) DTG e (f) DTG aproximada da GG e dos filmes nanocompósitos reforçados com e-CNCs



**Figura 34.** Caracterização Térmica: Curvas DSC da GG e dos filmes nanocompósitos reforçados com (a) a-CNCs e (b) e-CNCs

#### 4.6 Avaliação das Propriedades Mecânicas

A Fig. 35 a seguir ilustra curvas tensão-deformação típicas de materiais frágeis e dúcteis obtidas a partir de um ensaio de tração.



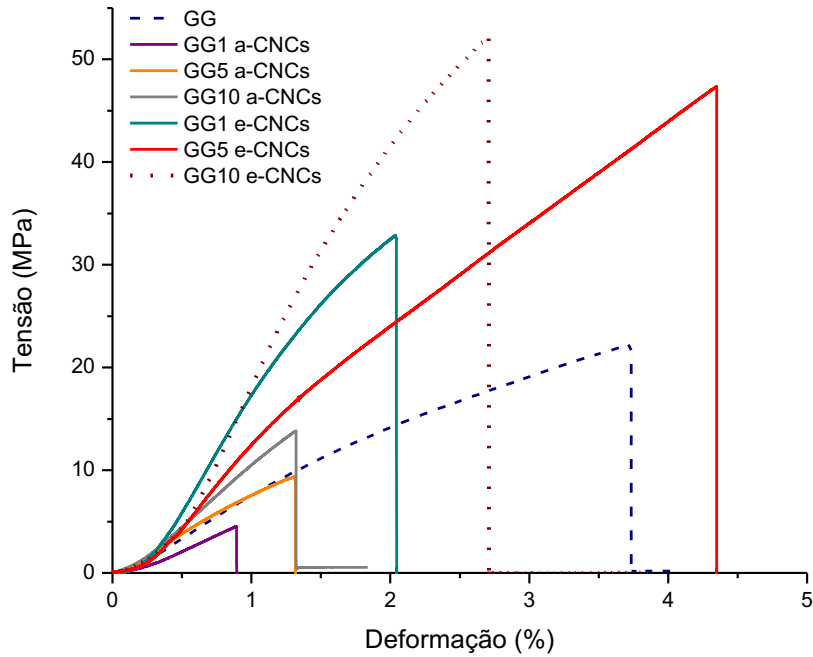
**Figura 35.** Curvas tensão-deformação obtidas em um ensaio de tração [101] (Adaptado)

Quando submetidos à tração uniaxial, materiais dúcteis inicialmente apresentam comportamento elástico, ou seja, a tensão e a deformação tendem a aumentar linearmente e, se a carga for retirada, o corpo retorna à sua forma original. Nesta primeira região da curva, chamada de zona elástica, é possível determinar o módulo de elasticidade do material, também conhecido por módulo de Young, que é proporcional à rigidez do material [101, 102, 103].

A partir do ponto denominado limite de proporcionalidade, o corpo entra no regime plástico de deformação, ou seja, se a tensão é removida, o material não é capaz de retornar ao seu estado original. A partir do ponto de escoamento, o corpo se deforma até uma tensão limite, denominado limite de resistência. A partir da tensão máxima, tem início a estrição e, por fim, a ruptura. A tensão e a deformação nesse ponto são chamadas de tensão de ruptura e deformação na ruptura. Materiais frágeis, por sua vez, praticamente não apresentam domínio plástico, rompendo-se facilmente na fase elástica [101, 102, 103].

Ainda, com base na curva tensão-deformação obtida através do ensaio de tração, é possível estimar a tenacidade de um material por meio da área abaixo da curva. A tenacidade é uma medida da energia mecânica total absorvida por um material (energia elástica e energia plástica) até sua fratura [103].

A **Fig. 36** apresenta as curvas tensão-deformação obtidas nos ensaios de tração a partir de um corpo de prova de cada amostra. Observa-se que os filmes apresentam comportamento típico de material frágil e que a tensão de ruptura e a deformação na ruptura mostram-se maiores para os materiais modificados com e-CNCs em comparação aos modificados com a-CNCs.



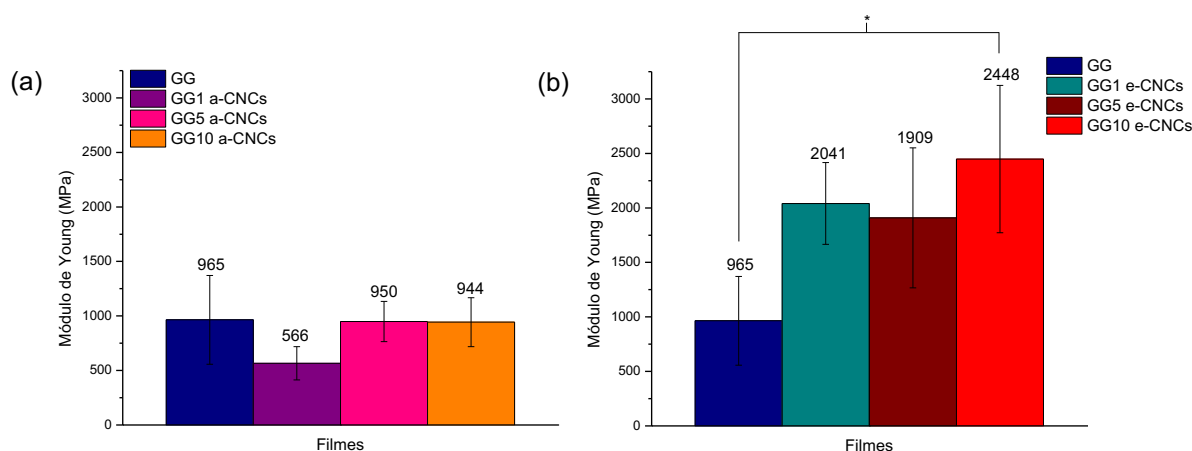
**Figura 36.** Curvas tensão-deformação obtidas no ensaio de tração a partir de um corpo de prova de cada filme produzido

A **Tabela 5** exibe os valores de média e desvio-padrão relativos ao módulo de elasticidade, tensão de ruptura, deformação na ruptura e tenacidade obtidos a partir dos ensaios de tração realizados com os filmes produzidos. Esses mesmos valores bem como o resultado dos testes estatísticos aplicados nos três primeiros casos são apresentados por meio de gráficos de barras nas **Figs. 37, 38 e 39**. O módulo de elasticidade dos filmes de GG preparados neste trabalho foi determinado em  $965 \pm 407$ , enquanto os valores de tensão de ruptura e deformação na ruptura foram determinados em  $17,1 \pm 4,1$  MPa e  $2,7 \pm 1,0\%$ , respectivamente. Criado P. et al. (2015) [104] avaliaram estas mesmas propriedades em filmes de GG, porém preparados com menor concentração de plastificante (1% m/v de GG e 1% m/m de glicerina). Nesse estudo, o módulo de elasticidade dos filmes foi determinado em  $\cong 650$  MPa e os valores de tensão de ruptura e deformação na ruptura foram determinados em 37 MPa e 11%, respectivamente.

**Tabela 5.** Módulo de elasticidade, tensão de ruptura e deformação na ruptura calculados a partir das curvas tensão x deformação dos materiais

	Módulo de Elasticidade (MPa)	Tensão de Ruptura (MPa)	Deformação na Ruptura (%)	Tenacidade ( $\text{Jm}^{-3}$ )
GG	965 ± 407	17,1 ± 4,1	2,7 ± 1,0	(18,3 ± 17,1)·10 <sup>6</sup>
GG1 a-CNCs	566 ± 153	4,3 ± 1,1	1,0 ± 0,4	(1,6 ± 0,5)·10 <sup>6</sup>
GG5 a-CNCs	950 ± 184	7,7 ± 4,7	1,0 ± 0,5	(4,8 ± 4,8)·10 <sup>6</sup>
GG10 a-CNCs	944 ± 224	9,5 ± 3,0	1,3 ± 0,1	(4,8 ± 2,3)·10 <sup>6</sup>
GG1 e-CNCs	2041 ± 375	33,5 ± 4,5	2,3 ± 0,6	(32,8 ± 15,5)·10 <sup>6</sup>
GG5 e-CNCs	1909 ± 642	40,8 ± 21,4	2,9 ± 0,9	(72,1 ± 50,1)·10 <sup>6</sup>
GG10 e-CNCs	2448 ± 675	40,6 ± 9,7	2,6 ± 1,0	(45,3 ± 24,6)·10 <sup>6</sup>

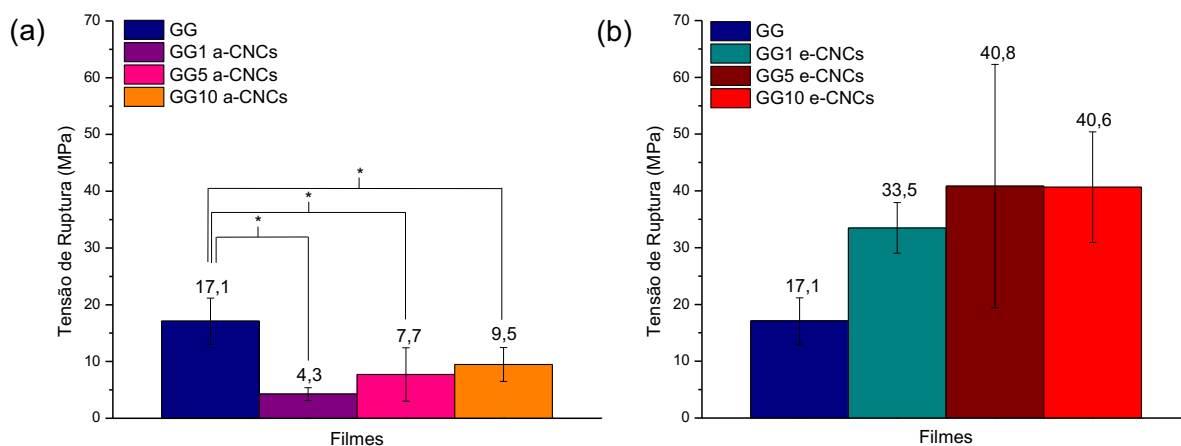
Observa-se nas **Figs. 37a** e **37b** que, no geral, os valores de módulo de elasticidade são maiores para os filmes reforçados com e-CNCs em relação aos reforçados com a-CNCs. Conforme exibido na **Fig. 37a**, os valores de módulo de elasticidade dos filmes GG e modificados com a-CNCs não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre si, o que significa que os a-CNCs não tiveram efeito sobre a rigidez da GG nas concentrações testadas. Na **Fig. 37b** observa-se uma diferença estatisticamente significativa entre módulo de elasticidade do filme GG e do filme GG10 e-CNCs: os valores demonstram que os e-CNCs empregados na concentração de 10% aumentaram a rigidez da matriz polimérica. Esse resultado demonstra o potencial competitivo que os CNCs, particularmente os e-CNCs, apresentam para serem empregados como agentes capazes de aumentar a rigidez de matrizes poliméricas, alterando suas propriedades mecânicas.



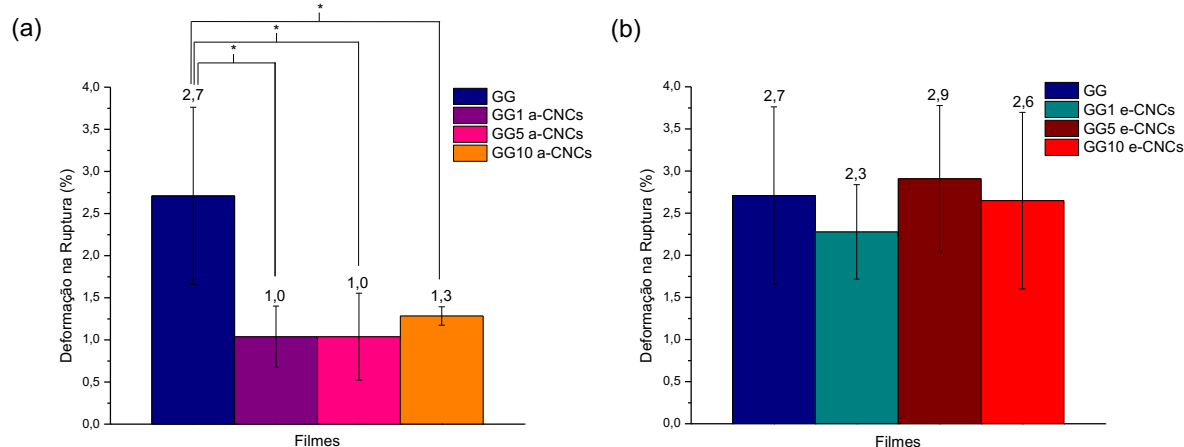
**Figura 37.** Módulo de elasticidade dos filmes nanocompósitos reforçados com (a) a-CNCs e (b) e-CNCs



Embora a modificação da GG com a-CNCs não tenha impactado a rigidez da matriz, observa-se nas **Figs. 38a e 39a** que todos os filmes nanocompósitos tiveram diminuídas a tensão de ruptura e deformação na ruptura. A modificação com e-CNCs, entretanto, não foi capaz de impactar essas mesmas variáveis, conforme observado nas **Figs. 38b e 39b**.



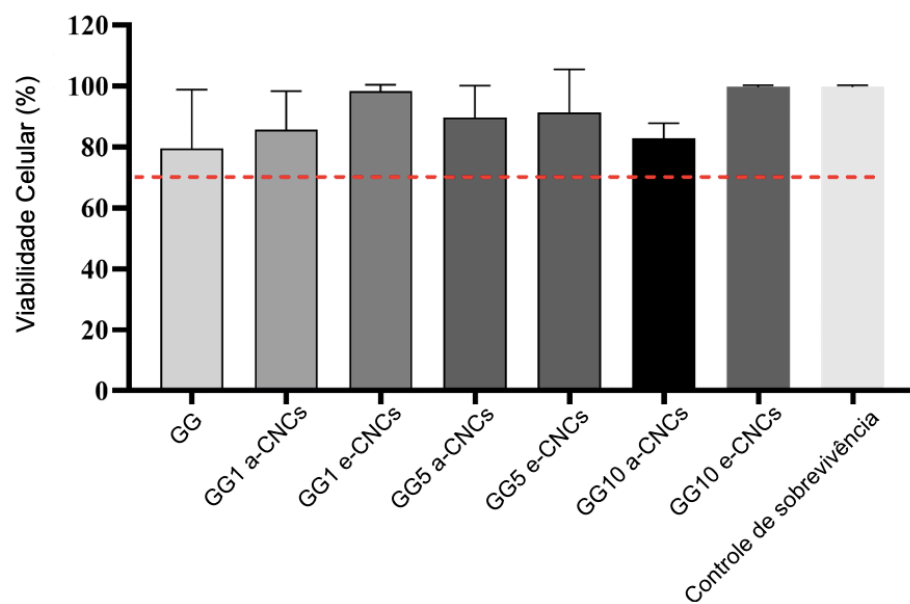
**Figura 38.** Tensão de ruptura dos filmes nanocompósitos reforçados com (a) a-CNCs e (b) e-CNCs



**Figura 39.** Deformação na ruptura dos filmes nanocompósitos reforçados com (a) a-CNCs e (b) e-CNCs

#### 4.7 Avaliação da Citotoxicidade Celular dos Filmes

De acordo com a **Fig. 40**, é possível verificar que nenhum dos materiais apresenta toxicidade para as células L929, haja vista a manutenção da viabilidade celular acima de 70% em todos os casos. Cabe ressaltar que, de acordo com a ISO 10993-5 [93], a viabilidade celular deve ser superior a 70% para que os materiais/dispositivos médicos testados sejam considerados atóxicos e seguros.



**Figura 40.** Viabilidade de células L929 após 24 horas de exposição aos filmes nanocompósitos pelo teste de MTT

## 5. Conclusões do Capítulo

Os filmes nanocompósitos de GG reforçados com a-CNCs mostraram-se mais homogêneos do que os reforçados com e-CNCs. Ambos a-CNCs e e-CNCs provocaram uma diminuição na transmitância dos filmes na região do UV-Vis, de forma que os filmes de GG, GG reforçados com a-CNCs e GG reforçados com e-CNCs apresentaram transmitância em 550 nm de 78%, entre 45 – 70% e entre 30 – 65%, respectivamente. A GG, que apresenta estrutura heterogênea composta por regiões amorfas intercaladas por domínios cristalinos, teve sua rede cristalina alterada pela presença dos CNCs nas concentrações de 5% e 10%. Os a-CNCs adicionados em menor quantidade (1% e 5%) diminuíram a perda de água de superfície das amostras, mas em nenhum caso alterou expressivamente o processo e a temperatura de degradação da matriz polimérica de GG. Os e-CNCs, por sua vez, tiveram pouca influência sobre a perda de água de superfície da GG, mas sua presença nas concentrações de 5% e 10% alterou expressivamente o processo e a temperatura inicial de degradação dos filmes poliméricos de GG, possivelmente devido à presença de aglomerados de nanofibras de celulose e de e-CNCs. Ainda, todos os filmes apresentaram viabilidade celular superior a 70% frente a células L929, indício de que são atóxicos e seguros. Por fim, os filmes apresentam comportamento típico de material frágil, de forma que os a-CNCs não tiveram efeito sobre a rigidez da GG nas concentrações testadas, mas apenas os e-CNCs empregados na concentração de 10% aumentaram a rigidez da matriz polimérica. Particularmente, os valores de módulo de elasticidade, tensão de ruptura, deformação na ruptura e tenacidade dos filme de GG foram determinados em  $965 \pm 407$  MPa,  $17,1 \pm 4,1$  MPa,  $2,7 \pm 1,0$  % e  $(18,3 \pm 17,1) \cdot 10^6$  Jm<sup>-3</sup> e para o filme GG10 e-CNCs em  $2448 \pm 675$  MPa,  $40,6 \pm 9,7$  MPa,  $2,6 \pm 1,0$  % e  $(45,3 \pm 24,6) \cdot 10^6$  Jm<sup>-3</sup>, respectivamente.

## Conclusões Finais

A micronização da CB em moinho de bolas se mostrou um processamento mecânico eficaz na produção de um material de partida para extração de CNCs via hidrólise enzimática. Esse tratamento não alterou a estrutura química do polímero, mas promoveu um aumento no ICr (de 70,5% para 79,2%) e uma diminuição no GP (de 1576 para 1388) e na estabilidade térmica do material, com diminuição no valor da temperatura de máxima degradação de 352 °C para 341 °C. Os CNCs extraídos a partir da hidrólise com ácido sulfúrico 64%, os a-CNCs, mostraram-se mais estáveis em suspensão e apresentaram morfologia de agulhas com comprimento médio de 158 nm e largura de 11 nm, enquanto as condições empregadas de hidrólise enzimática levaram à formação de e-CNCs esféricos, com diâmetro médio variando de 48 – 56 nm. A incorporação de a-CNCs e e-CNCs na matriz de GG impactou as propriedades intrínsecas do filme polimérico, tendo causado uma diminuição na transmitância de 8 – 48% em 550 nm. Particularmente, o processo de degradação da matriz polimérica de GG foi afetado no caso dos filmes nanocompósitos reforçados com e-CNCs nas concentrações de 5% e 10%, os quais tiveram sua temperatura inicial de degradação diminuída e passaram a apresentar decomposição térmica em duas etapas. Por fim, apenas os e-CNCs empregados na concentração de 10% promoveram aumento na rigidez da matriz polimérica; os filmes GG e GG10 e-CNCs exibiram módulo de elasticidade de  $965 \pm 407$  MPa e  $2448 \pm 675$  MPa, respectivamente. No que se refere aos ensaios celulares, nenhum dos filmes apresentou efeito citotóxico sobre células L929.

## **Perspectivas**

Com o intuito de melhorar a homogeneidade dos filmes nanocompósitos reforçados com e-CNCs, tem-se por perspectiva adaptar/otimizar as condições experimentais de produção dos materiais e reavaliar suas propriedades mecânicas. Ainda, a fim de avaliar as possibilidades de utilização dos filmes preparados, tem-se também por perspectivas do trabalho realizar ensaios de permeabilidade ao vapor de água e ao oxigênio a fim de investigar o efeito da adição dos CNCs nessas propriedades e submeter os materiais produzidos ao ensaio mecânico de flexão.

## Bibliografia

- [1] H. Xie, H. Du, X. Yang, C. Si, "Recent Strategies in Preparation of Cellulose Nanocrystals and Cellulose Nanofibrils Derived from Raw Cellulose Materials," *International Journal of Polymer Science*, pp. 1–25, 2018.
- [2] H. Zhang, C. Chen, C. Zhu, D. Sun, "Production of Bacterial Cellulose by *Acetobacter Xylinum*: Effects of Carbon/Nitrogen-Ratio on Cell Growth and Metabolite Production," *Cellulose Chemistry and Technology*, vol. 50, pp. 997-1003, 2016.
- [3] H. G. de Oliveira Barud, R. R. da Silva, H. S. Barud, G. T. J. Agnieszka, W. R. Lustri, O. B. de Oliveira Junior, S. J. L. Ribeiro, "A Multipurpose Natural and Renewable Polymer in Medical Applications: Bacterial Cellulose," *Carbohydrate Polymers*, pp. 406-420, 2016.
- [4] H. S. Barud, T. Regiani, R. F. C. Marques, W. R. Lustri, Y. Messaddeq, S. J. L. Ribeiro, "Antimicrobial Bacterial Cellulose-Silver Nanoparticles Composite Membranes," *Journal of Nanomaterials*, pp. 1-8, 2011.
- [5] R. T. A. Machado, J. Gutierrez, A. Tercjak, E. Trovatti, F. G. M. Uahib, A. P. Nascimento, A. A. Berreta, S. J. L. Ribeiro, H. S. Barud, "Komagataeibacter rhaeticus as an alternative bacteria for cellulose production," *Carbohydrate Polymers*, vol. 152, pp. 841-849, 2016.
- [6] H. M. C. Azeredo, H. Barud, C. S. Farinas, V. M. Vasconcellos, A. M. Claro, "Bacterial Cellulose as a Raw Material for Food and Food Packaging Applications," *Frontiers in Sustainable Food Systems*, vol. 18, 2019.
- [7] P. R. Chawla, I. B. Bajaj, S. A. Survase, R. S. Singhal, "Microbial Cellulose: Fermentative Production and Applications," *Food Technology and Biotechnology*, vol. 47, pp. 107–124, 2009.
- [8] F. Esa, S. M. Tasirin, N. A. Rahman, "Overview of Bacterial Cellulose Production and Application," *Agriculture and Agricultural Science Procedia*, vol. 2, pp. 113–119, 2014.
- [9] L. D. Marestoni, H. d. S. Barud, R. J. Gomes, R. P. F. Catarino, N. N. Y. Hata, J. B. Ressutte, W. A. Spinosa, "Commercial and potential applications of bacterial cellulose in Brazil: ten years review," *Polímeros*, vol. 30, nº 4, pp. 1-19, 2020.
- [10] A. Basu, S. V. Vadanam, S. Lim, "A Novel Platform for Evaluating the Environmental Impacts on Bacterial Cellulose Production," *Scientific Reports*, vol. 8, p. 5780, 2018.
- [11] W. R. Lustri, H. G. de Oliveira Barud, H. d. S. Barud, M. F. S. Peres, J. Gutierrez, A. Tercjak, O. B. de Oliveira Junior, S. J. L. Ribeiro, "Microbial Cellulose — Biosynthesis Mechanisms and Medical Applications," *Cellulose - Fundamental Aspects and Current Trends*, IntechOpen, 2015.
- [12] M. Horue, J. M. da Silva, I. R. Berti, L. R. Brandão, H. d. S. Barud, G. R. Castro, "Bacterial Cellulose-Based Materials as Dressings for Wound Healing," *Pharmaceutics*, vol. 15, nº 2, p. 424, 2023.
- [13] K-Y Lee, G. Buldum, A. Mantalaris, A. Bismarck, "More Than Meets the Eye in Bacterial Cellulose: Biosynthesis, Bioprocessing, and Applications in Advanced Fiber Composites," *Macromolecular Bioscience*, vol. 14, nº 1, pp. 10-32, 2014.
- [14] D. Klemm, D. Schumann, U. Udhardt, S. Marsch, "Bacterial synthesized cellulose — artificial blood vessels for microsurgery," *Progress in Polymer Science*, vol. 26, nº 9, pp. 1561–1603, 2001.
- [15] M. S. Islam, L. Chen, J. Sisler e K. C. Tam, "Cellulose nanocrystal (CNC)–inorganic hybrid systems: synthesis, properties and applications," *Journal of Materials Chemistry B*, vol. 6, nº 6, pp. 864–883, 2018.
- [16] S. Gorgieva, J. Trček, "Bacterial Cellulose: Production, Modification and Perspectives in Biomedical Applications," *Nanomaterials*, vol. 9, nº 10, p. 1352, 2019.

- [17] J. C. Courtenay, M. A. Johns, F. Galembeck, C. Deneke, E. M. Lanzoni, C. A. Costa, J. L. Scott, R. I. Sharma, "Surface modified cellulose scaffolds for tissue engineering," *Cellulose*, vol. 24, n° 1, pp. 253-267, 2016.
- [18] S. Koizumi, Z. Yue, Y. Tomita, T. Kondo, H. Iwase, D. Yamaguchi, T. Hashimoto, "Bacterium organizes hierarchical amorphous structure in microbial cellulose," *The European Physical Journal E*, vol. 26, pp. 137-142, 2008.
- [19] M. Poletto, V. Pistor, A. J. Zattera, "Structural Characteristics and Thermal Properties of Native Cellulose," *Cellulose - Fundamental Aspects*, IntechOpen, 2013.
- [20] C. Zhong, "Industrial-Scale Production and Applications of Bacterial Cellulose," *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, n° 8, p. 605374, 2020.
- [21] M. Wada, H. Chanzy, Y. Nishiyama, P. Langan, "Cellulose III<sub>C</sub> Crystal Structure and Hydrogen Bonding by Synchrotron X-ray and Neutron Fiber Diffraction," *Macromolecules*, vol. 37, pp. 8548-8555, 2004.
- [22] H. Seddiqi, E. Oliaei, H. Honarkar, J. Jin, L. C. Geonzon, R. G. Bacabac, J. Klein-Nulend, "Cellulose and its derivatives: towards biomedical applications," *Cellulose*, vol. 28, pp. 1893–1931, 2021.
- [23] S. Torgbo, P. Sukyai, "Biodegradation and thermal stability of bacterial cellulose as biomaterial: The relevance in biomedical applications," *Polymer Degradation and Stability*, vol. 179, p. 109232, 2020.
- [24] G. F. Picheth, C. L. Pirich, M. R. Sierakowski, M. A. Woehl, C. N. Sakakibara, C. F. de Souza, A. A. Martin, R. da Silva, R. A. de Freitas, "Bacterial cellulose in biomedical applications: A review," *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 104 Part A, pp. 97–106, 2017.
- [25] H. Ullah, H. A. Santos, T. Khan, "Applications of bacterial cellulose in food, cosmetics and drug delivery," *Cellulose*, vol. 23, n° 4, pp. 2291–2314, 2016.
- [26] Y. Yamada, K. Hoshino, T. Ishikawa, "The phylogeny of acetic acid bacteria based on the partial sequences of 16S ribosomal RNA: The elevation of the subgenus *Gluconoacetobacter* to the generic level," *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, vol. 61, pp. 1244-1251, 1997.
- [27] A. V. S. Cebrian, R. S. Carvalho, A. R. J. Barreto, F. E. Maturi, H. S. Barud, R. R. Silva, C. Legnani, M. Cremona, S. J. L. Ribeiro, "Development of Conformable Substrates for OLEDs Using Highly Transparent Bacterial Cellulose Modified with Recycled Polystyrene," *Advanced Sustainable Systems*, vol. 2000258, pp. 1-7, 2021.
- [28] G. Pacheco, C. V. de Mello, B. G. Chiari-Andreo, V. L. B. Isaac, S. J. L. Ribeiro, E. Pecoraro, E. Trovatti, "Bacterial cellulose skin masks—Properties and sensory tests," *Journal of Cosmetic Dermatology*, pp. 1–8, 2017.
- [29] P. Melo, C. G. Otoni, H. d. S. Barud, F. Aouada, M. Moura, "Upcycling microbial cellulose scraps into nanowhiskers with engineered performance as fillers in all-cellulose composites," *ACS Applied Materials & Interfaces*, vol. 12, n° 41, pp. 46661–46666, 2020.
- [30] Y. Chen, L. Gan, J. Huang, A. Dufresne, "Reinforcing Mechanism of Cellulose Nanocrystals in Nanocomposites," em *Nanocellulose: From Fundamentals to Advanced Materials*, pp. 201-149, 2019.
- [31] A. Tran, C. E. Boott, M. J. MacLachlan, "Understanding the Self-Assembly of Cellulose Nanocrystals—Toward Chiral Photonic Materials," *Advanced Materials*, vol. 1905876, pp. 1-15, 2020.
- [32] A. Saini, C. Yadav, B.-L. Xue, N. Wang, L. Dai, X. Li, "Mixed Acid Assisted Hydrothermal Process for Simultaneous Preparation and Carboxylation of Needle-Shaped Cellulose Nanocrystals," *ACS Applied Polymer Materials*, pp. 1-42, 2019.
- [33] S. M. Choi, E. J. Shin, "The Nanofication and Functionalization of Bacterial Cellulose and Its Applications," *Nanomaterials*, vol. 10, n° 3, p. 406, 2020.

- [34] P. Singhsa, R. Narain, H. Manuspiya, "Bacterial Cellulose Nanocrystals (BCNC) Preparation and Characterization from Three Bacterial Cellulose Sources and Development of Functionalized BCNCs as Nucleic Acid Delivery Systems," *ACS Applied Nano Materials*, vol. 1, n° 1, pp. 209–221, 2017.
- [35] M. Giese, M. Spengler, "Cellulose nanocrystals in nanoarchitectonics – towards photonic functional materials," *Molecular Systems Design & Engineering*, 2018.
- [36] M. A. Hubbe, O. J. Rojas, A. L. Lucia, "Green Modification of Surface Characteristics of Cellulosic Materials at the Molecular or Nano Scale: A Review," *BioResources*, vol. 10, n° 3, pp. 6095-6206, 2015.
- [37] H. Duan, D. Wang, Y. Li, "Green chemistry for nanoparticle synthesis," *Chemical Society Reviews*, vol. 44, n° 16, pp. 5778–5792, 2015.
- [38] E. M. Obeng, S. N. N. Adam, C. Budiman, C. M. Ongkudon, R. Maas, J. Jose, "Lignocellulases: a review of emerging and developing enzymes, systems, and practices," *Bioresources and Bioprocessing*, vol. 4, n° 1, pp. 1-22, 2017.
- [39] C. L. Pirich, G. F. Picheth, A. M. Fontes, M. Delgado-Aguilar, L. P. Ramos, "Disruptive enzyme-based strategies to isolate nanocelluloses: a review," *Cellulose*, 2020.
- [40] X. Tong, W. Shen, X. Chen, M. Jia, J-C. Roux, "Preparation and mechanism analysis of morphology-controlled cellulose nanocrystals via compound enzymatic hydrolysis of eucalyptus pulp," *Journal of Applied Polymer Science*, vol. 48407, 2019.
- [41] L. R. Lima, D. B. Santos, M. V. Santos, H. S. Barud, M. A. Henrique, D. Pasquini, E. Pecoraro, S. J. L. Ribeiro, "Nanocrístais De Celulose A Partir De Celulose Bacteriana," *Química Nova*, vol. 38, n° 9, pp. 1140-1147, 2015.
- [42] N. F. Vasconcelos, J. P. A. Feitosa, F. M. P. da Gama, J. P. S. Morais, F. K. Andrade, M. d. S. M. de Souza Filho, M. d. F. Rosa, "Bacterial cellulose nanocrystals produced under different hydrolysis conditions: Properties and morphological features," vol. 155, pp. 425-431, 2017.
- [43] C. Rovera, M. Ghaani, N. Santo, S. Trabattoni, R. T. Olsson, D. Romano, S. Farris, "Enzymatic Hydrolysis in the Green Production of Bacterial Cellulose Nanocrystals," *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, vol. 6, n° 6, pp. 7725–7734, 2018.
- [44] R. Brandes, L. de Souza, C. Carminatti, D. Recouvreux, "Production with a High Yield of Bacterial Cellulose Nanocrystals by Enzymatic Hydrolysis," *International Journal of Nanoscience*, vol. 19, n° 3, p. 1950015, 2020.
- [45] D. K. Arserim-Uçar, F. Korel, L. Liu, K. L. Yam, "Characterization of bacterial cellulose nanocrystals: Effect of acid treatments and neutralization," *Food Chemistry*, p. 127597, 2020.
- [46] V. S. Soeiro, L. L. Tundisi, L. C. L. Novaes, P. G. Mazzola, N. Aranha, D. Grotto, J. M. O. Júnior, D. Komatsu, F. M. P. Gama, M. V. Chaud, A. F. Jozala, "Production of bacterial cellulose nanocrystals via enzymatic hydrolysis and evaluation of their coating on alginate particles formed by ionotropic gelation," *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications*, vol. 2, p. 100155, 2021.
- [47] D. Carullo, C. Rovera, T. Bellesia, D. Büyüктаş, M. Ghaani, N. Santo, D. Romano, S. Farris, "Acid-derived bacterial cellulose nanocrystals as organic filler for the generation of high-oxygen barrier bio-nanocomposite coatings," *Sustainable Food Technology*, vol. 1, n° 6, pp. 941-950, 2023.
- [48] Y. Chen, L. Gan, J. Huang, A. Dufresne, "Reinforcing Mechanism of Cellulose Nanocrystals in Nanocomposites," *Nanocellulose: From Fundamentals to Advanced Materials*, pp. 201-249, 2019.
- [49] B. Thomas, M. C. Raj, A. K. B., R. M. H., J. Joy, A. Moores,, G. L. Drisko, C. Sanchez, "Nanocellulose, a Versatile Green Platform: From Biosources to Materials and Their Applications," *Chemical Reviews*, vol. 118, pp. 11575-11625, 2018.
- [50] H. A. Silvério, W. P. Flauzino Neto, I. S. V. da Silva, J. R. Rosa, D. Pasquini,



- “Mechanical, Thermal, and Barrier Properties of Methylcellulose/Cellulose Nanocrystals Nanocomposites,” *Polímeros*, vol. 24, nº 6, pp. 683-688, 2014.
- [51] E. Abraham, D. Kam, Y. Nevo, R. Slattegard, A. Rivkin, S. Lapidot, O. Shoseyov, “Highly Modified Cellulose Nanocrystals and Formation of Epoxy-CNC Nanocomposites,” *ACS Applied Materials & Interfaces*, vol. 8, nº 41, pp. 28086–28095, 2016.
- [52] M. Mariano, F. Pilate, F. B. de Oliveira, F. Khelifa, P. Dubois, J.-M. Raquez, A. Dufresne, “Preparation of Cellulose Nanocrystal-Reinforced Poly(lactic acid) Nanocomposites through Noncovalent Modification with PLLABased Surfactants,” *ACS Omega*, vol. 2, nº 6, pp. 1678-2688, 2017.
- [53] A. Alanis, J. H. Valdés, N-V. María-Guadalupe, R. Lopez, R. Mendoza, A. P. Mathew, R. D. de Leon, L. Valencia, “Plasma surface-modification of cellulose nanocrystals: a green alternative towards mechanical reinforcement of ABS,” *RSC Advances*, vol. 9, nº 30, pp. 17417–17424, 2019.
- [54] H-J. Choi, M. S. Kim, D. A. Ahn, S. Y. Yeo, S. Lee, “Electrical percolation threshold of carbon black in a polymer matrix and its application to antistatic fibre,” *Scientific Reports*, nº 9, p. 6338, 2019.
- [55] W. D. CALLISTER, *Ciência e Engenharia de Materiais: Uma Introdução*, John Wiley & Sons, p. 359, 2002
- [56] P. H. C. Camargo, K. G. Satyanarayana, F. Wypych, “Nanocomposites: Synthesis, Structure, Properties and New Application Opportunities,” *Materials Research*, vol. 12, nº 1, pp. 1-39, 2009.
- [57] M. A. Henrique, W. P. F. Flauzino Neto, H. A. Silvério, D. F. Martins, L. V. A. Gurgel, H. d. S. Barud, L. C. de Moraes e D. Pasquini, “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*, vol. 76, pp. 128-140, 2015.
- [58] N. Durán, A. P. Lemes, M. Durán, J. Freer, J. Baeza, “A minireview of cellulose nanocrystals and its potential integration as co-product in bioethanol production,” *Journal of the Chilean Chemical Society*, vol. 56, nº 2, pp. 672-677, 2011.
- [59] J. Shi, W. Liu, X. Jiang, W. Liu, “Preparation of cellulose nanocrystal from tobacco-stem and its application in ethyl cellulose film as a reinforcing agent,” *Cellulose*, vol. 27, nº 3, pp. 1393-1406, 2019.
- [60] I. Giavasis, L. M. Harvey, B. McNeil, “Gellan Gum,” *Critical Reviews in Biotechnology*, vol. 20, nº 3, pp. 177–211, 2000.
- [61] K. M. Zia, S. Tabasum, M. F. Khan, N. Akram, N. Akhter, A. Noreen, M. Zuber, “Recent trends on Gellan Gum blends with natural and synthetic polymers: A review,” *International Journal of Biological Macromol*, 2017.
- [62] T. Osmatek, A. Froelich, S. Tasarek, “Application of gellan gum in pharmacy and medicine,” *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 466, nº 1-2, pp. 328–340, 2014.
- [63] E. R. Morris, K. Nishinari, M. Rinaudo, “Gelation of gellan eA review,” *Food Hydrocolloids*, vol. 28, pp. 373-411, 2012.
- [64] D. Gomes, J. P. Batista-Silva, A. Sousa, L. A. Passarinha, “Progress and opportunities in Gellan gum-based materials: A review of preparation, characterization and emerging applications,” *Carbohydrate Polymers*, vol. 311, p. 120782, 2023.
- [65] G. Sworn, “Gellan gum,” em *Handbook of Hydrocolloids*, p. 204–227, 2009.
- [66] D. R. Pereire, J. Silva-Correia, J. M. Oliveira, R. L. Reis, A. Pandit, M. J. Biggs, “Nanocellulose reinforced gellan-gum hydrogels as potential biological substitutes for annulus fibrous tissue regeneration,” *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, vol. 14, nº 3, pp. 897-908, 2018.
- [67] L. Segal, J. J. Creely, A. E. Martin, C. M. Conrad, “An Empirical Method for Estimating

- the Degree of Crystallinity of Native Cellulose Using the X-Ray Diffractometer,” *Textile Research Journal*, vol. 29, n° 10, pp. 786–794, 1959.
- [68] V. Andritsou, E. M. d. M. de Melo, E. Tsouko, D. Ladakis, S. Maragkoudaki, A. A. Koutinas, A. S. Matharu, “Synthesis and Characterization of Bacterial Cellulose from Citrus-Based Sustainable Resources,” *ACS Omega*, vol. 3, n° 8, pp. 10365-10373, 2018.
- [69] *Polymer Data Handbook*, New York: Oxford University Press, 1999.
- [70] M. Farré, D. Barceló, “Introduction to the Analysis and Risk of Nanomaterials in Environmental and Food Samples,” *Analysis and Risk of Nanomaterials*, pp. 1-32, 2012.
- [71] R. L. de Oliveira, H. S. Barud, R. M. N. de Assunção, C. d. S. Meireles, G. O. Carvalho, G. Rodrigues Filho, Y. Messaddeq, S. J. L. Ribeiro, “Synthesis and characterization of microcrystalline cellulose produced from bacterial cellulose,” *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, vol. 106, n° 3, pp. 703-709, 2011.
- [72] D. Ciolacu, F. Ciolacu, V. I. Popa, “Amorphous Cellulose – Structure and Characterization,” *Cellulose Chemistry and Technology*, vol. 45, n° 1-2, pp. 13-21, 2011.
- [73] S. Park, J. O. Baker, M. E. Himmel, P. A. Parilla, D. K. Johnson, “Cellulose crystallinity index: measurement techniques and their impact on interpreting cellulase performance,” *Biotechnology for Biofuels*, vol. 3, n° 1, p. 10, 2010.
- [74] H. S. Barud, J. L. Souza, D. B. Santos, M. S. Crespi, C. A. Ribeiro, Y. Messaddeq, S. J. Ribeiro, “Bacterial cellulose/poly(3-hydroxybutyrate) composite membranes,” *Carbohydrate Polymers*, vol. 83, n° 3, pp. 1279–1284, 2011.
- [75] S. Hamedi, S. A. Shojaosadati, “Preparation of antibacterial ZnO NP-containing schizophyllan/bacterial cellulose nanocomposite for wound dressing,” *Cellulose*, vol. 28, n° 14, pp. 9269-9282, 2021.
- [76] R. Kamal, Z. M. AlZubaidy, “Determination of the Physiochemical Properties of Bacterial Cellulose Produced by Local Isolates of *Acetobacter Xilynum*,” *Plant Archives*, vol. 19, n° 2, pp. 3995-4004, 2019.
- [77] M. Mattonai, D. Pawcenis, S. del Seppia, J. Łojewska, E. Ribechini, “Effect of ball-milling on crystallinity index, degree of polymerization and thermal stability of cellulose,” *Bioresource Technology*, 2018.
- [78] L. Huang, Q. Wub, Q. Wang, M. Wolcott, “Mechanical activation and characterization of micronized cellulose particles from pulp fiber,” *Industrial Crops and Products*, vol. 141, p. 111750, 2019.
- [79] A. Shrivastava, “Polymerization,” *Introduction to Plastics Engineering*, pp. 17–48, 2018.
- [80] Y. Kawano, “Espectroscopia vibracional de absorção no infravermelho,” *Técnicas de Caracterização de Polímeros*, São Paulo, Artliber, pp. 17-19, 2003.
- [81] S. V. Canevarolo Jr., *Técnicas de Caracterização de Polímeros*, São Paulo: Artliber, pp. 212-215, 2003.
- [82] H. G. Oliveira Barud, H. S. Barud, M. Cavicchioli, T. S. do Amaral, O. B. Oliveira Junior, D. M. Santos, A. L. d. O. A. Petersen, F. Celes, V. M. Borges, C. I. de Oliveira, “Preparation and characterization of a bacterial cellulose/silk fibroin sponge scaffold for tissue regeneration,” *Carbohydrate Polymers*, vol. 128, pp. 41-51, 2015.
- [83] INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, “Biological evaluation of medical devices. Part 12: Sample preparation and reference materials”, 4ed, ISO 10993-12,” 2012.
- [84] M. H. Hemida, H. Moustafa, S. Mehanny, M. Morsy, A. Dufresne, E. N. Abd EL Rahman, M. Ibrahim, “Cellulose nanocrystals from agricultural residues (*Eichhornia crassipes*): Extraction and characterization,” *Heliyon*, vol. 9, n° 6, p. e16436, 2023.

- [85] S. Bhattacharjee, "DLS and zeta potential – What they are and what they are not?," *Journal of Controlled Release*, vol. 235, pp. 337-351, 2016.
- [86] C. Ventura, F. Pinto, A. F. Lourenço, P. J. T. Ferreira, H. Louro, M. J. Silva, "On the toxicity of cellulose nanocrystals and nanofibrils in animal and cellular models," *Cellulose*, 2019.
- [87] S. Naduparambath, J. T. V., S. V., S. M. P., A. K. Balan, P. E., "Isolation and characterisation of cellulose nanocrystals from sago seed shells," *Carbohydrate Polymers*, vol. 180, n° 15, pp. 13-20, 2018.
- [88] N. Pandi, S. H. Sonawane, K. A. Kishore, "ynthesis of cellulose nanocrystals (CNCs) from cotton using ultrasound-assisted acid hydrolysis," *Ultrasonics - Sonochemistry*, vol. 70, p. 105353, 2021.
- [89] M. Roman, W. T. Winter, "Effect of Sulfate Groups from Sulfuric Acid Hydrolysis on the Thermal Degradation Behavior of Bacterial Cellulose," *Biomacromolecules*, vol. 5, n° 5, pp. 1671–1677, 2004.
- [90] D. Y. Hoo, Z. L. Low, D. Y. S. Low, S. Y. Tang, S. Manickam, K. W. Tan, Z. H. Ban, "Ultrasonic cavitation: An effective cleaner and greener intensification technology in the extraction and surface modification of nanocellulose," *Ultrasonics Sonochemistry*, vol. 90, p. 106176, 2022.
- [91] T. A. Faraco, H. d. O. X. Silva, H. d. S. Barud, T. d. C. Ribeiro, I. O. Maciel, W. G. Quirino, B. Fragneaud, M. Cremona, O. G. Pandoli, C. Legnani, "Biosubstrates obtained from Gellan Gum for Organic Light-Emitting Diodes," *ACS Applied Electronic Materials*, vol. 3, n° 5, pp. 2333–2340, 2021.
- [92] T. Mosmann, "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays," *Journal of Immunological Methods*, vol. 65, pp. 55-63, 1983.
- [93] INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, "Biological evaluation of medical devices. Part 5: Tests for cytotoxicity: in vitro methods", 3ed, ISO 10993-5," 2009.
- [94] S. Choudhary, K. Sharma, V. Kumar, J. K. Bhatia, S. Sharma, V. Sharma, "Microwave-assisted synthesis of gum gellan-cl-poly(acrylic-co-methacrylic acid) hydrogel for cationic dyes removal," *Polymer Bulletin*, 2019.
- [95] J. Im, A. T. Tran, I. Chang, G.-C. Cho, "Dynamic properties of gel-type biopolymer-treated sands evaluated by Resonant Column (RC) Tests," *Geomechanics and Engineering*, vol. 12, n° 5, pp. 815-830, 2017.
- [96] L. Sun, D. Zhang, S. Z. Cheng, F. W. Harris, "Thermally stable transparent polymer films for flexible electronics: Properties and applications," *Giant*, vol. 14, p. 100156, 2023.
- [97] S. Guzman-Puyol, J. J. Benítez, J. A. Heredia-Guerrero, "Transparency of polymeric food packaging materials," *Food Research International*, vol. 161, p. 111792, 2022.
- [98] R. Alves, A. Fidalgo-Marijuan, L. Campos-Arias, R. Gonçalves, M. M. Silva, F. J. Del Campo, C. M. Costa, S. Lanceros-Mendez, "Solid Polymer Electrolytes Based on Gellan Gum and Ionic Liquid for Sustainable Electrochromic Devices," *ACS Applied Materials & Interfaces*, vol. 14, n° 13, pp. 15494-15503, 2022.
- [99] R. M. Naachiyar, M. Ragam, S. Selvasekarapandian, M. V. Krishna, P. Buvaneshwari, "Development of biopolymer electrolyte membrane using Gellan gum biopolymer incorporated with NH<sub>4</sub>SCN for electro-chemical application," *Ionics*, vol. 27, n° 8, pp. 3415–3429, 2021.
- [100] N. Agarwal, J. Jain, M. Thakur, B. B. Mishra, S. P. Singh, "Preparation and characterization of biodegradable films based on levan polysaccharide blended with gellan gum," *Environmental Technology & Innovation*, vol. 31, p. 103231, 2023.
- [101] "Structure And Form Analysis System (SAFAS)," Virginia Polytechnic Institute and

State University. Disponível em:  
[https://www.setareh.arch.vt.edu/safas/007\\_fdmtl\\_23\\_stress\\_strain\\_relationship.html](https://www.setareh.arch.vt.edu/safas/007_fdmtl_23_stress_strain_relationship.html).  
Acessado em: 20/03/2024.

- [102] L. S. M. Gomes, "Biomateriais em Artroplastia de Quadril: Propriedades, Estrutura e Composição," *O Quadril*, São Paulo, Atheneu, pp. 121–143, 2010.
- [103] "Diagrama Tensão Deformação dos materiais: principais conceitos," Biopdi - Soluções em ensaios de materiais, Disponível em: <https://biopdi.com.br/artigos/diagrama-tensao-deformacao/>. Acessado em: 20/03/2024.
- [104] P. Criado, C. Frascini, S. Salmieri, D. Becher, A. Safrany, M. Lacroix, "Evaluation of Antioxidant Cellulose Nanocrystals and Applications in Gellan Gum Films," *Industrial Biotechnology*, vol. 11, nº 1, pp. 59-68, 2015.