

UNIVERSIDADE DA REGIÃO DE JOINVILLE - UNIVILLE  
MESTRADO EM ENGENHARIA DE PROCESSOS

NANOCRISTAIS DE CELULOSE BACTERIANA: DA OBTENÇÃO, SOB  
DIFERENTES CONDIÇÕES DE HIDRÓLISE, À INCORPORAÇÃO COMO  
REFORÇO EM POLI(L-ÁCIDO LÁCTICO)

JULIANA FRANCINE DA COSTA SILVEIRA

Joinville - SC

2016

JULIANA FRANCINE DA COSTA SILVEIRA

NANOCRISTAIS DE CELULOSE BACTERIANA: DA OBTENÇÃO, SOB  
DIFERENTES CONDIÇÕES DE HIDRÓLISE, À INCORPORAÇÃO COMO  
REFORÇO EM POLI(L-ÁCIDO LÁCTICO)

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia de Processos, na Universidade da Região de Joinville.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Paula Testa Pezzin.

Co-orientadora: Profa. Dra. Andréa Lima dos Santos Schneider.

Joinville - SC

2016

Catálogo na publicação pela Biblioteca Universitária da Univille

S587n Silveira, Juliana Francine da Costa  
Nanocristais de celulose bacteriana: da obtenção, sob diferentes condições de hidrólise, à incorporação como reforço em poli(L-ácido láctico)/Juliana Francine da Costa Silveira; orientadora Dra. Ana Paula Testa Pezzin; coorientadora Andréa Lima dos Santos Schneider. – Joinville: UNIVILLE, 2016.

85 f.; il. ; 30 cm

Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos – Universidade da Região de Joinville)

1. Nanotecnologia. 2. Nanocristais de celulose. 3. Ácido Láctico. I. Pezzin, Ana Paula Testa (orient.). II. Schneider, Andréa Lima dos Santos. II. Schneider, Andréa Lima dos Santos (coorient.). III. Título.

CDD 620.5

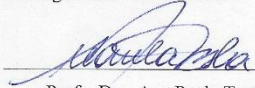
**Termo de Aprovação**

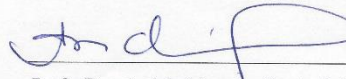
**“Nanocristais de Celulose Bacteriana: da Obtenção, sob Diferentes Condições de Hidrólise, à Incorporação como Reforço em Poli (L-Ácido Láctico)”**


por

Juliana Francine da Costa Silveira

Dissertação julgada para a obtenção do título de Mestre em Engenharia de Processos, área de concentração Engenharia de Processos e Tecnologias Limpas e aprovada em sua forma final pelo Programa de Mestrado em Engenharia de Processos.

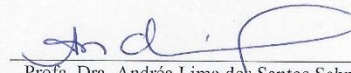
  
Prof. Dra. Ana Paula Testa Pezzin  
Orientadora (UNIVILLE)

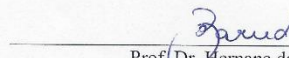
  
Prof. Dra. Andréa Lima dos Santos Schneider  
Coorientadora (UNIVILLE)

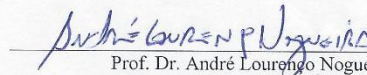
  
Prof. Dra. Ana Paula Testa Pezzin  
Coordenadora do Programa de Mestrado em Engenharia de Processos (UNIVILLE)

**Banca Examinadora:**

  
Prof. Dra. Ana Paula Testa Pezzin  
Orientadora (UNIVILLE)

  
Prof. Dra. Andréa Lima dos Santos Schneider  
Coorientadora (UNIVILLE)

  
Prof. Dr. Hernane da Silva Barud  
(UNIARA)

  
Prof. Dr. André Lourenço Nogueira  
(UNIVILLE)

Joinville, 10 de agosto de 2016.

***“Só se pode alcançar um grande êxito  
quando nos mantemos fiéis a nós  
mesmos”.***

*Friedrich Nietzsche*

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais Eunice e Amilton, agradeço por me dedicarem amor, confiança, torcida e por sempre terem investido em minha educação. E à minha irmã Luana, por ser minha companheira para toda a vida.

À minha orientadora Profa. Dra. Ana Paula T. Pezzin e à minha co-orientadora Profa. Dra. Andréa L. S. Schneider, pela orientação, confiança, incentivo e compreensão, dedicados a mim durante o período de mestrado.

À Profa. MSc. Michele C. F. Garcia, pelo apoio durante o desenvolvimento da metodologia deste trabalho e durante as atividades experimentais e pela sua dedicação e prazer em trabalhar com a Pesquisa.

À Profa. Dra. Márcia L. L. Silveira, por fornecer as membranas de acetato de celulose para a diálise e por estar sempre disponível a excelentes explicações.

À Profa. Dra. Giannini P. Apati, pela colaboração na elaboração do planejamento experimental.

Ao Prof. Dr. Hernane Barud, da UNIARA, pelo apoio durante o desenvolvimento da metodologia de extração de nanocristais de celulose bacteriana e por encaminhar as análises de DLS.

Aos alunos de Iniciação Científica Marcos P. Duffeck e Eduardo G. Branco pelo auxílio nas atividades experimentais.

Às técnicas de laboratório Aline S. Coan, pela ajuda durante as atividades experimentais; e Cláudia H. G. Correia e Ana Paula Pereira, pela realização das análises de TGA e DSC.

Aos membros da banca examinadora, agradeço por aceitarem avaliar este trabalho, certamente acrescentando valiosas sugestões.

Aos professores do Programa de Mestrado em Engenharia de Processos, pelos conhecimentos transmitidos.

À CAPES, pelo apoio financeiro durante o mestrado.

## RESUMO

Devido a busca por materiais sustentáveis, pesquisas envolvendo bionanocompósitos ganham representatividade. A celulose bacteriana (CB) se configura como fonte de extração de nanocristais (NCCBs), representando as melhores propriedades da CB. Além disso, estes NCCBs apresentam alta razão de aspecto, o que lhes confere boa capacidade de reforço. O poli(L-ácido láctico) (PLLA) possui propriedades promissoras, no entanto, suas características limitam algumas aplicações. Uma alternativa para aproveitar as vantagens que o PLLA apresenta e contornar as desvantagens é a aplicação de reforço de NCCBs. Este trabalho almejou produzir CB, obter NCCBs, incorporar NCCBs em PLLA e avaliar propriedades dos bionanocompósitos preparados. Foram produzidas membranas de CB, provenientes de cultivo estático da bactéria *Gluconacetobacter hansenii*. Em uma primeira etapa, a partir das membranas de CB, foram extraídos NCCBs por hidrólise com ácido sulfúrico, com base em um planejamento experimental (11 experimentos). Os parâmetros variados nas reações foram: concentração de ácido (m/m), temperatura e tempo. Pode-se definir critérios de extração de NCCBs com base em análise visual, análise de rendimento, análise termogravimétrica (TGA) e análise de espalhamento dinâmico de luz (DLS). Os principais resultados referentes à extração de NCCBs indicam a possibilidade de extração na condição de: 80 % de concentração de ácido (m/m), 60 °C e 60 min. Para esta condição obteve-se tamanho adequado dos NCCBs (predominantemente média de 388 nm), potencial zeta superficial adequado (-38 mV), bom rendimento de produção em relação às demais condições e adequada estabilidade térmica ( $T_{\text{onset2}} = 301,9 \text{ °C}$ ). Em uma segunda etapa, os NCCBs extraídos conforme critérios definidos foram incorporados ao PLLA em duas concentrações (2,5 e 5 %), utilizando dois métodos (sem funcionalização dos NCCBs e com funcionalização). Os bionanocompósitos preparados foram caracterizados por análise termogravimétrica (TGA) e calorimetria explanatória diferencial (DSC). Os resultados das técnicas de caracterização dos bionanocompósitos foram comparados com resultados do PLLA puro. Os principais resultados referentes à preparação dos bionanocompósitos, em relação aos métodos utilizados, revelam a importância da funcionalização dos NCCBs antes de incorporá-los ao PLLA. Em relação à concentração de reforço utilizada, o aumento da estabilidade térmica foi gradual, conforme o teor de reforço, sendo que para o bionanocompósito com 5 % de NCCBs funcionalizados, o incremento foi de 10,4 °C na  $T_{\text{onset2}}$ , em relação ao PLLA puro. Contudo, o grau de cristalinidade diminuiu ( $X_c$  do PLLA puro = 40,38 % e  $X_c$  do bionanocompósito com 5 % de NCCBs funcionalizados = 24,73 %). Seguindo a estrutura apresentada, conclui-se que a adição de NCCBs em matriz de PLLA, além de ser ambientalmente viável, promove melhoria de propriedades.

**Palavras-chave:** bionanocompósitos, nanocristais de celulose bacteriana, poli(L-ácido láctico).

## ABSTRACT

Due to the search for sustainable materials, researches involving bionanocomposites gain representativeness. The bacterial cellulose is configured as a source of nanocrystals extraction, representing the best properties of bacterial cellulose. In addition, these nanocrystals have a high aspect ratio, which gives them good reinforcement capacity. poly(L-lactic acid) has promising properties, however, its characteristics limit some applications. An alternative to take advantage of the poly (L-lactic acid) advantages and to overcome the disadvantages is the application of reinforcement of bacterial cellulose nanocrystals. This work aimed to produce bacterial cellulose, to obtain nanocrystals, to incorporate nanocrystals into poly(L-lactic acid) and to evaluate properties of prepared bionanocomposites. Bacterial cellulose membranes were produced from static culture of the bacterium *Gluconacetobacter hansenii*. In a first step, from the bacterial cellulose membranes, nanocrystals were extracted by hydrolysis with sulfuric acid, based on an experimental design (11 experiments). The varied parameters in the reactions were: acid concentration (w/w), temperature and time. It is possible to define nanocrystals extraction criteria based on visual analysis, yield analysis, thermogravimetric analysis and dynamic light scattering analysis. The main results concerning the extraction of nanocrystals indicate the possibility of extraction in the condition of: 80 % acid concentration, 60 ° C and 60 min. For this condition, it was obtained a suitable size of the nanocrystals (predominantly average of 388 nm), adequate surface zeta potential (-38 mV), good production yield in relation to the other conditions and adequate thermal stability ( $T_{\text{onset2}} = 301,9 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ). In a second step, the nanocrystals extracted according to defined criteria were incorporated into the poly(L-lactic acid) in two concentrations (2,5 and 5 %), using two methods (without functionalization of the nanocrystals and with functionalization). The prepared bionanocomposites were characterized by thermogravimetric analysis and differential explanatory calorimetry. The results of the bionanocomposite characterization techniques were compared with pure poly(L-lactic acid) results. The main results regarding the preparation of bionanocomposites, in relation to the methods used, reveal the importance of nanocrystals functionalization before incorporating them into poly(L-lactic acid). In relation to the reinforcement concentration used, the increase of the thermal stability was gradual, according to the reinforcement content, and for the bionanocomposite with 5 % of functionalized nanocrystals, the increment was of 10.4 °C in the  $T_{\text{onset2}}$ , in relation to the pure poly(L-lactic acid). However, the degree of crystallinity decreased ( $X_c$  of pure poly(L-lactic acid) = 40.38 % and  $X_c$  of bionanocompound with 5 % of functionalized nanocrystals = 24.73 %). Following the structure presented, it is concluded that the addition of bacterial cellulose nanocrystals in poly(L-lactic acid) matrix, in addition to being environmentally feasible, improves properties.

**Keywords:** biodegradable nanocomposites, bacterial cellulose nanocrystals, poly(L-lactic acid).



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representações esquemáticas das diversas características geométricas e espaciais das partículas da fase dispersa, que podem influenciar as propriedades dos compósitos: concentração (a), tamanho (b), forma (c), distribuição (d) e orientação (e). ....	18
Figura 2. Para o polietileno, uma representação esquemática da unidade repetitiva e das estruturas da cadeia (a) e uma perspectiva da molécula indicando a estrutura em ziguezague da cadeia principal (b). ....	20
Figura 3. Arranjo das cadeias moleculares em uma célula unitária para o polietileno. ....	21
Figura 4. Representações esquemáticas das estruturas moleculares: linear (a), ramificada (b), com ligações cruzadas (c) e em rede (d). Os círculos representam unidades repetidas individuais. ....	22
Figura 5. Isomeria óptica do ácido láctico e do lactídeo. ....	24
Figura 6. Estrutura química da celulose, mostrando ligações de hidrogênio intermolecular e intramolecular de cadeias de celulose. ....	27
Figura 7. Imagem de MET da bactéria <i>Gluconacetobacter hansenii</i> excretando as fibrilas que compõe a membrana de celulose. ....	28
Figura 8. Micrografias das fibras da celulose vegetal (a) e das fibras da CB (b). ....	30
Figura 9. Estrutura fibrilar altamente porosa da CB. ....	30
Figura 10. Esquema com as regiões amorfas e cristalinas. ....	32
Figura 11. Representação da inserção do grupo sulfato proveniente da hidrólise com $H_2SO_4$ na cadeia da celulose. ....	32
Figura 12. Procedimentos metodológicos utilizados neste trabalho. ....	39
Figura 13. Fluxograma da etapa de produção de membranas de celulose bacteriana. ....	42
Figura 14. Métodos 1 (NCCBs desidratados) (a) e 2 (NCCBs quimicamente modificados) (b). ....	50
Figura 15. Culturas de <i>Gluconacetobacter hansenii</i> (a), membranas de CB sintetizadas pela bactéria e purificadas (b) e películas de CB resultantes das membranas secas (c). ....	53
Figura 16. Suspensão obtida após a interrupção da reação de hidrólise com água destilada gelada. ....	54
Figura 17. Curvas de TGA (a) e DTG (b) da CB pura e dos nanocristais (referentes aos experimentos). ....	57
Figura 18. Gráfico de superfície de resposta representando a interação entre “[ ] de ácido” e “tempo de hidrólise ácida” na “Tonset2”, fixando a temperatura no ponto central (50 °C). ...	61
Figura 19. Fotografia dos NCCBs liofilizados, extraídos conforme experimento 8. ....	62

Figura 20. Fotografia dos filmes de CB pura, PLLA puro e bionanocompósitos. ....	63
Figura 21. Curvas de TG e DTG do PLLA puro e dos bionanocompósitos reforçados com NCCBs, preparados pelo Método 1 (a) e pelo Método 2 (b).....	66
Figura 22. Curvas de DSC do PLLA puro e dos bionanocompósitos reforçados com NCCBs, preparados pelo Método 1 e pelo Método 2.....	69

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Variáveis independentes e os níveis utilizados no planejamento experimental $2^3$ , completo, com 3 pontos centrais. ....	43
Tabela 2. Arranjo das variáveis independentes de cada ensaio, conforme planejamento experimental $2^3$ , completo, com 3 pontos centrais.....	44
Tabela 3. Dados da análise de TGA da CB pura e dos NCCBs (referentes aos experimentos). .....	58
Tabela 4. ANOVA para a “ $T_{onset2}$ ”, contendo todas as variáveis independentes e as interações de primeiro nível. ....	59
Tabela 5. ANOVA para a “ $T_{onset2}$ ”, sem as interações entre fatores.....	60
Tabela 6. Coeficientes de regressão para a “ $T_{onset2}$ ”, .....	60
Tabela 7. Dados da análise de TGA do PLLA puro e dos bionanocompósitos reforçados com NCCBs, preparados pelos Métodos 1 e 2.....	67
Tabela 8. Dados da análise de TGA do PLLA puro e dos bionanocompósitos reforçados com NCCBs, preparados pelos Métodos 1 e 2.....	69

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Resultados obtidos por alguns autores que estudaram a extração de nanocristais de celulose por hidrólise com ácido sulfúrico, variando condições de hidrólise. ....	34
Quadro 2. Resultados obtidos por alguns autores que estudaram bionanocompósitos reforçados com nanocristais de celulose. ....	37
Quadro 3. Para cada experimento, aspectos observados visualmente em relação à degradação.....	55

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACV	análise de ciclo de vida
ANOVA	análise de variância
CB	celulose bacteriana
DLS	análise de espalhamento dinâmico de luz
DRX	análise de difração de raio-X
MET	microscopia eletrônica de transmissão
NCCBs	nanocristais de celulose bacteriana
PCL	poli( $\epsilon$ -caprolactona)
PE	polietileno
PET	poli(tereftalato de etileno)
PHB	poli(hidroxibutirato)
PLA	poli(ácido láctico)
PLLA	poli(L-ácido láctico)
PP	polipropileno
PS	poliestireno
PVC	poli(cloreto de vinila)
$T_c$	temperatura de cristalização
$T_g$	temperatura de transição vítrea
TGA	análise termogravimétrica
$T_m$	temperatura de fusão
$T_{max}$	temperatura na qual a taxa de degradação é máxima
$T_{onset}$	temperatura de início de degradação extrapolada
$X_c$	grau de cristalinidade
$\Delta H_m$	entalpia de fusão experimental
$\Delta H_m^0$	entalpia de fusão supondo polímero 100 % cristalino

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>14</b>
<b>1 OBJETIVOS</b> .....	<b>16</b>
1.1 OBJETIVO GERAL.....	16
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	16
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>17</b>
2.1 NANOTECNOLOGIA.....	17
2.2 COMPÓSITOS E NANOCOMPÓSITOS .....	18
2.3 POLÍMEROS E POLÍMEROS BIODEGRADÁVEIS.....	19
2.4 POLÍMERO POLI(L-ÁCIDO LÁCTICO) - PLLA .....	23
2.5 OBTENÇÃO DE NANOCRISTAIS DE CELULOSE BACTERIANA .....	26
2.5.1 Celulose .....	26
2.5.2 Celulose bacteriana.....	27
2.5.3 Nanocristais de celulose bacteriana .....	31
2.5.3.1 Estado da arte sobre extração de nanocristais de celulose com ácido sulfúrico ....	33
2.6 OBTENÇÃO DE BIONANOCOMPÓSITOS REFORÇADOS COM NANOCRISTAIS DE CELULOSE .....	36
2.6.1 Estado da arte sobre bionanocompósitos reforçados com nanocristais de celulose....	37
<b>3 METODOLOGIA</b> .....	<b>39</b>
3.1 PRODUÇÃO DE CELULOSE BACTERIANA.....	40
3.1.1 Microrganismo.....	40
3.1.2 Meios de cultivo.....	40
3.1.3 Condições de cultivo .....	40
3.1.4 Purificação e secagem da celulose bacteriana .....	41
3.2 EXTRAÇÃO DE NANOCRISTAIS DE CELULOSE BACTERIANA EM DIFERENTES CONDIÇÕES.....	43
3.3 DEFINIÇÃO DE CRITÉRIOS DE EXTRAÇÃO DE NANOCRISTAIS DE CELULOSE BACTERIANA.....	45
3.3.1 Análise visual das suspensões.....	46
3.3.2 Análise de rendimento em volume dos NCCBs .....	46
3.3.3 Análise termogravimétrica (TGA) dos NCCBs .....	46
3.3.4 Análise de espalhamento dinâmico de luz (DLS) dos NCCBs .....	47
3.4 PREPARAÇÃO DOS BIONANOCOMPÓSITOS .....	47
3.4.1 Preparação de nanocristais de celulose bacteriana (NCCBs).....	47
3.4.2 Preparação de filme de Poli(L-ácido láctico) (PLLA) puro e com diferentes concentrações de nanocristais de celulose bacteriana .....	47
3.4.2.1 Filme de poli(L-ácido láctico) (PLLA) puro .....	47
3.4.2.2 Filmes com diferentes concentrações de Nanocristais de Celulose Bacteriana incorporados em Poli(L-ácido láctico) (PLLA) .....	48
3.5 CARACTERIZAÇÃO DOS BIONANOCOMPÓSITOS .....	51
3.5.1 Análise termogravimétrica (TGA).....	51
3.5.2 Calorimetria exploratória diferencial (DSC).....	52
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>53</b>
4.1 PRODUÇÃO DE CELULOSE BACTERIANA.....	53
4.2 EXTRAÇÃO DE NANOCRISTAIS DE CELULOSE BACTERIANA EM DIFERENTES CONDIÇÕES E DEFINIÇÃO DE CRITÉRIOS.....	54

4.2.1	Análise visual das suspensões.....	54
4.2.2	Análise de rendimento em volume dos NCCBs .....	55
4.2.3	Análise termogravimétrica (TGA) dos NCCBs .....	56
4.2.3.1	Análise estatística.....	59
4.2.4	Análise de espalhamento dinâmico de luz (DLS) dos NCCBs .....	61
4.3	PREPARAÇÃO DOS BIONANOCOMPÓSITOS.....	62
4.4	CARACTERIZAÇÃO DOS BIONANOCOMPÓSITOS.....	64
4.4.1	Análise termogravimétrica (TGA).....	64
4.4.2	Calorimetria explanatória diferencial (DSC).....	68
	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>70</b>
	<b>SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS .....</b>	<b>72</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>74</b>

## INTRODUÇÃO

Pesquisas envolvendo polímeros provenientes de fontes renováveis e biodegradáveis vêm ganhando destaque devido a constante busca por materiais sustentáveis que possam substituir total ou parcialmente os polímeros sintéticos, provenientes geralmente da cadeia petroquímica, atualmente produzidos em larga escala (MAZUR, 2012). Neste sentido, a celulose  $(C_6H_{10}O_5)_n$  é considerada bastante atraente. É o polímero natural mais abundante na biosfera, sendo a celulose extraída de fonte vegetal a mais explorada comercialmente devido a sua disponibilidade. Porém, além desta fonte, a celulose pode ser produzida por algas e animais marinhos (como os tunicados) e secretadas extracelularmente por diversas cepas de bactérias, como as do gênero *Gluconacetobacter* (DONINI, 2010; ERENO, 2004; ROITMAN, 2008; SILVA; D'ALMEIDA, 2009).

A celulose bacteriana (CB) possui a mesma fórmula química da celulose vegetal, porém propriedades mecânicas e físicas diferenciadas. A grande vantagem refere-se à pureza, pois não contém lignina, hemiceluloses e outros constituintes presentes em materiais lignocelulósicos (BARUD, 2010; CIRIGO Y PÉREZ, 2014).

A CB surge como uma alternativa competitiva, possuindo como principais características: alta cristalinidade, alta resistência à tração, elasticidade, durabilidade, potencial hidrofílico (capacidade de retenção e absorção de água – cerca de 98 % a 99 % de seu volume é composto de líquidos), atoxicidade, biocompatibilidade e biodegradabilidade. Estas importantes propriedades têm conduzido pesquisadores a encontrar uma gama de aplicações para este material (RECOUVREUX, 2008; SILVA; D'ALMEIDA, 2009).

A CB também se configura como fonte de extração de nanocristais, que consistem em domínios cristalinos de fibras celulósicas, isolados por meio de hidrólise ácida ou enzimática, representando as melhores propriedades da CB em relação à força e resistência. Além disto, estes nanocristais de celulose bacteriana (NCCBs) podem apresentar alta razão de aspecto (comprimento/diâmetro), o que lhes confere boa capacidade de reforço, podendo ser utilizados em diversas matrizes poliméricas (BARUD, 2010; LIMA, 2015).

A literatura reporta alguns exemplos de extração de NCCBs. Porém, estudos envolvendo influência das condições de hidrólise ácida, como tipo e concentração de



ácido empregado, temperatura e tempo de hidrólise, devem ser mais explorados para que se encontre a melhor condição de extração de nanocristais, com dimensões, cristalinidade e estabilidade térmica favoráveis (LIMA, 2015; TAIPINA, 2012).

O poli(L-ácido láctico) (PLLA) é um polímero com propriedades promissoras, que tem como monômero estrutural o ácido láctico, um ácido orgânico de origem biológica, sintetizado via fermentativa, a partir de fontes renováveis e abundantes. É biodegradável, reabsorvível, biocompatível, termoplástico e hidrofóbico. Estes atributos permitem que o material tenha uma gama de aplicações nas áreas médica e ambiental. No entanto, algumas características, como sua elevada temperatura de transição vítrea (cerca de 60 °C) e alta cristalinidade, que tornam o polímero rígido e quebradiço, limitam algumas de suas aplicações (PEZZIN, 2001). Sua baixa propriedade de barreira a gases também compromete a utilização do polímero em algumas aplicações, como no uso de determinadas embalagens alimentícias e de refrigerantes. Em se tratando de propriedades mecânicas, os polilactídeos são polímeros relativamente frágeis, apresentando resistência ao impacto em torno de 26 J/m. Para melhorar as propriedades mecânicas, muitas estratégias têm sido avaliadas, como: diminuição do grau de cristalinidade, modificação das propriedades (por meio do desenvolvimento de copolímeros e blendas) e adição de reforços como os nanocristais de celulose (MAZUR, 2011, PEREIRA *et al.*, 2014).

De todos os nanocompósitos preparados e estudados com NCCBs, a matriz de poli(ácido láctico) (PLA), em suas diferentes formas, é a que tem recebido o maior interesse. Uma alternativa para aproveitar as vantagens que o PLLA apresenta e contornar as desvantagens é a aplicação de reforço de NCCBs, para a formação de um bionanocompósito, com comportamentos térmico e mecânico adequados (ARROYO, 2010; AVÉROUS, 2008; PEREIRA *et al.*, 2014).

Diante do exposto, este trabalho almejou produzir CB, obter NCCBs (definindo critérios para esta obtenção), incorporar reforço de nanocristais em matriz polimérica de PLLA em diferentes concentrações e avaliar propriedades destes bionanocompósitos.

# 1 OBJETIVOS

## 1.1 OBJETIVO GERAL

Estudar a obtenção de nanocristais de celulose bacteriana (NCCBs), variando condições de hidrólise ácida, e incorporar os NCCBs como reforço em matriz polimérica de poli(L-ácido láctico) (PLLA).

## 1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Produzir celulose bacteriana em meio de cultivo estático, utilizando a bactéria *Gluconacetobacter hansenii*;
- extrair NCCBs, variando condições de hidrólise ácida (concentração de ácido sulfúrico, temperatura e tempo de reação) por meio de um planejamento experimental (11 experimentos);
- caracterizar os NCCBs obtidos por análise visual, análise de rendimento em volume, análise termogravimétrica (TGA) e análise de espalhamento dinâmico de luz (DLS), definindo critérios de extração;
- preparar bionanocompósitos, incorporando NCCBs como reforço em matriz de PLLA nas proporções de 0, 2,5 e 5 %, utilizando dois diferentes métodos de obtenção de filmes;
- caracterizar os bionanocompósitos de PLLA/NCCBs por análise termogravimétrica (TGA) e calorimetria exploratória diferencial (DSC).

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 NANOTECNOLOGIA

Um nanômetro é uma medida de tamanho ou de distância entre dois pontos, assim como o quilômetro. O nanômetro é a junção da palavra “nano”, que significa uma parte de um bilhão (0,000000001 ou  $10^{-9}$ ) com a palavra “metro”, isto é, uma distância ou um tamanho de um bilionésimo de um metro ou aproximadamente a distância ocupada por cerca de 5 a 10 átomos empilhados de maneira a formar uma linha (REDE SPM, 2015).

A nanotecnologia pode ser definida como sendo o termo utilizado para descrever a criação, manipulação e exploração de materiais com escala nanométrica. Neste contexto, é possível controlar os materiais de forma a manipular átomos e moléculas para construir estruturas mais complexas. A nanotecnologia é claramente uma área de pesquisa e desenvolvimento muito ampla e interdisciplinar, uma vez que se baseia nos mais diversificados tipos de materiais (polímeros, cerâmicas, metais, semicondutores, compósitos e biomateriais), estruturados em escala nanométrica (nanoestruturados). A definição de nanotecnologia cai em um campo que mescla matemática, física, química, biologia, computação e outros ramos, gerando diversas vertentes (DURÁN; MATTOSO; DE MORAIS, 2006; LONGO, 2004).

O grupo de Durán (2006) defende a ideia de que a síntese e o controle dos materiais em escala nanométrica antecipam a fabricação e o controle da estrutura da matéria num nível molecular e representa o início de uma revolucionária era, onde se pode ter acesso a novas propriedades e comportamento de materiais e de dispositivos.

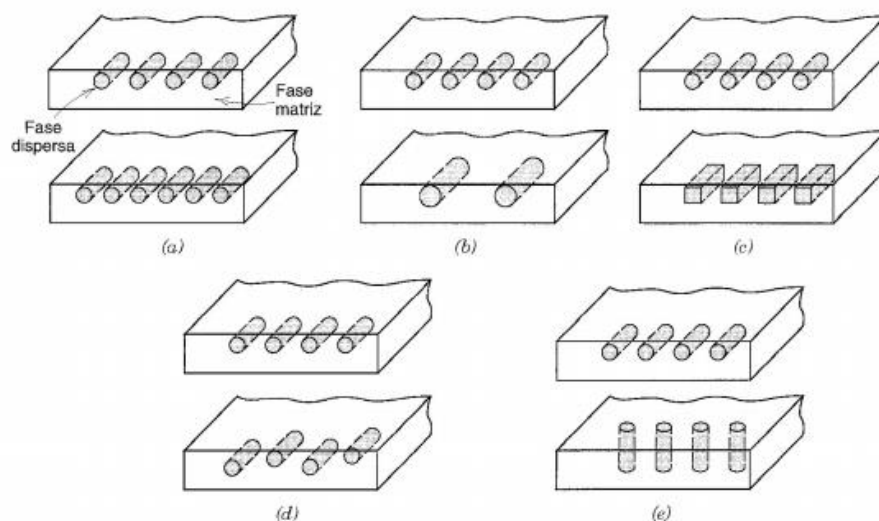
As áreas de aplicação da nanotecnologia envolvem praticamente todos os setores industriais e de serviços. No futuro, vamos sem dúvida alguma descobrir que um número cada vez maior de avanços tecnológicos irá utilizar estes materiais nanoestruturados (CALLISTER, 2012).

## 2.2 COMPÓSITOS E NANOCOMPÓSITOS

Compósitos produzidos artificialmente são materiais multifásicos, possuindo uma combinação desejável em relação as melhores propriedades de suas fases constituintes, para aplicações específicas. Sendo assim, em um projeto de materiais compósitos, os cientistas e os engenheiros misturam metais, cerâmicas e polímeros para produzir uma nova geração de materiais. A maioria dos compósitos é criada para melhorar características mecânicas, tais como rigidez, tenacidade e resistência às condições do ambiente e a temperaturas elevadas (CALLISTER, 2012).

Callister (2012) também destaca as fases de um compósito. A fase denominada “matriz” é contínua e envolve a fase denominada “dispersa”. As propriedades dos compósitos são caracterizadas em função das propriedades das fases constituintes, de suas quantidades relativas e características geométricas e espaciais das partículas da fase dispersa. Deste modo, subentende-se por “geometria da fase dispersa”: a concentração, o tamanho, a forma, a distribuição e a orientação das partículas presentes na fase dispersa. Estas características estão representadas na Figura 1.

Figura 1. Representações esquemáticas das diversas características geométricas e espaciais das partículas da fase dispersa, que podem influenciar as propriedades dos compósitos: concentração (a), tamanho (b), forma (c), distribuição (d) e orientação (e).



A fase dispersa é também chamada de carga. De Paoli (2008) aborda a diferença entre as funções das cargas. Neste sentido, se a carga que entra na formulação do material tiver como principal objetivo reduzir custos, será chamada de carga de enchimento ou ainda de carga inerte. Porém, se a adição da carga promover melhorias de propriedades será chamada de carga de reforço.

Quando um compósito apresenta uma carga dispersa na matriz, com dimensão na escala nanométrica, pode ser denominado nanocompósito. O grande desafio de materiais elaborados a partir de nanocompósitos é conseguir adequada dispersão, o que é fortemente dependente da natureza da matriz. Muitas vezes a funcionalização é utilizada para a compatibilização de carga reforço com a matriz, afim de se alcançar uma adesão forte e estável na interface, melhorando o desempenho do material (ROTHON; DEARMITT, 2002; TAIPINA, 2012).

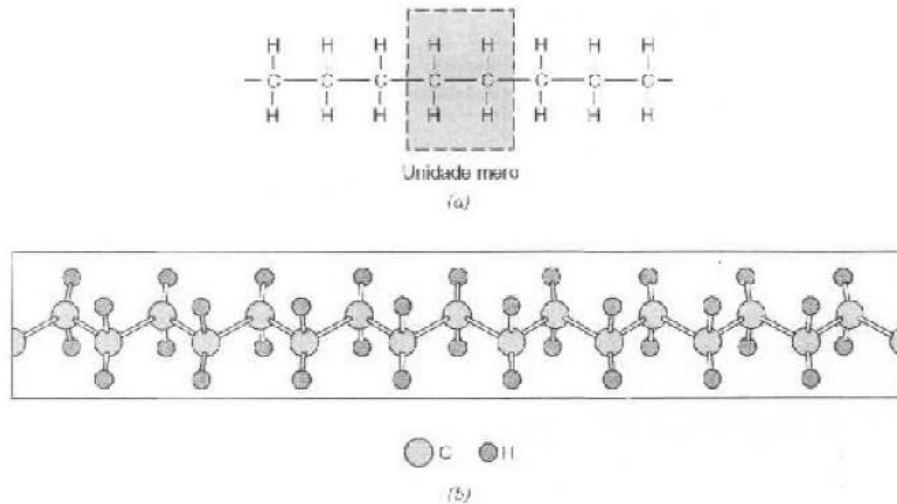
Focando a sustentabilidade nas cadeias produtivas, compósitos e nanocompósitos podem ser preparados com o uso de matérias-primas provenientes de fontes renováveis e biodegradáveis.

### 2.3 POLÍMEROS E POLÍMEROS BIODEGRADÁVEIS

Alguns tipos de moléculas orgânicas pequenas, chamadas de monômeros, podem ligar-se entre si, formando uma sequência de unidades monoméricas repetidas e originando macromoléculas, denominadas polímeros, por meio de uma reação denominada polimerização (USBERCO; SALVADOR, 2013).

Muitos polímeros são compostos orgânicos, quimicamente baseados no carbono, hidrogênio e em outros elementos não metálicos (como O, N, Si). Possuem estruturas moleculares muito grandes, frequentemente na forma de cadeias que possuem átomos de carbono como espinha dorsal. Dentro de cada molécula, os átomos estão ligados entre si por ligações covalentes. Entre as moléculas, ocorrem ligações secundárias (CALLISTER, 2012). A Figura 2, refere-se ao polietileno e representa esquematicamente a unidade repetida e estruturas de sua cadeia, assim como uma perspectiva da molécula, indicando a estrutura *zigzag* da cadeia principal.

Figura 2. Para o polietileno, uma representação esquemática da unidade repetitiva e das estruturas da cadeia (a) e uma perspectiva da molécula indicando a estrutura em ziguezague da cadeia principal (b).



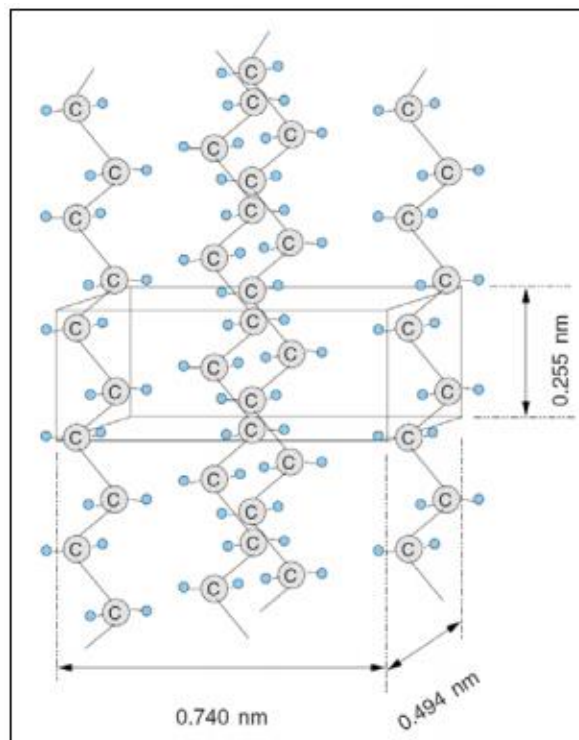
Fonte: CALLISTER, 2012.

A massa molecular de uma substância é obtida a partir da soma das massas atômicas. No caso dos polímeros, é em função do número de unidades repetitivas que os constituem. A este número de unidades repetitivas atribui-se a designação de grau de polimerização. Assim, a massa molecular relativa de um polímero depende de seu grau de polimerização e da massa molecular relativa da unidade repetitiva. A unidade de medida é “u” (unidade de massa atômica). Já a massa molar relativa de um material polimérico possui o mesmo valor da massa molecular, porém unidade de medida diferente (g/mol). Os polímeros podem apresentar grandes variações na massa molar, sendo que a massa molar está relacionada às propriedades físicas, que devem atender as necessidades particulares de cada aplicação (FCUP, 2016; USBERCO; SALVADOR, 2013).

A cristalinidade em polímeros pode ser definida como um arranjo tridimensional das estruturas macromoleculares. Cristalinidade está relacionada à força e resistência, à dissolução e ao amolecimento pelo calor. Os polímeros podem apresentar estruturas com alto grau de cristalinidade, mas na prática, 100 % de cristalinidade não é atingida. Portanto, são considerados materiais semicristalinos, possuindo regiões cristalinas dispersas no material amorfo restante. Qualquer desordem ou falta de alinhamento na cadeia resulta em uma região amorfa, condição

muito comum, uma vez que torções, contorções e enovelamentos das cadeias previnem a correta ordenação de todos os segmentos, em todas as cadeias (BRASKEM, 2002). A Figura 3, mostra o arranjo das cadeias moleculares em uma célula unitária para o polietileno.

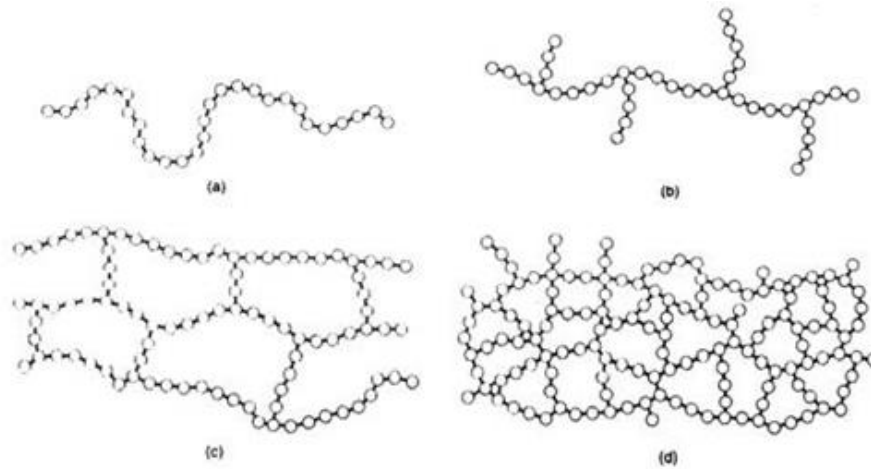
Figura 3. Arranjo das cadeias moleculares em uma célula unitária para o polietileno.



Fonte: CALLISTER, 2012.

Em relação ao comportamento em temperaturas elevadas, os polímeros são classificados em termoplásticos ou termofixos. Os primeiros possuem estruturas lineares ou ramificadas, que amolecem quando são aquecidos e endurecem quando resfriados. Os termofixos, uma vez aquecidos não irão amolecer, pois suas estruturas possuem ligações cruzadas ou em rede (CALLISTER, 2012). A Figura 4 esquematiza as estruturas moleculares que os polímeros podem apresentar, influenciando a classificação referente ao comportamento em temperaturas elevadas.

Figura 4. Representações esquemáticas das estruturas moleculares: linear (a), ramificada (b), com ligações cruzadas (c) e em rede (d). Os círculos representam unidades repetidas individuais.



Fonte: CALLISTER, 2012.

Três fenômenos são importantes em relação ao processamento de materiais poliméricos: cristalização, fusão e transição vítrea. A cristalização é o processo segundo o qual, durante o resfriamento, uma fase sólida ordenada (cristalina) é produzida a partir de um líquido fundido, que possui uma estrutura molecular altamente aleatória. A fusão é o processo inverso, que ocorre quando um polímero é aquecido. O fenômeno de transição vítrea ocorre com os polímeros amorfos (ou vítreos), os quais quando são resfriados a partir de um líquido fundido, se tornam sólidos rígidos, embora retenham uma estrutura molecular desordenada, que é característica do estado líquido; transição vítrea também ocorre com os polímeros semicristalinos, onde as regiões cristalinas apresentam fusão e cristalização, enquanto as áreas não-cristalinas irão passar pela transição vítrea (CALLISTER, 2012).

Os polímeros podem ser naturais, como a seda e a celulose ou sintéticos, como o polipropileno (PP), o poli(tereftalato de etileno) (PET), o polietileno (PE), o poli(cloreto de vinila) (PVC) (WAN; GALEMBECK; GALEMBECK, 2001). Muitos plásticos, borrachas e fibras, atualmente utilizadas, são polímeros sintéticos que podem ser produzidos normalmente a baixos custos e com propriedades alteradas, se apresentando, na maioria das vezes, mais resistentes, quando comparados aos materiais naturais.



Wan e colaboradores (2001) também salientam que a maioria dos produtos produzidos com os polímeros sintéticos convencionais, geralmente derivados do petróleo, são considerados inertes ao ataque imediato de micro-organismos. Esta propriedade faz com que esses materiais apresentem um tempo longo de vida útil e, conseqüentemente, provocam sérios problemas ambientais, visto que, após o seu descarte, demoram em média 100 anos para se decomporem totalmente, aumentando assim, a cada dia, a quantidade de resíduo plástico descartado no meio ambiente. Como solução para este problema surgem os polímeros biodegradáveis que, ao entrar em contato com micro-organismos, se degradam rapidamente, na ordem de semanas ou meses.

Entende-se por degradação de um polímero, toda mudança deletéria em suas propriedades, devido a alteração de sua estrutura química. Essa mudança pode ocorrer pelo relaxamento da cadeia polimérica, da quebra da unidade monomérica localizada na extremidade da cadeia polimérica ou ainda por cisão aleatória de uma ligação em alguma posição ao longo da cadeia. Esta cisão pode não ser aleatória, caso seja provocada pela ação de uma enzima. Seguindo este raciocínio, polímero biodegradável é aquele em que a degradação é medida total ou parcialmente por um sistema biológico, considerando que o prefixo “bio” é utilizado em fenômenos resultantes do contato com elementos vivos como tecidos, células, líquidos corporais ou micro-organismos (DURÁN; MATTOSO; DE MORAIS, 2006).

Em condições controladas, como em solos compostados, os polímeros biodegradáveis, em até 180 dias, tornam-se água, gás carbônico e húmus (biomassa) e esses resíduos servirão de matéria-prima para que uma planta, por exemplo, cresça e se desenvolva realizando o processo de fotossíntese (ABICOM, 2016).

#### 2.4 POLÍMERO POLI(L-ÁCIDO LÁCTICO) - PLLA

O ácido láctico pode ser proveniente da fermentação bacteriana da glicose do milho, da beterraba, da cana de açúcar, etc. É uma das moléculas quirais que existe na forma de dois estereoisômeros: L- e D- ácido láctico (ROITMAN; ALMEIDA; BORSCHIVER, 2008).

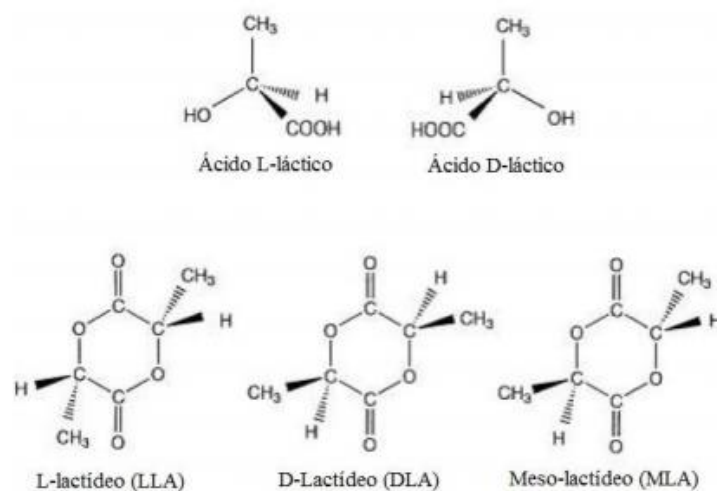
O poli(ácido láctico) - PLA é sintetizado a partir do ácido láctico e obtido por duas rotas de síntese (LUNT, 1998).

A primeira rota de síntese ocorre com a reação de policondensação direta, utilizando o ácido láctico como monômero. Esta é a forma mais simples e de mais baixo custo para a obtenção do polímero, porém leva à formação de um material com massa molar baixa, originando polímeros frágeis e quebradiços (MOTTA; DUEK, 2005).

A segunda alternativa consiste em realizar desidratação em duas moléculas de ácido láctico, formando o dímero cíclico do ácido láctico – lactídeo e por meio da utilização deste lactídeo como monômero, promover uma reação de polimerização pela abertura do anel do lactídeo, utilizando como catalisador um composto metálico. O produto desta reação é um polímero de elevada massa molar. A busca por polímeros que apresentam uma alta massa molar está relacionada ao incremento de propriedades mecânicas do material (SIMÕES, 2007).

Como o ácido láctico possui propriedade de ser opticamente ativo, apresentando duas formas isoméricas, uma levógira (L) e outra dextrógira (D), o lactídeo pode existir em três formas: L-lactídio – LLA, originando duas moléculas de L-ácido láctico; D-lactídeo – DLA, originando duas moléculas de ácido D-láctico; e mesolactídeo – MLA ou DL-lactídeo – DLLA, originando uma molécula de ácido L-láctico e uma molécula de D-láctico, conforme apresentado na Figura 5 (DOI; STEINBÜCHEL, 2002; MOTTA; DUEK, 2005).

Figura 5. Isomeria óptica do ácido láctico e do lactídeo.



Fonte: DOI; STEINBÜCHEL, 2002.

Com base no apresentado é possível então obter o PLA também nas respectivas estereoisômeros, sendo que poli(L-lactídeo) origina o PLLA. Já poli(D-lactídeo) origina o PDLA. A terceira forma do PLA é o poli(DL-lactídeo), que origina o PDLLA. Por fim, existe ainda o poli(meso-lactídeo) – PmLA - obtido pela polimerização do monômero MLA (LASPRILLA JR *et al.*, 2012; MOTTA; DUEK, 2005).

Tanto o PLLA quanto o PDLA são polímeros opticamente ativos, sendo suas estruturas imagens especulares uma da outra. Ambos apresentam características físicas e químicas similares. Por outro lado, as estruturas do PDLLA e do PmLA são caracterizadas por serem opticamente inativas e racêmicas, em função dos grupos metila apresentarem-se em uma configuração espacial desordenada, culminando em um polímero de baixo grau de cristalinidade ou amorfo (DINGEE, 2007; JAHNO, 2005; LUNT, 1998).

O PLLA consiste em um polímero termoplástico, hidrofóbico e com alto grau de cristalinidade. Trata-se de um poliéster de fonte renovável, pois seu pré-polímero, o ácido láctico pode ser obtido por fermentação. É considerado também compatível com tecidos vivos e atóxico. Por estas características, muitos estudos da área médica o contempla. Contudo, a característica de maior ênfase deste polímero, no presente trabalho, refere-se ao seu potencial de biodegradabilidade. Quando o PLLA é descartado corretamente, sofre hidrólise, sendo convertido em produtos naturais inofensivos. Desta forma, é um polímero de grande interesse tecnológico devido às suas aplicações no campo ambiental. Destacam-se as aplicações em embalagens (AVEROUS, 2008; BERTOLINI, 2007; GARLOTTA, 2001).

PLLA de alta elasticidade pode ser processado por técnicas convencionais utilizadas na indústria como: moldagem por injeção, termomoldagem e extrusão, tornando-se alternativa a polímeros convencionais como polietileno (PE), polipropileno (PP), poli(tereftalato de etileno) (PET) e poliestireno (PS), por exemplo (PEREIRA *et al.*, 2014).

Em relação às propriedades mecânicas, o PLLA é frágil, devido à falta de emaranhamento molecular, apresentando resistência ao impacto em torno de 26 J/m. Melhorias podem ser feitas por meio da introdução de ramificações na cadeia polimérica ou introdução de ligações cruzadas. Outra desvantagem do material refere-se a sua temperatura de transição vítrea, em torno de 60 °C. Suas baixas propriedades de barreira a gases, também comprometem a utilização do polímero em diversas aplicações, como no uso de determinadas embalagens alimentícias e de refrigerantes

(ARROYO, 2010; AVÉROUS, 2008; BLAKER *et al.*, 2009; LUNT, 1998; PEZZIN, 2001).

A fim de melhorar suas propriedades e tornar este polímero comercialmente competitivo com termoplásticos comuns, muitas estratégias têm sido desenvolvidas, destacando-se neste estudo a preparação de bionanocompósitos, tendo a matriz polimérica de PLLA reforçada com nanocristais de celulose bacteriana.

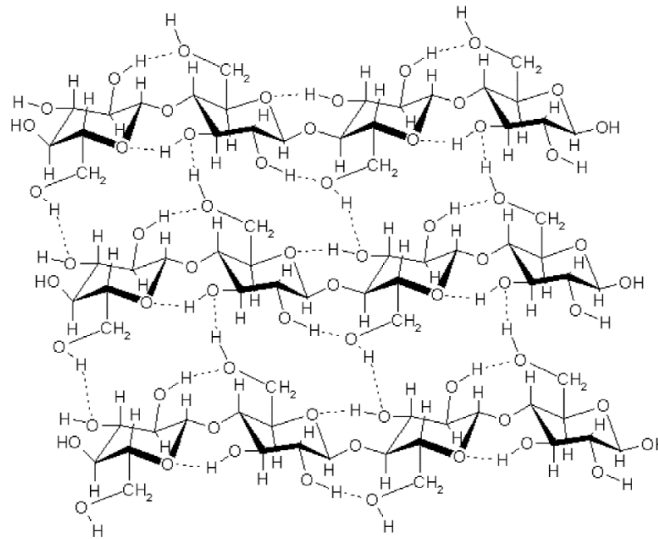
## 2.5 OBTENÇÃO DE NANOCRISTAIS DE CELULOSE BACTERIANA

### 2.5.1 Celulose

A celulose ( $C_6H_{10}O_5$ )<sub>n</sub>, consiste num polissacarídeo (carboidrato composto por várias moléculas de monossacarídeos - açúcares simples) formado por cadeias lineares não ramificadas de moléculas de β-D-glicose, unidas por ligação do tipo β (1→4) glicosídicas. Cada resíduo de glicose está rotacionado aproximadamente 180° em relação ao resíduo vizinho. A unidade estrutural de repetição da molécula de celulose é a celobiose, formada pela união de duas moléculas de glicose. A cadeia glicana pode ter de 2000 a mais de 25000 resíduos de glicose. A hidrólise total da celulose produz moléculas de glicose, enquanto que a hidrólise parcial produz molécula de celobiose (BROWN JR; SAXENA; KUDLICKA, 1996; RAVEN *et al.*, 2014).

Na natureza, a celulose não existe como uma única cadeia. As moléculas longas e rígidas de celulose combinam-se para formar microfibrilas, cada uma consistindo de várias cadeias de celulose. Estas cadeias estão orientadas paralelamente, formando ligações de hidrogênio intermolecular (entre unidades de glicose de moléculas de celulose adjacentes) e intramolecular (entre unidades de glicose da mesma molécula de celulose). O primeiro tipo de interação - intermolecular, é responsável pela formação da fibra, e o segundo tipo de interação - intramolecular, é responsável pela rigidez da cadeia (RAVEN *et al.*, 2014). A Figura 6 expõe a estrutura da celulose e as ligações de hidrogênio intermolecular e intramolecular. Estas redes apresentam um elevado índice de cristalinidade e elevado grau de polimerização e indicam que a celulose é um polímero termofixo (CALLISTER, 2012; LIMA *et al.*, 2015).

Figura 6. Estrutura química da celulose, mostrando ligações de hidrogênio intermolecular e intramolecular de cadeias de celulose.



Fonte: SAMEERRAHATEKAR, 2008.

A celulose é o polímero natural mais abundante na biosfera e possui grande importância na economia global. É obtida por meio de fontes renováveis, sendo a extraída de fonte vegetal a mais explorada comercialmente, devido a sua disponibilidade. Porém, além desta fonte, a celulose pode ser produzida por algas marinhas diversas, animais marinhos (como os tunicados) e por algumas espécies de bactérias (ERENO, 2004; LOPES, 2003; SILVA; D'ALMEIDA, 2009).

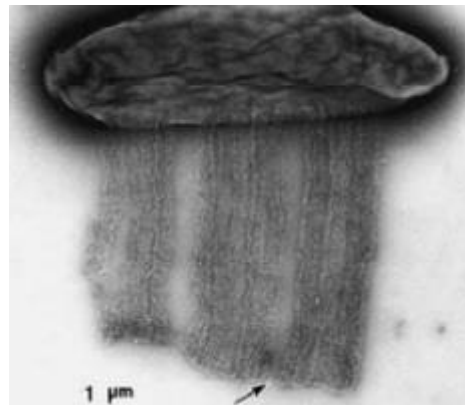
### 2.5.2 Celulose bacteriana

O primeiro estudo documentado relacionado à produção de celulose por bactéria foi relatado em 1886 por Adrian Brown, que observou um material gelatinoso que se formava na superfície de uma fermentação de vinagre. A análise deste material afirmou que se tratava de celulose. A bactéria produtora de celulose foi denominada *Acetobacter xylinum* (BROWN, 1886). Um estudo filogenético desenvolvido por Yamada, Hoshino e Ishikawaa (1997), reclassificou a bactéria *A. xylinum* (= *A. aceti* ssp. *Xylinum*, *A. xylinus*) incluindo-a no novo gênero *Gluconacetobacter* como *Gluconacetobacter xylinus*. Também foram incluídas neste gênero outras espécies como: *G. hansenii*, *G. europaeus*, *G. oboediens* e *G. intermedius*. A bactéria *A.*

*xylinum* ATCC 23769 (utilizada no presente estudo) foi reclassificada como *Gluconacetobacter hansenii*, uma bactéria gram-negativa, estritamente aeróbica, conhecida por produzir celulose na forma de uma membrana na interface líquido - ar do meio de cultivo. (DUDMAN, 1960; ROSS; MAYER; BENZIMAN, 1991; WATANABE, 1998).

A bactéria *G. hansenii* tem a capacidade de utilizar uma variedade de substratos carbônicos para a biossíntese da celulose. A via bioquímica mais compreendida envolve a conversão da glicose como substrato exógeno à celulose (RECOUVREUX, 2008; ROSS; MAYER; BENZIMAN, 1991). A Figura 7 foi obtida por microscopia eletrônica de transmissão (MET) e se trata da bactéria excretando as microfibrilas que compõe a membrana de celulose.

Figura 7. Imagem de MET da bactéria *Gluconacetobacter hansenii* excretando as fibrilas que compõe a membrana de celulose.



Fonte: HIRAI; TSUJI; HORII, 2002.

Segundo Recouvreux (2008) a produção de celulose bacteriana (CB) pode ser desenvolvida de três diferentes formas: cultivos em culturas estáticas, cultivos em culturas agitadas em agitador orbital ou cultivos em culturas agitadas em biorreator.

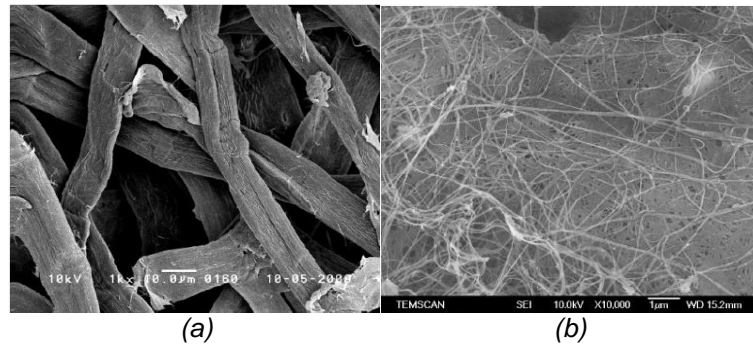
O método de produção de membranas de CB em cultura estática é simples, de baixo custo e extensivamente utilizado. Já que a camada de película que cresce é a que está em contato com o ar na superfície do meio de cultura, os nutrientes difundem pelas camadas de celulose já produzidas até as células produtoras de celulose (BORZANI; DE SOUZA, 1995).

Recouvreux (2008) também ressalta que, embora a produção de CB em culturas estáticas seja simples, existem inconvenientes que impedem o controle de parâmetros para melhorar o rendimento. Como a película é formada na superfície do meio de cultivo, movimentações e interferências para que se possam coletar medidas podem influenciar negativamente no crescimento. Desta forma é difícil manter o controle do pH, do crescimento celular e adicionar reagentes durante o cultivo. E sabe-se que estes parâmetros são importantes para determinar condições ótimas de produtividade. Visando maximizar a produção de CB, sistemas agitados têm sido estudados. Inicialmente as culturas são desenvolvidas em frascos erlenmeyer, em agitador orbital. Posteriormente, o cultivo é transferido para biorreatores. Ao contrário do cultivo em condições estáticas, o volume do meio de cultivo em condições agitadas influencia no rendimento. No entanto, o rendimento obtido do cultivo em agitador orbital é consideravelmente menor do que o cultivo obtido sob condições estáticas. Um dos grandes problemas deste sistema para produção de CB em culturas agitadas refere-se a mutações espontâneas. Bactérias produtoras de celulose, quando transferidas para culturas agitadas, espontaneamente se transformam em linhagens não produtoras de celulose, implicando no aumento da densidade celular, resultando em baixo rendimento de celulose.

A CB pode ser sintetizada a partir de uma variedade de substratos como: glicose, sacarose, frutose, glicerol, manitol, entre outros. Desta forma é possível modificar e controlar as propriedades físicas da celulose durante a sua síntese. A espessura, a coloração e a transparência da membrana podem ser controladas por meio do tempo de cultivo da bactéria (RECOUVREUX, 2008; SANTOS, 2012).

A CB possui a mesma fórmula química da celulose vegetal. A grande vantagem refere-se à pureza, pois não contém lignina, hemiceluloses e outros constituintes presentes em materiais lignocelulósicos. Conseqüentemente, o processo de purificação envolve menor contaminação e baixo custo (BARUD, 2010; SILVA; D'ALMEIDA, 2009). Além disto, suas propriedades físicas são superiores devido ao tamanho das fibras, que são cerca de 100 vezes menores quando comparadas à celulose vegetal (JONAS; FARAH, 1998). A Figura 8, correspondente a micrografias, representa a diferença de tamanho das fibras da celulose vegetal e da CB.

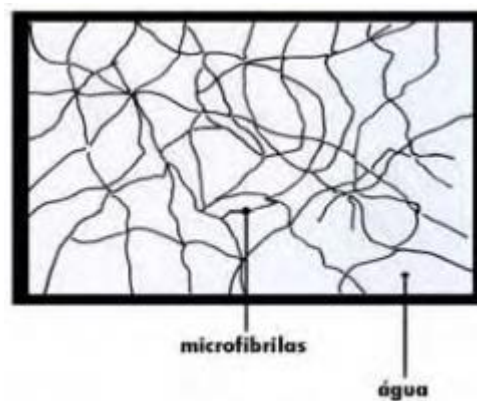
Figura 8. Micrografias das fibras da celulose vegetal (a) e das fibras da CB (b).



Fonte: DONINI *et al.*, 2010.

Membranas de CB possuem uma estrutura altamente hidratada e são formadas por um sistema poroso, como sugere a Figura 9 (BARUD, 2010).

Figura 9. Estrutura fibrilar altamente porosa da CB.



Fonte: BARUD, 2010.

A CB surge como uma alternativa competitiva, possuindo como principais características: alta cristalinidade, alta resistência à tração, elasticidade, durabilidade, potencial hidrofílico (capacidade de retenção e absorção de água – cerca de 98 % a 99 % de seu volume é composto de líquidos), atoxicidade, biocompatibilidade e biodegradabilidade. Estas importantes propriedades têm conduzido pesquisadores a encontrar uma gama de aplicações para este material. Sua aplicabilidade pode ser empregada na área biomédica, na indústria alimentícia, de cosméticos, de fármacos,



de embalagens e em aplicações industriais específicas e diversas (BARUD, 2010; RECOUVREUX, 2008).

A aplicabilidade da CB é muito extensa. Na indústria alimentícia ela é utilizada na produção de natas de coco, sorvetes, aperitivos, doces, espessantes e soros para a redução de colesterol. Na indústria de cosméticos a CB é utilizada como hidratantes e adstringentes. Em empresas de eletroacústicos é utilizada como membranas para aparelhos de áudio de alta qualidade. A CB também é utilizada como aditivo de papéis de alta qualidade, papéis eletrônicos (*e-papers*); membranas de ultrafiltração (purificação de água) e membranas para recuperação de óleo mineral (BROWN JR; SAXENA; KUDLICKA, 1996, DONINI *et al.*, 2010).

Nos últimos anos a CB tem despertado grande interesse em uma variedade de aplicações biomédicas, incluindo substituto temporário da pele para recuperação de ferimentos e queimaduras, produção de vasos sanguíneos, recuperação de nervos, recuperação da gengiva, arcabouços para engenharia de tecidos, material de regeneração óssea, etc (CIRIGO Y PÉREZ, 2014; CZAJA *et al.*, 2006; CZAJA *et al.*, 2007; ERENO, 2004; NEGRÃO *et al.*, 2006; OLIVEIRA; RAMBO; PORTO, 2013; SANCHEZ, 2012; SVENSSON *et al.*, 2005).

Para Silva e D'Almeida (2009) destacam-se também aplicações que envolvem a utilização da CB em embalagens flexíveis ou rígidas, que devem gerar num futuro próximo um grande interesse econômico.

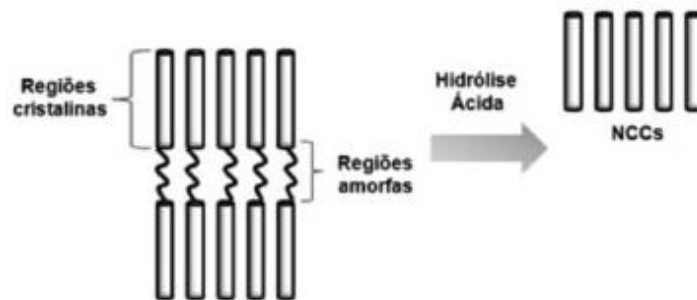
### 2.5.3 Nanocristais de celulose bacteriana

Na concepção de Lima *et al.* (2015) membranas de celulose bacteriana também se configuram como fonte de extração de nanocristais. Estes nanocristais de celulose bacteriana (NCCBs) consistem em domínios cristalinos de fibras celulósicas, isolados por meio de hidrólise ácida ou enzimática, representando as melhores propriedades da celulose bacteriana em termos de força e resistência.

O presente trabalho utiliza em sua metodologia a hidrólise ácida para a extração de NCCBs. Sob condições controladas, a hidrólise ácida se inicia por um processo de fibrilação, o que permite um maior acesso do ácido ao longo da estrutura da fibra. O ácido destrói regiões amorfas ao redor e entre as microfibrilas de celulose, enquanto os segmentos cristalinos continuam intactos, já que a cinética da hidrólise

na região amorfa é mais rápida do que na região cristalina. Em uma fibra celulósica há cerca de 25 a 40 % de regiões amorfas (HUBBE *et al.*, 2008; SILVA; D'ALMEIDA, 2009). O esquema com as regiões amorfas e cristalinas, está contido na Figura 10.

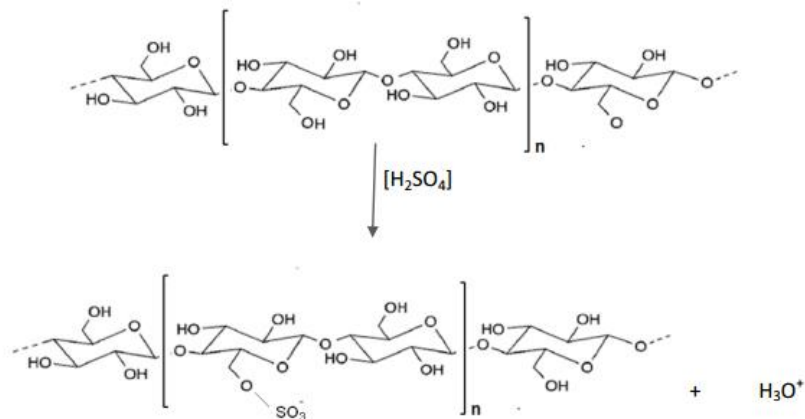
Figura 10. Esquema com as regiões amorfas e cristalinas.



Fonte: PEREIRA *et al.*, 2014.

Em uma hidrólise ácida para a obtenção de NCCBs geralmente são usados o ácido clorídrico (HCl) ou ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ), sendo que o último tende a fornecer suspensões mais estáveis, com dispersão favorecida, o que se deve à repulsão eletrostática entre as nanopartículas, causada pela presença de grupos sulfatos na cadeia de celulose, como mostrado na Figura 11 (TAIPINA, 2012).

Figura 11. Representação da inserção do grupo sulfato proveniente da hidrólise com  $H_2SO_4$  na cadeia da celulose.



Fonte: TAIPINA, 2012.

Por outro lado, Taipina (2012) pondera que NCCBs isolados por hidrólise com ácido clorídrico não formam suspensão estável, entretanto são termicamente mais estáveis, devido à ausência de grupos sulfato na superfície da celulose, cuja presença interfere no processo de degradação da celulose.

O tamanho dos NCCBs depende fortemente das condições de hidrólise a que é submetida a CB. Utilizando microscopia, é observado que as partículas (NCCBs) obtidas da suspensão hidrolisada, após secagem, são compostas por agregados de estruturas em forma de agulhas, também designadas *whiskers*, cujas dimensões predominantes variam entre 100 – 400 nm de comprimento e diâmetros inferiores a 10 nm (ALEMDAR; SAIN, 2008).

Alguns exemplos de extração de NCCBs têm sido relatados na literatura. Porém estudos envolvendo influência das condições de hidrólise ácida como tipo de ácido empregado, concentração de ácido, temperatura de reação e tempo de hidrólise devem ser melhor explorados para que se encontre a melhor condição de extração de nanocristais.

#### 2.5.3.1 Estado da arte sobre extração de nanocristais de celulose com ácido sulfúrico

Taipina (2012) evidencia com base em diversos trabalhos experimentais que entre as espécies de ácidos reportadas, o ácido sulfúrico é o mais utilizado para isolamentos de nanocristais de celulose. A concentração de ácido sulfúrico em reações de hidrólise não varia muito de um valor típico de 65 % em massa. As temperaturas empregadas variam de temperatura ambiente até 70 °C. As variações de tempo mais empregadas estão na faixa de 20 a 60 minutos.

O Quadro 1 apresenta uma síntese dos principais resultados obtidos por alguns autores que estudaram a extração de nanocristais de celulose (considerando fontes variadas) por hidrólise ácida com ácido sulfúrico, variando condições de hidrólise.

Quadro 1. Resultados obtidos por alguns autores que estudaram a extração de nanocristais de celulose por hidrólise com ácido sulfúrico, variando condições de hidrólise.

Fonte	Condições Variáveis	Condições Estáveis	Principais Resultados	Referência
Celulose bacteriana	Tempo – de 5 a 90 minutos.	1) Concentração de ácido – 65%; 2) Temperatura – 50 °C.	1) A partir de 15 min de hidrólise, dimensões dos nanocristais tornam-se estáveis; 2) A partir de 15 min de hidrólise, a cristalinidade não varia; 3) Tempo inferior a 15 min é insuficiente para a remoção da porção amorfa; 4) Temperatura inicial de degradação térmica diminui gradativamente, conforme aumento do tempo de hidrólise.	Lima <i>et al.</i> , 2015
Línter de algodão	Temperatura – de 45 °C a 72 °C.	1) Concentração de ácido – 65%. 2) Tempo – 30 min.	1) Redução de dimensões dos nanocristais, conforme aumento de temperatura.	Elazzouzi-Hafraoui <i>et al.</i> , 2008
Línter de algodão	Tempo.	1) Concentração de ácido; 2) Temperatura.	1) Redução de dimensões dos nanocristais, conforme aumento de tempo.	Dong; Revol; Gray, 1998
Polpa de madeira	Tempo.	1) Concentração de ácido; 2) Temperatura.	1) Redução de dimensões dos nanocristais conforme aumento de tempo.	Beck-Candanedo; Roman; Gray, 2005

Fonte: Primária, 2016.

O grupo de Lima (2015) conduziu um estudo sobre a influência do tempo de hidrólise na extração de NCCBs. Os experimentos foram realizados utilizando a concentração de 65 % de ácido sulfúrico (m/m), em temperatura de 50 °C. Os intervalos de tempos de hidrólise variaram de 5 a 90 minutos. Observou-se que as

dimensões dos NCCBs se tornaram estáveis após 15 minutos de reação. A cristalinidade dos NCCBs apresentou aumento gradual até 10 minutos e a partir de 15 minutos estabilizou-se (indicando que as regiões amorfas foram removidas). Outro aspecto observado foi em relação à temperatura inicial de degradação, que diminuiu conforme o aumento de tempo de hidrólise, devido ao maior contato com o ácido sulfúrico, que diminui a termoestabilidade do NCCBs.

Elazzouzi-Hafraoui e colaboradores (2008) trabalharam em função da variação de temperatura de hidrólise na extração de nanocristais de línter de algodão para verificar a influência sobre as dimensões dos nanocristais. Fizeram experimentos realizando hidrólise com concentração de 65 % de ácido sulfúrico (m/m), durante 30 minutos. Os intervalos de temperatura de hidrólise variaram de 45 a 72 °C. Os autores concluíram que houve redução gradativa de dimensões dos nanocristais conforme aumento de temperatura.

Outra pesquisa sobre hidrólise ácida para extração de nanocristais de línter de algodão foi feita por Dong, Revol e Gray (1998), também com o objetivo de estudar as dimensões, porém em relação à variação de tempo, estabilizando a concentração de ácido sulfúrico e temperatura. O resultado obtido foi a redução gradual de dimensões dos nanocristais conforme o aumento de tempo. Resultados similares foram obtidos no estudo de Beck-Candanedo, Roman e Gray (2005), que se diferenciou pela fonte de obtenção de celulose, extraída de polpa de madeira.

É de grande valia reforçar que a fonte de celulose utilizada no presente trabalho é bacteriana e que a fórmula da celulose é a mesma, independentemente da fonte de extração. Por este motivo, resultados de estudos com celulose proveniente de diversas fontes foram considerados, partindo-se do princípio que o mecanismo de hidrólise ácida seja similar.

A equipe de Pereira (2014) ressalta que a inserção de NCCBs em polímeros biodegradáveis tem sido mencionada na literatura como excelente alternativa para melhorias em algumas de suas propriedades como: mecânicas, de barreira a gases e térmicas. Estes materiais compósitos podem ser preparados por metodologias adequadas à escala laboratorial ou por meio de técnicas aplicáveis à escala industrial. Estes nanocristais podem ser utilizados como reforços em matrizes poliméricas.

## 2.6 OBTENÇÃO DE BIONANOCOMPÓSITOS REFORÇADOS COM NANOCRISTAIS DE CELULOSE

Quando matriz e reforço de um nanocompósito (como no caso do PLLA reforçado com NCCBs) são biodegradáveis, tem-se um bionanocompósito, termo relatado na literatura nos últimos anos (RESENDE, 2015).

Os bionanocompósitos representam uma classe relativamente nova de materiais que tem atraído grande atenção, principalmente pela necessidade de desenvolvimento de materiais ecologicamente corretos. Por isto, diversos autores têm trabalhado com este enfoque (ABDOLLAHI *et al.*, 2013; HASSAN *et al.*, 2012; PATRÍCIO *et al.*, 2013; SHI *et al.*, 2012).

Devido às excelentes propriedades mecânicas, baixa densidade (cerca de  $1,6 \text{ g cm}^{-3}$ ) e superfície reativa pela presença de grupos hidroxila (que facilitam o ancoramento de grupos químicos específicos que melhoram a compatibilidade entre carga e matriz), os nanocristais de celulose se apresentam como materiais adequados para o desenvolvimento de novos bionanocompósitos (SAMIR; ALLOIN; DUFRESNE, 2005).

Dufresne (2010) lembra que como em todo material compósito, as propriedades dos bionanocompósitos dependem das propriedades individuais de cada componente (matriz e reforço), da composição (fração volumétrica dos constituintes), da morfologia de cada fase (arranjo espacial, dimensões, cristalinidade) e das propriedades de interface.

Samir, Alloin e Dufresne (2005) salientam a importância de três parâmetros na definição das propriedades mecânicas de compósitos com nanocristais de celulose. O primeiro é a razão de aspecto ( $L/d$ ) dos nanocristais, que está relacionada ao material de origem e método de extração. Quanto maior é esta razão, maior é o efeito do reforço esperado. O segundo é o método de preparação dos nanocompósitos, que pode ser por evaporação de solvente ou no estado fundido, em processos baseados em extrusão e injeção. O terceiro parâmetro é o resultado das interações entre matriz/nanopartículas e entre as nanopartículas. Em compósitos convencionais, a priorização do primeiro tipo de interação é importante na busca de propriedades mecânicas. No entanto, no caso dos nanocristais, a perspectiva de formação de uma rede percolada está relacionada à capacidade de interação entre as nanopartículas por meio de interações por ligação de hidrogênio.

Pereira e colaboradores (2014) destacam que os nanocompósitos formados por polímeros biodegradáveis e nanocristais de celulose têm sido preparados, em escala laboratorial, em diferentes formatos como: filmes, cápsulas, esferas e fibras; por meio de diferentes técnicas como: evaporação de solvente, filmes automontados e eletrofiação. Contudo, a técnica que tem sido mais utilizada e descrita na literatura é a obtenção de filmes por evaporação de solvente, por se tratar de estudos que visam basicamente investigar efeitos físico-químicos que os nanocristais de celulose podem incorporar às matrizes poliméricas em escala laboratorial.

### 2.6.1 Estado da arte sobre bionanocompósitos reforçados com nanocristais de celulose

O Quadro 2 apresenta uma síntese dos principais resultados obtidos por alguns autores que estudaram bionanocompósitos (considerando diversas matrizes), reforçados com nanocristais de celulose (considerando fontes variadas). Este quadro foi elaborado com base no levantamento de publicações feito por Pereira e sua equipe (2014).

Quadro 2. Resultados obtidos por alguns autores que estudaram bionanocompósitos reforçados com nanocristais de celulose.

<b>Matriz</b>	<b>Principais Resultados</b>	<b>Referências</b>
PLAs	1) Aumento de cristalinidade; 2) Diminuição de velocidade de degradação; 3) Aumento de resistência à tração; 4) Aumento de módulo de elasticidade; 5) Aumento de estabilidade térmica; 6) Aumento de temperatura de transição vítrea.	de Paula; Mano; Pereira, 2011  Fortunati <i>et al.</i> , 2012  Lin <i>et al.</i> , 2011 b  Petersson; Kvien; Oksman, 2007  Shi <i>et al.</i> , 2012
Quitosana	1) Boa compatibilidade entre reforço e matriz; 2) Diminuição de permeabilidade; 3) Aumento de resistência à tensão; 4) Aumento de resistência à tração; 5) Aumento de módulo de elasticidade; 6) Aumento de temperatura de transição vítrea.	Azeredo <i>et al.</i> , 2010  de Mesquita <i>et al.</i> , 2012  Li; Zhou; Zhang, 2009

Poli(hidroxibutirato) (PHB)	1) Diminuição de cristalinidade; 2) Aumento de resistência à tensão; 3) Aumento de resistência à tração; 4) Aumento de módulo de elasticidade; 5) Diminuição de temperatura de cristalização; 6) Aumento de temperatura de fusão.	Patrício <i>et al.</i> , 2013  Ten <i>et al.</i> , 2010  Yu; Qin; Zhou, 2011
Amido	1) Boa compatibilidade entre reforço e matriz; 2) Diminuição de permeabilidade; 3) Aumento de resistência à tração; 4) Aumento de módulo de elasticidade; 5) Aumento de temperatura de transição vítrea.	Angles & Dufresne, 2000  Cao <i>et al.</i> , 2008  Chen <i>et al.</i> , 2012  Savadekar & Mhaske, 2012  Silva; Pereira; Druzian, 2012
Poli( $\epsilon$ -caprolactona) (PCL)	1) Aumento de velocidade de degradação; 2) Diminuição da permeabilidade; 3) Melhoria de propriedades mecânicas (em geral).	Goffin <i>et al.</i> , 2012  Hassan <i>et al.</i> , 2012
Proteína de soja	1) Boa compatibilidade entre matriz e reforço; 2) Diminuição da permeabilidade; 3) Aumento de resistência à tração; 4) Aumento de módulo de elasticidade; 5) Aumento de temperatura de transição vítrea.	Wang; Cao; Zhang, 2006
Alginato	1) Aumento de cristalinidade; 2) Diminuição de permeabilidade; 3) Aumento de resistência à tração; 4) Aumento de módulo de elasticidade.	Abdollahi <i>et al.</i> , 2013  Azeredo <i>et al.</i> , 2012  Lin <i>et al.</i> , 2011 a  Urenã-Bunavides; Brown; Kitchens, 2010
Lignina	1) Aumento de estabilidade térmica.	Hambardzumhan <i>et al.</i> , 2011
Carragenana	1) Diminuição de permeabilidade; 2) Melhoria de propriedades mecânicas (em geral).	Savadekar <i>et al.</i> , 2012
Xilana	1) Melhoria de propriedades mecânicas (em geral).	Kohnke <i>et al.</i> , 2012
Fibroína de seda	1) Aumento de resistência à tração; 2) Aumento de módulo de elasticidade.	Noishiki <i>et al.</i> , 2002

Fonte: Primária, 2016.

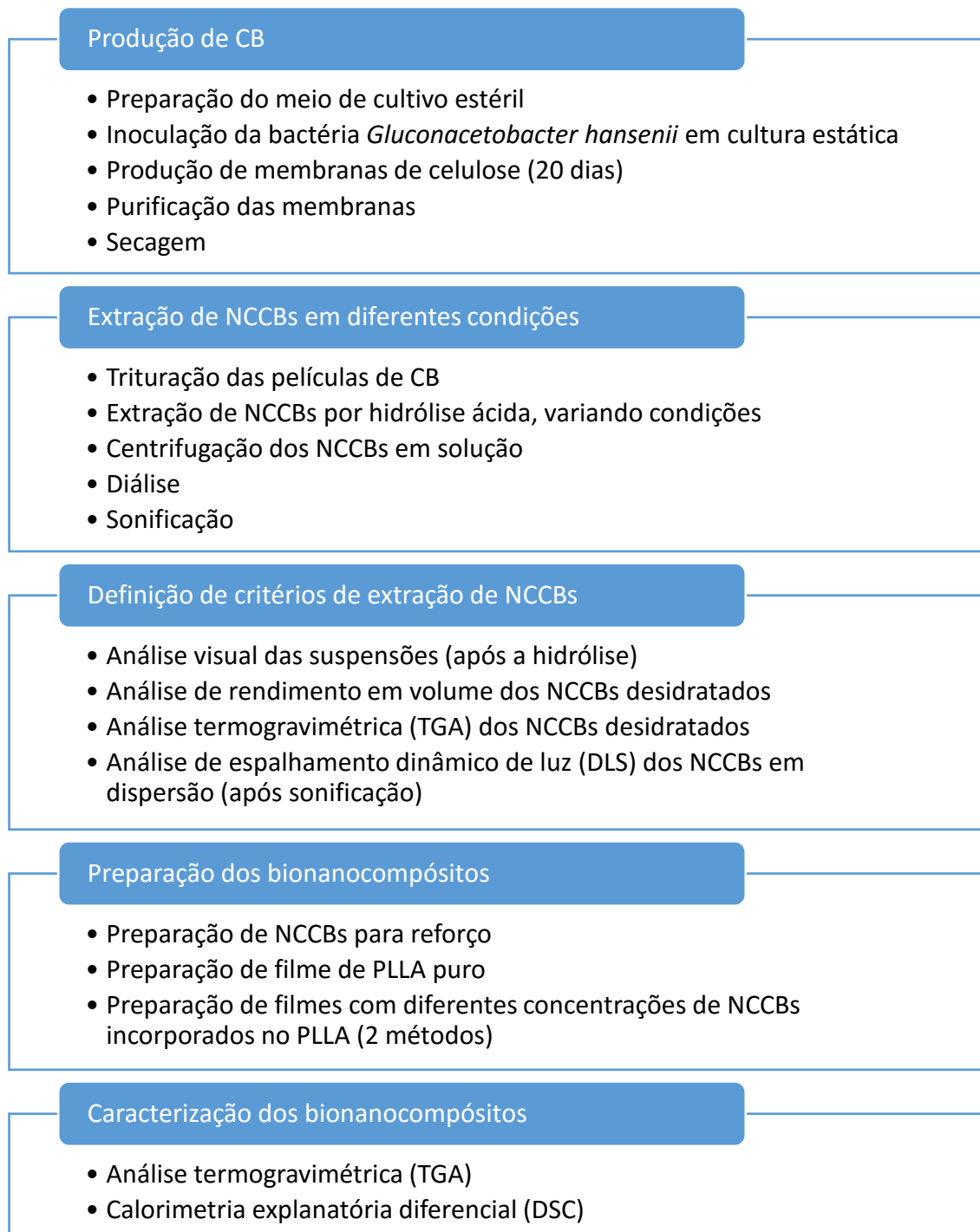
Para este trabalho destacam-se bionanocompósitos preparados com matriz de PLLA e reforço de NCCBs.



### 3 METODOLOGIA

A sequência dos procedimentos metodológicos utilizada para este trabalho está listada na Figura 12 e detalhada nos tópicos seguintes.

Figura 12. Procedimentos metodológicos utilizados neste trabalho.



### 3.1 PRODUÇÃO DE CELULOSE BACTERIANA

Foram sintetizadas 60 membranas de CB. O fluxograma da etapa de produção de cada membrana de CB está ilustrado na Figura 13.

#### 3.1.1 Microrganismo

O microrganismo utilizado neste trabalho foi a *bactéria Gluconacetobacter hansenii*, da linhagem ATCC 23769.

Para a manutenção do microrganismo foi empregado o congelamento em freezer a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , tendo glicerol como agente crioprotetor.

#### 3.1.2 Meios de cultivo

O meio de cultivo utilizado tanto na fase de ativação das células (pré-inóculo) quanto na fase de produção das membranas foi o mesmo.

O meio de cultivo foi constituído de manitol (20 g/L), peptona (5 g/L), extrato de levedura (5 g/L), fosfato dissódico (2,7 g/L) e ácido cítrico (1,15 g/L). O mesmo foi esterilizado em autoclave a  $120\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 20 min.

#### 3.1.3 Condições de cultivo

Cada meio de cultivo estéril, contendo 100 mL de água destilada, foi preparado em frasco de erlenmeyer (com capacidade máxima de 250 mL), com 2 g de manitol (20 g/L), 0,5 g de peptona (5 g/L), 0,5 g de extrato de levedura (5 g/L), 0,27 g de fosfato dissódico (2,7 g/L) e 0,115 g de ácido cítrico (1,15 g/L).

Para a preparação do pré-inóculo, as células foram ativadas em frascos contendo no total 1500 mL de meio, sendo incubadas a temperatura ambiente sob condições estáticas por 2 dias.

Após este período, 25 mL do pré-inóculo (proporção de 20% (V/V)) foi transferido para cada meio de cultivo, preparados para a produção das membranas e mantidos em cultura estática, sob temperatura ambiente, durante o período de 20 dias, para a produção das mantas hidratadas de CB.

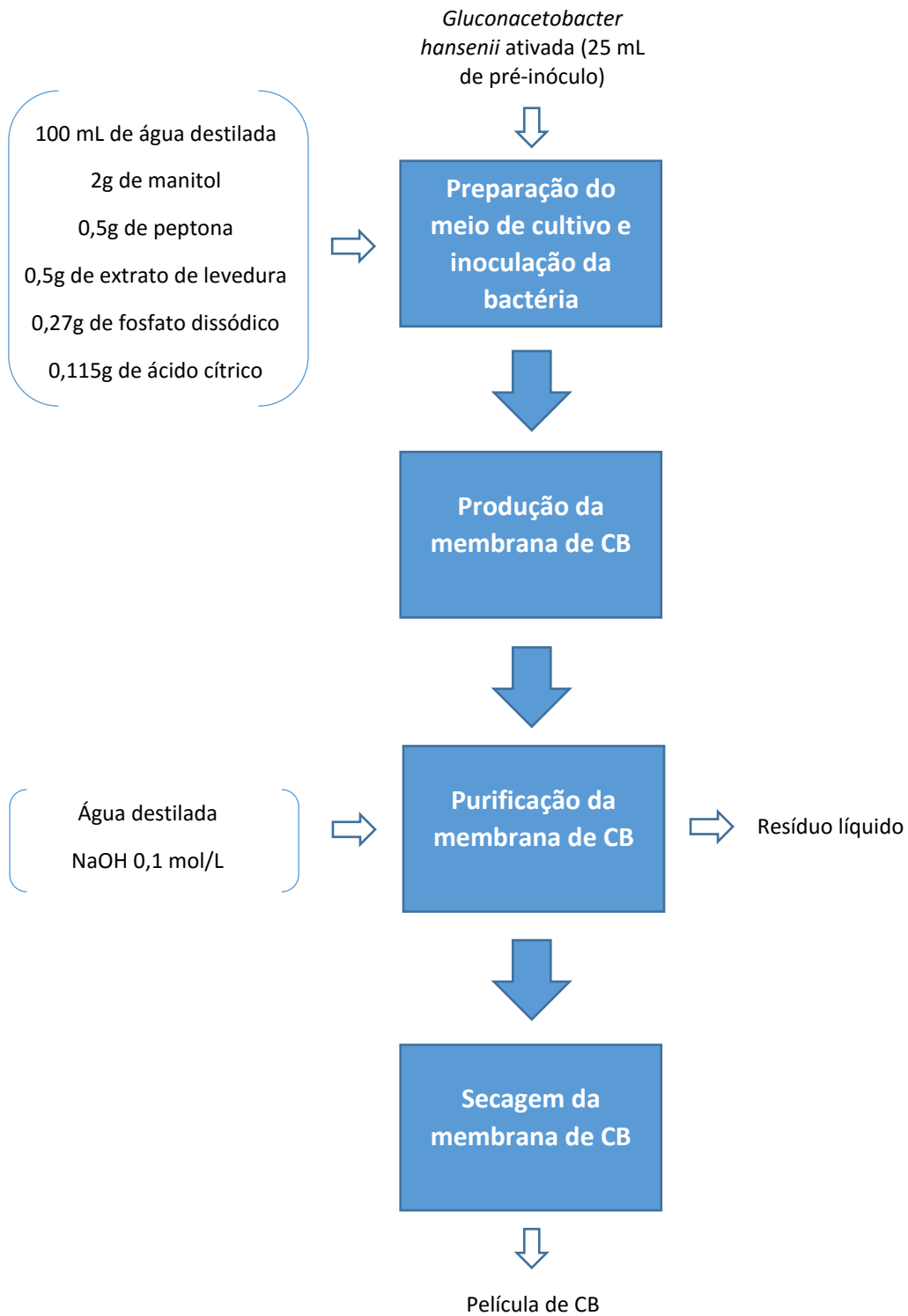
#### 3.1.4 Purificação e secagem da celulose bacteriana

A manta hidratada de CB, produzida na superfície de cada meio de cultivo, foi retirada com o auxílio de pinças. O procedimento seguinte consistiu na purificação das membranas (mantas hidratadas). Estas foram submetidas a cinco trocas de água destilada por dia, durante três dias. Após as trocas de água, as membranas foram aquecidas em água destilada à temperatura de 80 °C, durante 50 min, em banho-maria. Em seguida, após o descarte da água, para a remoção das bactérias, as membranas foram tratadas com solução de NaOH 0,1 mol/L, em banho-maria, à temperatura de 80 °C, por 50 min, e então lavadas abundantemente com água destilada até atingir pH 7.

Para a secagem foi utilizada estufa com circulação de ar (de marca Memmert), com temperatura de 30 °C, por 36 h. Desta forma, obteve-se finas películas de CB, com aproximadamente 0,3 g.

Os procedimentos para a produção de CB tiveram como base a metodologia proposta por Lima e colaboradores (2015). No entanto, foram feitas algumas adaptações, conforme a pretensão das análises, a disponibilidade de materiais e estrutura dos laboratórios de pesquisa utilizados na UNIVILLE (Materiais e Biotecnologia 1 e 2).

Figura13. Fluxograma da etapa de produção de membranas de celulose bacteriana.



### 3.2 EXTRAÇÃO DE NANOCRISTAIS DE CELULOSE BACTERIANA EM DIFERENTES CONDIÇÕES

As películas de CB produzidas foram trituradas.

Os nanocristais do material polimérico triturado foram extraídos por hidrólise ácida com ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ). O ácido sulfúrico foi escolhido seguindo a literatura, por fornecer suspensões estáveis (TAIPINA, 2012).

Para a definição de critérios de extração de NCCBs (com a finalidade de empregá-los como reforço em matriz polimérica de PLLA) foram realizados ensaios baseados em um planejamento experimental relacionando onze variações, que podem ser empregadas em hidrólise ácida, utilizando o ácido sulfúrico. Os parâmetros variados foram: concentração de ácido (m/m) utilizado na hidrólise, temperatura em que a hidrólise foi realizada e tempo de hidrólise. A Tabela 1 representa as variáveis independentes e os níveis utilizados no planejamento experimental  $2^3$ , completo, com 3 pontos centrais.

Tabela 1. Variáveis independentes e os níveis utilizados no planejamento experimental  $2^3$ , completo, com 3 pontos centrais.

Parâmetros	Níveis		
	-1	0	+1
Concentração de ácido (m/m) - [ ] (%)	50	65	80
Temperatura - T (°C)	40	50	60
Tempo - t (min)	20	40	60

As variáveis médias de concentração de ácido, temperatura e tempo, foram definidas com base na literatura (LIMA *et al.*, 2015; TAIPINA, 2012).

A Tabela 2 representa o planejamento experimental completo, com o arranjo das variáveis independentes de cada ensaio.

Tabela 2. Arranjo das variáveis independentes de cada ensaio, conforme planejamento experimental  $2^3$ , completo, com 3 pontos centrais.

Ensaio	Variáveis Codificadas			Variáveis Reais		
	[ ] (%)	T (°C)	t (min)	[ ] (%)	T (°C)	t (min)
1	-1	-1	-1	50	40	20
2	+1	-1	-1	80	40	20
3	-1	+1	-1	50	60	20
4	+1	+1	-1	80	60	20
5	-1	-1	+1	50	40	60
6	+1	-1	+1	80	40	60
7	-1	+1	+1	50	60	60
8	+1	+1	+1	80	60	60
9	0	0	0	65	50	40
10	0	0	0	65	50	40
11	0	0	0	65	50	40

Onze amostras, correspondentes aos ensaios foram preparadas em frascos de béqueres identificados, contendo 1,5 g de CB triturada e 26,25 mL de solução de  $H_2SO_4$  (m/m), variando as três diferentes concentrações.

Durante a hidrólise manteve-se agitação constante de 150 rpm. Esta condição de agitação e as condições de temperatura, foram controladas em shaker (de marca Certomat). Desta forma, os experimentos foram separados de acordo com as temperaturas similares, respeitando os respectivos tempos de reação, que foram cronometrados.

A hidrólise de cada experimento foi cessada diluindo-se a mistura dez vezes com água destilada gelada.

As suspensões relativas aos onze ensaios foram centrifugadas três vezes a 8000 rpm, por 10 min, em centrífuga (de marca Labor). Após cada centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o precipitado (contendo os NCCBs) ressuspenso em água destilada, com o propósito de diminuir a acidez (facilitando a próxima etapa - diálise). A centrifugação foi realizada com refrigeração a 10 °C para evitar que o processo de hidrólise continuasse, já que é favorecido em altas temperaturas, considerando que o atrito gerado durante a centrifugação aumenta temperatura do equipamento.

O precipitado resultante das onze suspensões (obtido após as centrifugações) foi transferido para membranas de acetato de celulose (de marca Spectra/Por), com diâmetro de 32 mm e porosidade de 10-12 kD, para diálise contra água destilada até atingir pH 7. Este procedimento levou de 1-5 dias, dependendo da acidez de cada amostra.

As amostras de NCCBs foram sonificadas por 30 min em banho de ultrassom (de marca Thornton). A sonificação é um procedimento que utiliza a energia das ondas sonoras aplicada a um sistema químico, promovendo a agitação das partículas. Esta etapa foi realizada para soltar facilmente as partículas aderidas às paredes dos onze recipientes que continham as amostras e para o rompimento de agregados.

Os procedimentos descritos para extração de NCCBs tiveram como base a metodologia proposta por Lima e colaboradores (2015). No entanto, foram feitas algumas adaptações, conforme a pretensão das análises, a disponibilidade de materiais e estrutura dos laboratórios de pesquisa utilizados na UNIVILLE (Materiais e Biotecnologia 1 e 2).

### 3.3 DEFINIÇÃO DE CRITÉRIOS DE EXTRAÇÃO DE NANOCRISTAIS DE CELULOSE BACTERIANA

A definição de critérios de extração de NCCBs (tendo como base o planejamento experimental) foi feita por meio de análise visual das suspensões após a hidrólise; análise de rendimento em volume dos NCCBs desidratados; análise termogravimétrica (TGA) dos NCCBs desidratados, realizada na UNIVILLE, no Laboratório de Materiais, para o estudo da estabilidade térmica; e análise de espalhamento dinâmico de luz (DLS) dos NCCBs em dispersão, na Universidade Estadual Paulista (UNESP), na unidade de Araraquara, no Laboratório de Farmacotécnica, com o objetivo de verificar presença, tamanhos e potencial zeta das nanopartículas.

### 3.3.1 Análise visual das suspensões

Para a análise visual, as suspensões referentes aos 11 experimentos, após o procedimento hidrólise ácida (descrita no tópico 2.2), foram comparadas em relação a degradação da CB.

### 3.3.2 Análise de rendimento em volume dos NCCBs

Para a análise de rendimento em volume, os NCCBs correspondentes aos 11 experimentos, após serem sonificados, foram desidratados por liofilização durante 24 h, em liofilizador (de marca Terroni).

### 3.3.3 Análise termogravimétrica (TGA) dos NCCBs

Para a análise de TGA, os NCCBs correspondentes aos 11 experimentos, após serem sonificados, também foram desidratados por liofilização por 24 h.

O equipamento utilizado para a análise foi o TGA-Q50, da TA Instruments, sob atmosfera inerte de N<sub>2</sub>. As amostras foram inseridas no porta-amostras e aquecidas de 25-1000 °C, a uma taxa de aquecimento de 10 °C/min.

Os parâmetros experimentais foram ajustados no *software* TA Universal Analysis e representados graficamente para interpretação.

As curvas de TGA dos NCCBs de cada experimento, foram comparadas à curva de TGA da CB pura (produzida conforme o tópico 2.1 desta metodologia), para melhor compreensão.

Uma análise estatística feita utilizando o *software* Statística 7 complementou o estudo termogravimétrico.



### 3.3.4 Análise de espalhamento dinâmico de luz (DLS) dos NCCBs

Para a análise de DLS, as amostras líquidas foram coletadas após o procedimento de sonificação (descrita no tópico 2.2).

O equipamento utilizado para a análise foi o Zetasizer Nano Series (de marca Malvern Instruments), em comprimento de onda de 633 nm, a 25 °C, em um ângulo de detecção de 173°. As amostras foram diluídas em água purificada antes de cada medida e as medidas foram feitas em triplicata.

Para este trabalho, a análise foi realizada para a determinação dos tamanhos e potencial zeta (indicador de dispersão de partículas em meio aquoso) dos NCCBs, antes de incorporá-los na matriz de PLLA.

## 3.4 PREPARAÇÃO DOS BIONANOCOMPÓSITOS

### 3.4.1 Preparação de nanocristais de celulose bacteriana (NCCBs)

Os NCCBs extraídos conforme critérios definidos (melhor condição experimental de hidrólise) foram desidratados por liofilização, durante 24 h.

### 3.4.2 Preparação de filme de Poli(L-ácido láctico) (PLLA) puro e com diferentes concentrações de nanocristais de celulose bacteriana

#### 3.4.2.1 Filme de poli(L-ácido láctico) (PLLA) puro

PLLA (0,75 g) de massa molar de 105.300 g/mol (de marca Natural Works) foi dissolvido em clorofórmio (25 mL), em agitador magnético por 24 h, para formar solução 3 % (m/v), conforme metodologia proposta por De Almeida (2010).

Ao final deste processo, a solução foi vertida em placa de Petri com tampa e mantida em capela de exaustão de gases por 48 h, em temperatura ambiente, para a evaporação lenta do solvente e formação de filme.

Após a evaporação do solvente, os filmes foram secos em estufa a vácuo (de marca Nova Ética), a 30 °C, sob pressão de 400 mm de Hg, por 24 h e armazenados em dessecador.

#### 3.4.2.2 Filmes com diferentes concentrações de Nanocristais de Celulose Bacteriana incorporados em Poli(L-ácido láctico) (PLLA)

Também por evaporação de solventes, para a obtenção de filmes reforçados, os NCCBs (produzidos conforme a melhor condição experimental de hidrólise) foram incorporados em PLLA de massa molar de 105.300 g/mol (de marca Natural Works), em proporções de 2,5 e 5 %.

A incorporação dos NCCBs foi realizada por meio de dois métodos, a fim de definir o método que promove melhor dispersão na matriz. Ambos os métodos estão ilustrados na Figura 14.

##### **Método I:** utilizando NCCBs desidratados

O PLLA (0,73 g) foi dissolvido em clorofórmio (25 mL), em agitador magnético por 24 h. Ao final deste processo, a solução foi vertida em placa de Petri com tampa, contendo 0,02 g de NCCBs desidratados por liofilização, formando solução 3 % (m/v) e correspondendo a 2,5 % de reforço. Simultaneamente, para o filme reforçado com 5 % de NCCBs, o PLLA (0,71 g) foi dissolvido em clorofórmio (25 mL), em agitador magnético por 24 h. Ao final deste processo, a solução foi vertida em placa de Petri com tampa, contendo 0,04 g de NCCBs desidratados por liofilização, formando solução 3 % (m/v) e correspondendo a 5 % de reforço.

As soluções foram mantidas em capela de exaustão de gases por 48 h, em temperatura ambiente, para a secagem lenta do solvente e formação de filmes.

Após a evaporação do solvente, os filmes foram secos em estufa a vácuo (de marca Nova Ética), a 30 °C, sob pressão de 400 mm de Hg, por 24 h e armazenados em dessecador.

##### **Método II:** utilizando NCCBs funcionalizados

Para este método, uma funcionalização dos NCCBs foi realizada, afim de se buscar uma maior afinidade entre PLLA e NCCBs, já que os nanocristais possuem

grupos hidroxila em sua superfície, que os tornam com elevado grau de polaridade e incompatíveis com matrizes de baixa polaridade, como matriz de PLLA, ou apolares. O segundo motivo que incentivou a funcionalização, foi a esperada minimização do caráter hidrofílico dos NCCBs, o que, conforme Parize (2016), reduz a absorção de umidade.

Soluções contendo 0,02 g e 0,04 g de NCCBs foram preparadas e submetidas a um processo de troca de solventes por imersão, sequencialmente em acetona, etanol e clorofórmio, conforme a metodologia de Rosa (2012). Para este método, foram realizadas três centrifugações a 8000 rpm para auxiliar na troca de solventes:

- Primeira centrifugação: dois tubos falcons contendo respectivamente 0,02 g e 0,04 g de NCCBs em solução de água destilada, após serem retirados da membrana de diálise, foram centrifugados por 10 min;
- Segunda centrifugação: os precipitados resultantes da primeira centrifugação foram imersos em acetona e, após 2 h, centrifugados por mais 10 min;
- Terceira centrifugação: os precipitados resultantes da segunda centrifugação foram imersos em etanol e, após 2 h, centrifugados por mais 10 min.

Os precipitados da terceira centrifugação foram imersos em 5 mL de clorofórmio, em agitador magnético por 24 h. Simultaneamente, duas soluções contendo PLLA com massas de 0,73 g e 0,71 g foram dissolvidas em clorofórmio (20 mL), em agitador magnético por 24 h.

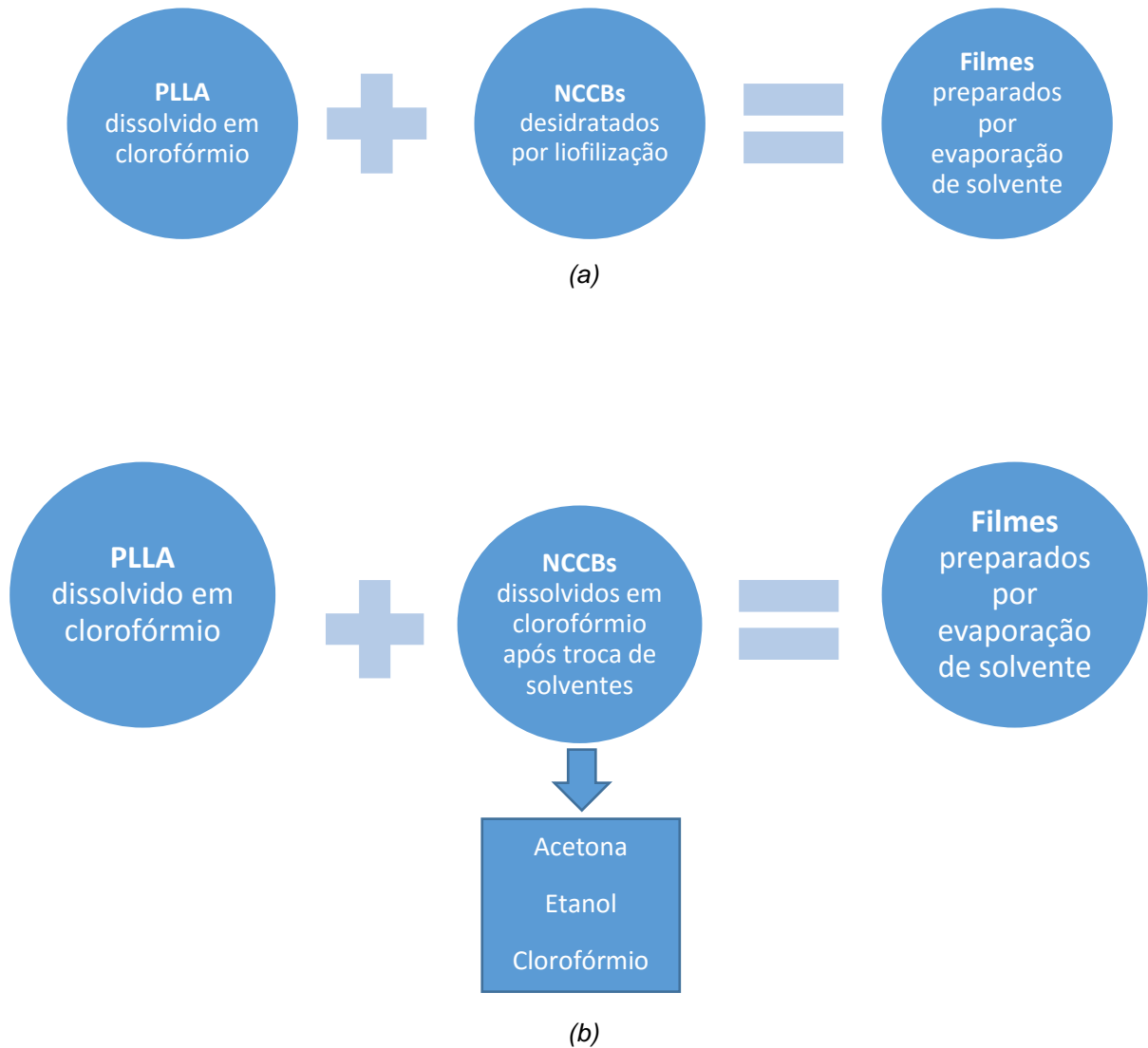
Para a produção do filme contendo 2,5 % de reforço, 0,02 g de NCCBs imersos em 5 mL de clorofórmio foram vertidos em recipiente contendo 0,73 g de PLLA dissolvidos em 20 mL de clorofórmio, originando solução 3 % (m/v). Posteriormente, a mistura foi submetida à sonificação, em banho de ultrassom (de marca Thornton) por 30 min, seguindo a metodologia proposta por Mazur (2012).

Para a produção do filme contendo 5 % de reforço, 0,04 g de NCCBs imersos em 5 mL de clorofórmio foram vertidos em recipiente contendo 0,71 g de PLLA dissolvidos em 20 mL de clorofórmio, originando solução 3 % (m/v). Posteriormente a mistura foi submetida à sonificação, em banho de ultrassom por 30 min.

As soluções foram vertidas em placa de Petri com tampa e mantidas em capela de exaustão de gases por 48 h, em temperatura ambiente, para a secagem lenta do solvente e formação de filmes.

Após a evaporação do solvente, os filmes foram secos em estufa a vácuo (de marca Nova Ética), a 30 °C, sob pressão de 400 mmHg, por 24 h e armazenados em dessecador.

Figura 14. Métodos 1 (NCCBs desidratados) (a) e 2 (NCCBs quimicamente modificados) (b).



A preparação de todos os bionanocompósitos foi feita nos laboratórios de pesquisa da UNIVILLE (Materiais e Biotecnologia 1 e 2).

### 3.5 CARACTERIZAÇÃO DOS BIONANOCOMPÓSITOS

As técnicas de caracterização dos bionanocompósitos foram realizadas com a finalidade de comparar as propriedades entre os polímeros e aplicadas em quatro filmes de PLLA, reforçados com NCCBs, extraídos de acordo com a melhor condição definida, em proporções de 2,5 e 5 %, preparados por dois diferentes métodos (conforme tópico 2.4.2.2). Para melhor caracterização, um filme de PLLA puro (preparado conforme tópico 2.4.2.1), também foi utilizado nas técnicas.

A caracterização foi feita utilizando técnicas de análise termogravimétrica (TGA) e calorimetria exploratória diferencial (DSC), no laboratório de Materiais da Universidade da Região de Joinville – UNIVILLE.

#### 3.5.1 Análise termogravimétrica (TGA)

A análise de TGA foi realizada para a avaliação da estabilidade térmica dos bionanocompósitos de NCCBs em diferentes concentrações, incorporados em PLLA, por dois métodos diferentes.

Esta análise consistiu em uma técnica destrutiva, que envolveu a medida da variação de massa das amostras em estado sólido em função da temperatura, em um determinado intervalo de tempo. O aumento da temperatura provocou diferentes eventos térmicos e, conseqüentemente, a redução de massa das amostras, devido a formação de produtos voláteis.

O equipamento utilizado para a análise foi o TGA-Q50, (de marca TA Instruments), sob atmosfera inerte de N<sub>2</sub>. Cada amostra foi inserida no porta-amostras e aquecida de 25-1000 °C, a uma taxa de aquecimento de 10 °C/min.

Os parâmetros experimentais foram ajustados no *software* TA Universal Analysis e representados graficamente para interpretação.

### 3.5.2 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

A análise de DSC foi realizada para a avaliação da quantidade de calor absorvido e liberado pelos bionanocompósitos durante a ocorrência de eventos térmicos.

Esta análise consistiu na identificação da temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ), de cristalização ( $T_c$ ), de fusão ( $T_m$ ) e grau de cristalinidade ( $X_c$ ). Para o cálculo de grau de cristalinidade ( $X_c$ ), a Equação 1 foi utilizada:

$$X_c = \frac{\Delta H_m}{\Delta H_m^0} \times 100 \% \quad \text{Equação 1}$$

Onde:

$X_c$  = grau de cristalinidade

$\Delta H_m$  = entalpia de fusão experimental (J/g)

$\Delta H_m^0$  = entalpia de fusão supondo polímero 100 % cristalino (J/g) = 93,6 J/g (valor padrão)

Fonte: MAZUR, 2012.

O equipamento utilizado para a análise foi o DSC-Q20 (de marca TA Instruments), sob fluxo de nitrogênio. Um material de referência foi inserido para a comparação. Cada amostra foi colocada no porta-amostras, aquecida de 25-200 °C. A taxa de aquecimento utilizada foi de 10 °C/min.

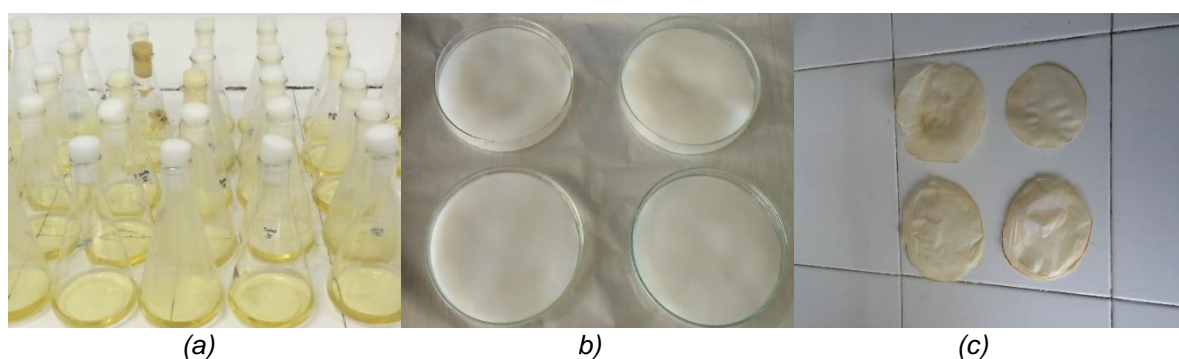
Os parâmetros experimentais foram ajustados no *software* TA Universal Analysis e representados graficamente para interpretação.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 PRODUÇÃO DE CELULOSE BACTERIANA

A Figura 15 ilustra culturas de *Gluconacetobacter hansenii* (a), membranas de CB sintetizadas pela bactéria e purificadas (b) e películas de CB resultantes das membranas secas em estufa (c).

Figura 15. Culturas de *Gluconacetobacter hansenii* (a), membranas de CB sintetizadas pela bactéria e purificadas (b) e películas de CB resultantes das membranas secas (c).



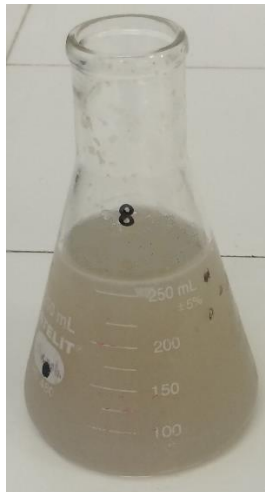
O meio de cultivo da *Gluconacetobacter hansenii* (Figura 15-a) pode ser proveniente de variadas fontes e o tempo de fermentação, conforme observado na literatura, também pode variar. Usualmente, a fermentação é mantida entre 5 a 12 dias (ANTÔNIO, 2012). O meio de cultivo utilizado e o tempo de cultivo influenciam diretamente nas características de espessura, coloração e transparência das membranas de CB (Figura 15-b) (RECOUVREUX, 2008; SANTOS, 2012). O tempo de cultivo utilizado no presente estudo foi de 20 dias, para a observação do crescimento de massa das membranas neste intervalo. Estas membranas se mostraram gelatinosas, porém com estrutura bastante resistente à ruptura. A coloração amarelada das películas após serem secas (Figura 15-c), possivelmente foi ocasionada pela absorção do meio de cultivo, indicando tempo excessivo de cultivo. O procedimento aplicado para a purificação das membranas não foi suficiente para garantir um aspecto mais limpo. Porém, este fator não interfere nas análises de caracterização planejadas.

## 4.2 EXTRAÇÃO DE NANOCRISTAIS DE CELULOSE BACTERIANA EM DIFERENTES CONDIÇÕES E DEFINIÇÃO DE CRITÉRIOS

### 4.2.1 Análise visual das suspensões

A Figura 16 refere-se à suspensão obtida após a interrupção da reação de hidrólise com água destilada gelada (condições mais drásticas - 80 % em massa de concentração de ácido sulfúrico, 60 °C e 60 min).

Figura 16. Suspensão obtida após a interrupção da reação de hidrólise com água destilada gelada.



Após a interrupção da reação de hidrólise com água destilada gelada, obteve-se uma suspensão de cor creme (levemente leitosa), de elevada acidez (Figura 16), na qual não foram observados, a olho nu, fragmentos de CB, indicando perda das características naturais da CB e completa degradação.

Para as condições de hidrólise menos dráticas, os aspectos visuais foram se diferenciando e podem ser melhor compreendidos por meio do Quadro 3, em que são divididos em quatro categorias qualitativas: CB degradada, CB degradada quase totalmente, CB degradada parcialmente e CB não degradada. Para cada categoria qualitativa foi atribuído um indicador numérico.



Quadro 3. Para cada experimento, aspectos observados visualmente em relação à degradação.

Ensaio	[ ] de ácido (%)	T de hidrólise (°C)	t (min)	Aspectos visuais	Indicador numérico
1	50	40	20	CB não degradada	0
2	80	40	20	CB degradada	3
3	50	60	20	CB não degradada	0
4	80	60	20	CB degradada quase totalmente	2
5	50	40	60	CB não degradada	0
6	80	40	60	CB degradada	3
7	50	60	60	CB não degradada	0
8	80	60	60	CB degradada	3
9	65	50	40	CB degradada parcialmente	1
10	65	50	40	CB degradada parcialmente	1
11	65	50	40	CB degradada parcialmente	1

Para os ensaios 1, 3, 5 e 7, a CB permaneceu visualmente inalterada, não degradada, desta forma pode-se sugerir que não tenha sofrido ataque ácido, impossibilitando a formação de nanocristais.

Para os ensaios 9, 10 e 11, a CB degradou parcialmente, sendo que as partículas não indicaram tamanhos em escala nanométrica.

Para o ensaio 4, a CB degradou quase totalmente, porém as partículas também não indicam tamanhos em escala nanométrica.

Para os ensaios 2, 6 e 8, a CB foi visivelmente degradada, indicando potenciais características de hidrólise para a formação de NCCBs.

#### 4.2.2 Análise de rendimento em volume dos NCCBs

O rendimento em volume analisado para cada amostra dos ensaios foi superior para o ensaio 8, referente às condições mais drásticas de hidrólise: 80 % de concentração de ácido sulfúrico (m/m), a 60 °C e 60 min.

#### 4.2.3 Análise termogravimétrica (TGA) dos NCCBs

A Figura 17 mostra as curvas de TGA da CB pura e dos nanocristais (referente aos experimentos) e a Tabela 3 relaciona os dados determinados a partir destas curvas.

O perfil de degradação da CB mostra a ocorrência de três eventos de perda de massa. O primeiro evento térmico está associado a perda de água superficial, que ocorre no intervalo que, conforme LIMA *et al.* (2015) compreende a temperatura ambiente ( $\cong 30\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) até cerca de  $150\text{ }^{\circ}\text{C}$ , com 5,21 % de perda de massa. O segundo evento causa acentuada perda de massa e é atribuído à degradação da celulose, que inclui despolimerização, decomposição das unidades de glicose e desidratação. A temperatura de início de degradação extrapolada ( $T_{\text{onset}2}$ ) igual a  $301,9\text{ }^{\circ}\text{C}$  e a temperatura na qual a taxa de degradação é máxima ( $T_{\text{max}2}$ ) igual a  $337,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ , com perda de massa de 61,97 %, corrobora com valores citados na literatura (LIMA *et al.*, 2015). O terceiro e último evento representa a degradação de resíduos carbonáceos, que se estende até cerca de  $500\text{ }^{\circ}\text{C}$ , com perda de massa de 24,78 %, dados que também confirmam o que a literatura reporta (TEIXEIRA *et al.* 2010). O resíduo carbonáceo final observado foi de 7,37 %.

Os NCCBs possuem cristalinidade superior à cristalinidade da amostra de CB não hidrolisada, utilizada na análise. Quanto maior a cristalinidade da celulose, maior é a temperatura de decomposição térmica, devido ao menor teor de componente amorfo. No entanto, outros fatores também podem exercer influência na estabilidade térmica. Sabe-se que a hidrólise com ácido sulfúrico influencia negativamente na estabilidade térmica dos nanocristais, visto que a temperatura em que se inicia a perda de massa é diminuída. Isto ocorre, pois, os grupos sulfatos exercem efeito catalítico nas reações de desidratação da celulose (TAIPINA, 2012). Estes diferentes fatores que exercem influência na estabilidade térmica dos nanocristais prejudicam a visualização de uma tendência que era esperada a ser observada graficamente.

Os picos mais acentuados, que representam o terceiro evento térmico, observados nas curvas de DTG, correspondem às amostras de NCCBs com forte interação com o ácido sulfúrico, o que favorece a degradação termo-oxidativa do carbono em altas temperaturas (TEIXEIRA *et al.*, 2010).

Figura 17. Curvas de TGA (a) e DTG (b) da CB pura e dos nanocristais (referentes aos experimentos).

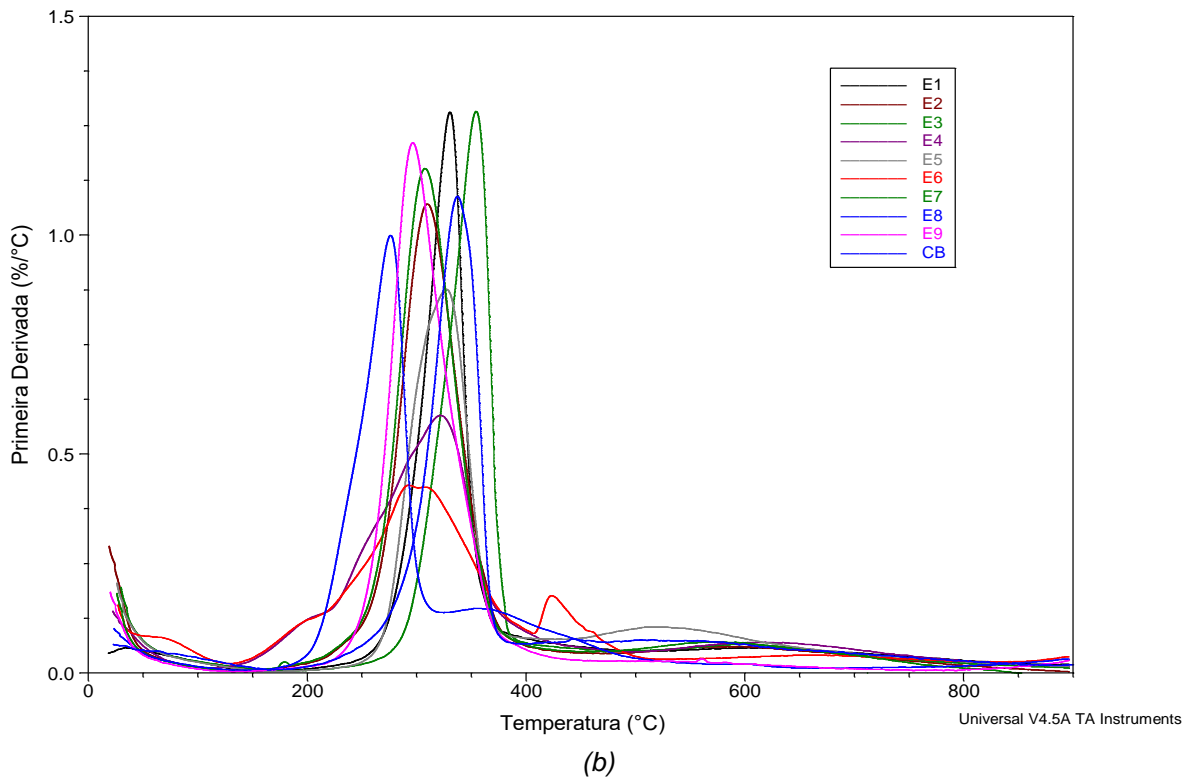
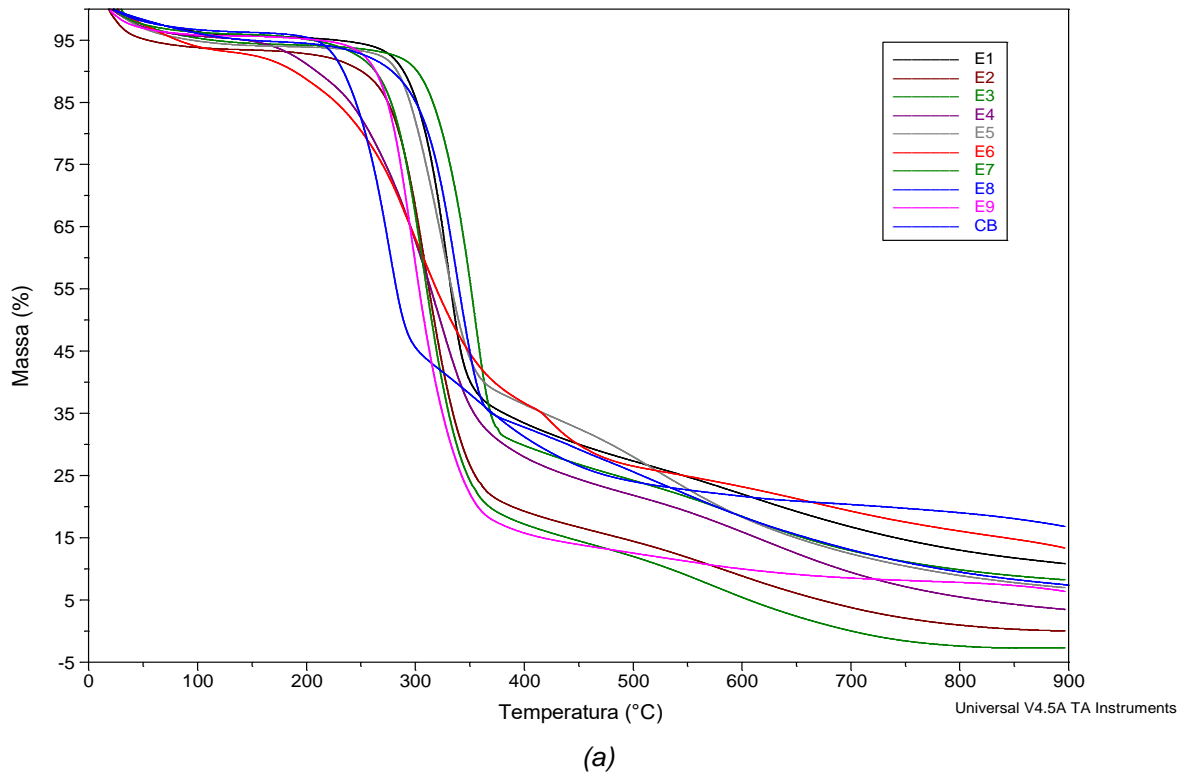


Tabela 3. Dados da análise de TGA da CB pura e dos NCCBs (referentes aos experimentos).

Ensaio	Condições de hidrólise: [ ] de ácido / Temperatura / Tempo	Perda de massa 1 (%)	T <sub>onset2</sub> (°C)	Perda de massa 2 (%)	T <sub>max2</sub> (°C)	T <sub>onset3</sub> (°C)	Perda de massa 3 (%)	T <sub>max3</sub> (°C)	Resíduo (%)
	CB pura	5,21	301,9	61,97	337,5	--	24,78	--	7,37
1	50 % / 40 °C / 20 min	4,33	302,1	69,29	330,3	559,9	15,42	614,5	10,86
2	80 % / 40 °C / 20 min	5,86	277,5	77,57	309,4	477,8	15,80	527,7	0,04
3	50 % / 60 °C / 20 min	5,31	321,2	69,80	354,1	551,4	16,20	607,2	8,27
4	80 % / 60 °C / 20 min	4,44	249,4	73,90	322,8	554,9	18,10	618,4	3,51
5	50 % / 40 °C / 60 min	6,00	289,1	60,10	325,9	477,0	26,88	524,3	7,00
6	80 % / 40 °C / 60 min	6,70	235,2	57,20	299,7	343,5	22,55	416,3	13,48
7	50 % / 60 °C / 60 min	3,75	275,4	82,28	304,9	519,4	16,32	519,4	0,00
8	80 % / 60 °C / 60 min	3,40	239,2	54,52	275,7	343,5	24,93	363,7	16,96
9	65 % / 50 °C / 40 min	3,75	270,7	82,05	295,1	560,0	7,21	560,4	6,40
10	65 % / 50 °C / 40 min	5,05	266,5	70,33	292,3	475,2	18,98	529,1	5,68
11	65 % / 50 °C / 40 min	4,33	265,7	74,69	291,3	482,6	4,6	629,3	16,27

#### 4.2.3.1 Análise estatística

Diante do planejamento proposto, a fim de complementar o estudo termogravimétrico, referente à degradação da celulose, foi realizada uma análise estatística. A partir desta análise estatística foi feita uma análise de variância (ANOVA), com o objetivo de identificar as variáveis independentes significativas para o processo. Foram obtidos resultados significativos para a “ $T_{onset2}$ ”, no entanto, para a “ $T_{max2}$ ” e “perda de massa 2”, os resultados não foram significativos.

A Tabela 4 representa a ANOVA para a “ $T_{onset2}$ ”, contendo um modelo com todas as variáveis independentes e as interações de primeiro nível, utilizando o erro padrão (erro SS). São apresentados valores de soma quadrática, grau de liberdade, média quadrática, F calculado e probabilidade de valores serem significativos (p-valor). Valores de p menores que 0,05 indicam que as variáveis testadas são significativas. Os valores em vermelho, refletem fatores que exercem influência significativa na “ $T_{onset2}$ ”. Sendo assim, verificou-se que das variáveis independentes testadas, quando analisadas individualmente, apenas a temperatura de hidrólise não exerce influência significativa na “ $T_{onset2}$ ”. Entretanto, a concentração de ácido e o tempo de hidrólise exercem influência significativa. Nesta análise, nenhuma interação entre fatores foi significativa na “ $T_{onset2}$ ”, por este motivo foram excluídas do modelo, conforme pode ser observado na Tabela 5.

Tabela 4. ANOVA para a “ $T_{onset2}$ ”, contendo todas as variáveis independentes e as interações de primeiro nível.

Fatores	Somas dos quadrados	Graus de liberdade	Médias dos quadrados	F <sub>calc</sub>	p-valor
(1) [ ] de ácido (%)	4347,781	1	4347,781	28,06910	0,006095
(2) Temperatura (°C)	43,711	1	43,711	0,28220	0,623393
(3) Tempo (min)	1548,461	1	1548,461	9,99680	0,034126
(1), (2)	108,781	1	108,781	0,70229	0,449171
(1), (3)	4,961	1	4,961	0,03203	0,866662
(2), (3)	0,061	1	0,061	0,00040	0,985087
Erro	619,583	4	154,896	-	-
Total SS	6673,340	10	-	-	-

Tabela 5. ANOVA para a “T<sub>onset2</sub>”, sem as interações entre fatores.

Fatores	Somas dos quadrados	Graus de liberdade	Médias dos quadrados	F <sub>calc</sub>	p-valor
(1) [ ] de ácido (%)	4347,781	1	4347,781	41,49855	0,000353
(2) Temperatura (°C)	43,711	1	43,711	0,41721	0,538921
(3) Tempo (min)	1548,461	1	1548,461	14,77970	0,006338
Erro	733,386	7	104,769	-	-
Total SS	6673,340	10	-	-	-

Os resultados dos coeficientes de regressão do modelo estão apresentados na Tabela 6.

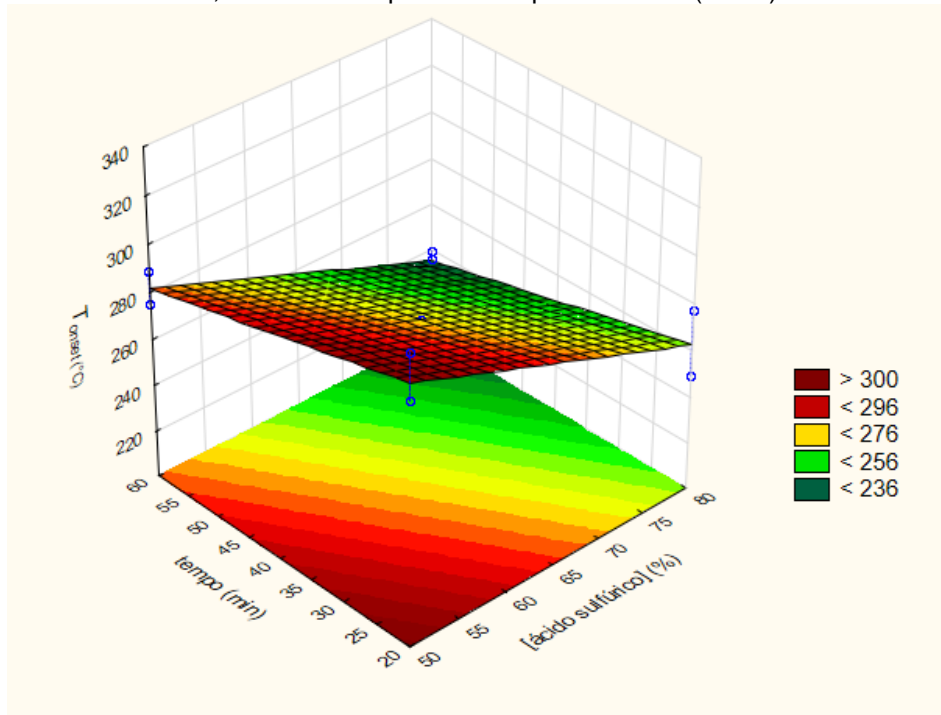
Tabela 6. Coeficientes de regressão para a “T<sub>onset2</sub>”,

Fatores	Coeficientes de regressão	Erro padrão
Média	412,5333	25,20379
(1) [ ] de ácido (%)	-1,5542	0,24126
(2) Temperatura (°C)	-0,2338	0,36189
(3) Tempo (min)	-0,6956	0,18094

Por meio da análise de regressão foi possível determinar o coeficiente de correlação “R<sup>2</sup>”, que foi de = 0,8901, indicando que 89,01 % da variabilidade na resposta pode ser explicado por este modelo.

A Figura 18 exibe o gráfico de superfície de resposta 3D, representando a interação entre “[ ] de ácido” e “tempo de hidrólise ácida” (variáveis independentes significativas) na “T<sub>onset2</sub>” (variável dependente significativa), fixando a temperatura no ponto central (50 °C).

Figura 18. Gráfico de superfície de resposta representando a interação entre “[ $\eta$ ] de ácido” e “tempo de hidrólise ácida” na “Tonset2”, fixando a temperatura no ponto central (50 °C).



De acordo com o modelo apresentado na Figura 18 é possível observar que a elevada interação da CB com o ácido sulfúrico, em relação à concentração e tempo, conduz a valores baixos de “ $T_{\text{onset}2}$ ”, mesmo considerando um grau de cristalinidade aumentado. Esta ocorrência pode ser justificada pelo fato de a hidrólise com ácido sulfúrico influenciar negativamente a estabilidade térmica da CB, como já mencionado.

#### 4.2.4 Análise de espalhamento dinâmico de luz (DLS) dos NCCBs

Para a amostra 8 verificou-se a presença de três populações de tamanho: 388 nm, em 61,7 % da amostra; 96,36 nm, em 20,4 % da amostra; e 1,068  $\mu\text{m}$  em 17,6 % da amostra. Predominantemente a amostra contém partículas em tamanhos nanométricos, que de acordo com a literatura são nanocristais de celulose bacteriana (ALEMDAR; SAIN, 2008).

O potencial zeta superficial obtido foi - 38 mV, indicando suspensão estável, já que se consideram partículas estáveis em suspensão todas as partículas cujo módulo

de carga do potencial zeta seja maior que 25 mV (MIRHOSSEINI *et al.*, 2008). Esta estabilidade está relacionada com a presença de cargas negativas (grupos sulfatos) na superfície dos NCCBs, ocasionando equilíbrio eletrostático decorrente das forças de repulsão entre os nanocristais (LIU; YUAN, 2010).

Para as demais amostras, não foi possível a realização da análise, pois continham partículas grandes e visíveis a olho nu. O equipamento Zetasizer Nano Series trabalha com faixas específicas de tamanho.

Com base nas análises apresentadas, os NCCBs extraídos conforme o experimento 8 foram escolhidos para serem incorporados ao PLLA.

#### 4.3 PREPARAÇÃO DOS BIONANOCOMPÓSITOS

As Figuras 19 e 20 ilustram os materiais preparados: NCCBs extraídos conforme critérios definidos (de acordo com o experimento 8) e liofilizados e os filmes de CB pura, PLLA puro e bionanocompósitos.

Figura 19. Fotografia dos NCCBs liofilizados, extraídos conforme experimento 8.



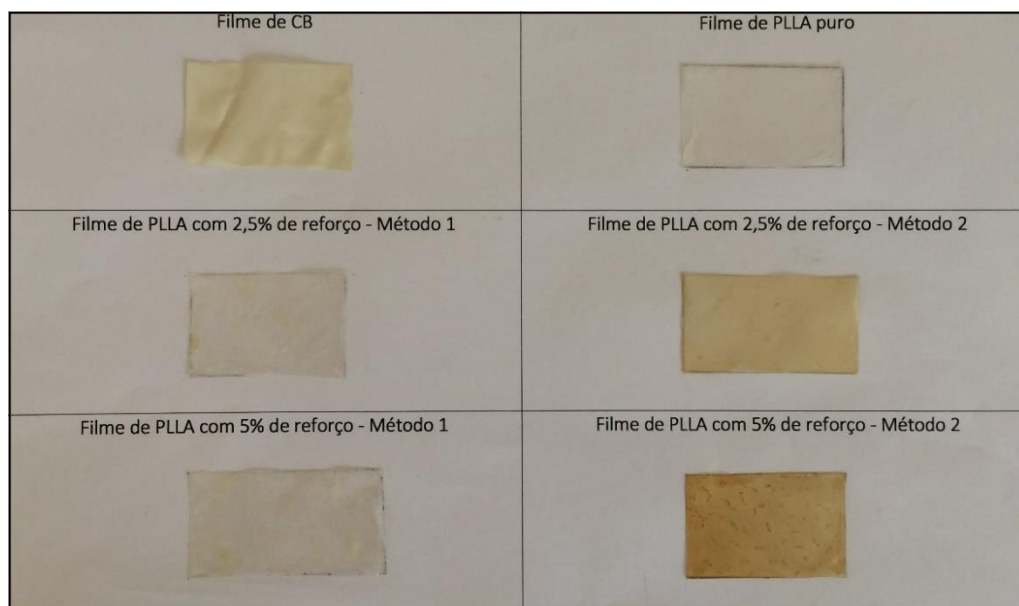
Os NCCBs extraídos por hidrólise ácida, feita com ácido sulfúrico, formam suspensões aquosas estáveis, devido a presença de cargas negativas (grupos sulfatos) na superfície dos NCCBs, ocasionando equilíbrio eletrostático decorrente das forças de repulsão entre os nanocristais. Porém, é válido comentar que esta



característica dificilmente é mantida após a secagem dos mesmos, uma vez que as fortes pontes de hidrogênio existentes favorecem a aglomeração (LIU; YUAN, 2010).

A textura dos NCCBs pode ser comparada com a textura de um aglomerado de pós finos, de coloração creme, que se constituem em fragmentos em forma de agulhas, também designados como *whiskers* de CB e recomendados a serem utilizados como reforços em matrizes poliméricas.

Figura 20. Fotografia dos filmes de CB pura, PLLA puro e bionanocompósitos.



Visualmente, a película de CB apresenta coloração amarelada, é translúcida e de superfície lisa, enquanto filme de PLLA puro é incolor, transparente e de superfície lisa.

Após a adição dos NCCBs, o bionanocompósito de PLLA com 2,5 % de reforço preparado de acordo com o Método 1, apresentou-se rugoso, pode-se observar claramente a presença de duas fases, sendo que os nanocristais se posicionaram somente na superfície inferior dos filmes, indicando que os NCCBs não se dispersaram homogeneamente. Este comportamento é explicado pela falta de interação do PLLA com os NCCBs, já que apresentam polaridades diferentes. A dispersão inadequada do nanoreforço na matriz polimérica, também promoveu formação de aglomerados, que atuam como pontos de concentração de tensão e

podem proporcionar efeito contrário ao desejado, fragilizando o material ao invés de melhorar suas propriedades. Adequada dispersão trata-se de um desafio na formação de bionanocompósitos (JORDAN *et al.*, 2005). Comportamento similar foi observado para o bionanocompósito de PLLA com 5 % de reforço de NCCBs preparado também de acordo com o Método 1.

Após a adição dos NCCBs, o bionanocompósito de PLLA com 2,5 % de reforço de NCCBs preparado de acordo com o Método 2, apresentou-se liso, indicando interação do PLLA-NCCBs, já que para este método foi realizada uma funcionalização dos nanocristais, por meio de troca de solventes, compatibilizando em etapas a polaridade de matriz e reforço. O filme apresentou-se translúcido, com coloração intermediária entre creme (coloração dos NCCBs) e incolor (característica do PLLA puro), contendo algumas partículas aglomeradas. Comportamento similar foi observado para o bionanocompósito de PLLA com 5 % de reforço de NCCBs preparado também de acordo com o Método 2.

Dentre os dois métodos conclui-se que o Método 2 permitiu a visualização de melhores características de adesão entre matriz e reforço.

## 4.4 CARACTERIZAÇÃO DOS BIONANOCOMPÓSITOS

### 4.4.1 Análise termogravimétrica (TGA)

A Figura 21 corresponde às curvas de TGA do PLLA puro e dos bionanocompósitos reforçados com 2,5 e 5 % de NCCBs, preparados de acordo com o Método 1 (NCCBs desidratados) (a) e as curvas de TGA do PLLA puro e dos bionanocompósitos reforçados com 2,5 e 5 % de NCCBs, preparados de acordo com o Método 2 (NCCBs submetidos à troca de solventes por imersão) (b). A Tabela 7 relaciona os dados determinados a partir destas curvas.

O perfil de degradação do PLLA mostra a ocorrência de dois eventos de perda de massa. O primeiro evento térmico é atribuído à perda de água superficial, de aproximadamente 5 %. Este percentual aumenta em função do aumento do teor de NCCBs na amostra chegando 8 % e 8,1 %, com adição 5 % de reforço para os

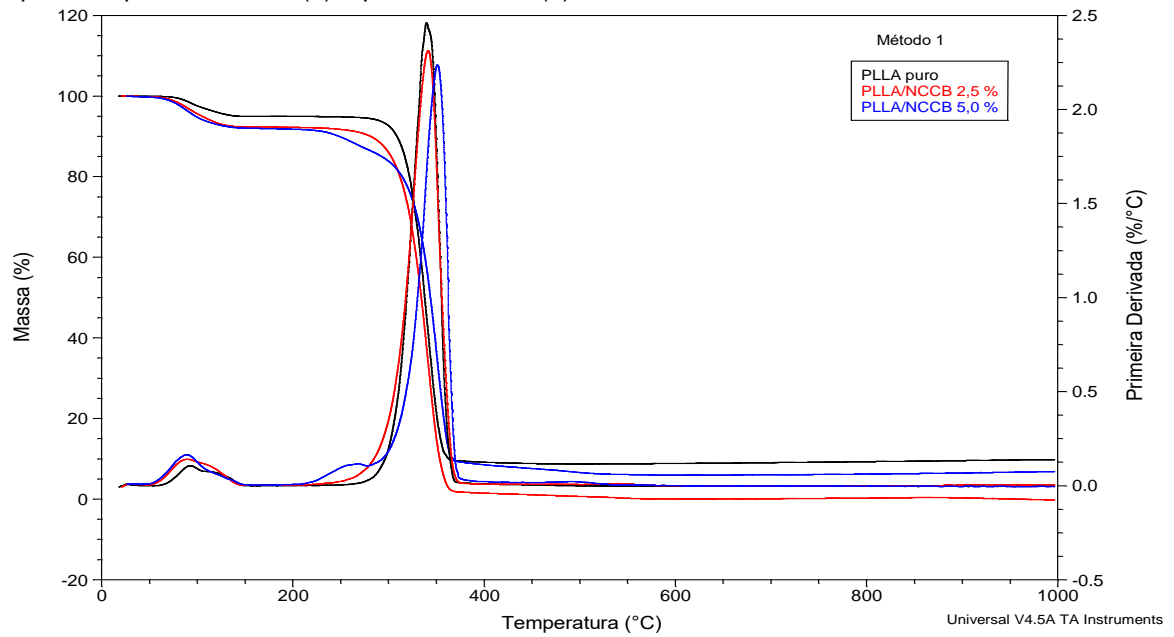
Métodos 1 e 2, respectivamente. Isso se deve ao fato de a celulose bacteriana ser um polímero com alta higroscopicidade.

O segundo evento, que causa acentuada perda de massa, é atribuído à degradação do PLLA e ocorre com temperatura de início de degradação extrapolada ( $T_{\text{onset}2}$ ) em 319,8 °C e temperatura na qual a taxa de degradação é máxima ( $T_{\text{max}2}$ ) em 339,5 °C, com 85,2 % de perda de massa. Os valores da  $T_{\text{onset}}$  e da  $T_{\text{max}}$  estão inferiores aos encontrados na literatura (335 °C e 407 °C respectivamente) (DE SOUZA, 2012). Esta diferença pode ser explicada pela diferença de característica do material utilizado, como por exemplo a massa molar do polímero, que afeta diretamente suas características (FCUP, 2016). Para os bionanocompósitos preparados pelo Método 1, houve uma diminuição de 3,3 °C na  $T_{\text{onset}2}$  para a amostra com adição de 2,5 % de NCCBs e um pequeno aumento de 2,9 °C para a amostra com 5 % de NCCBs. Para os bionanocompósitos preparados pelo Método 2, houve aumento na  $T_{\text{onset}2}$ , conforme o aumento do teor de NCCBs, chegando a um incremento de 10,4 °C para as amostras com 5 % de reforço.

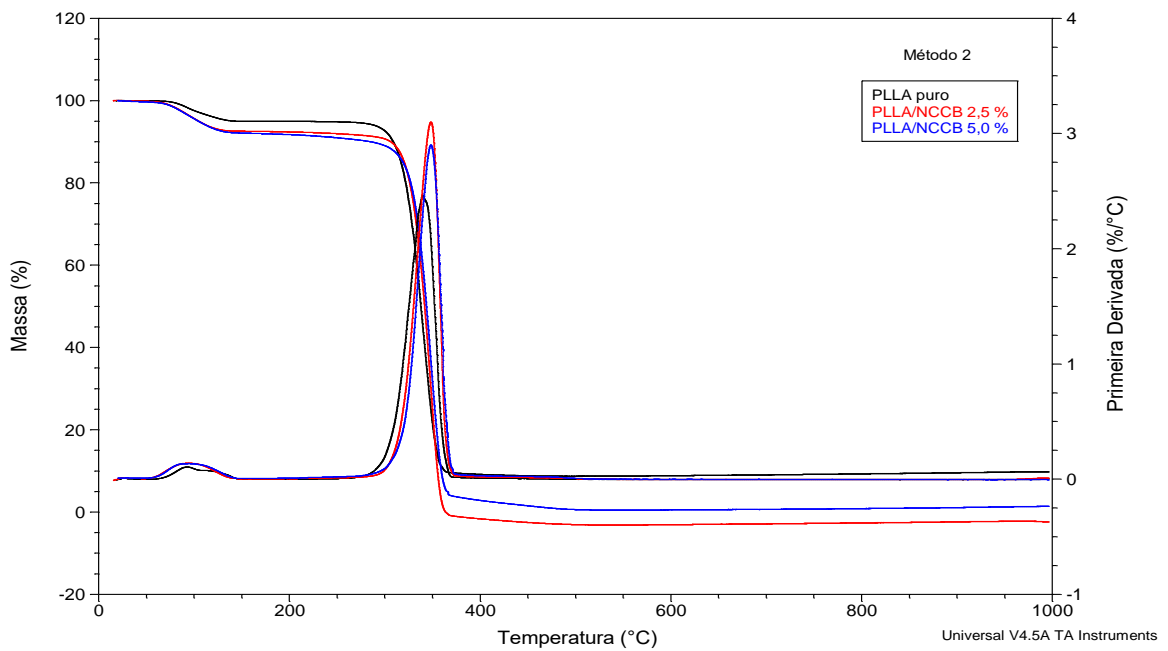
O pequeno pico observado para amostra PLLA/NCCBs 5 % (Método 1), que representa o terceiro estágio de degradação, com  $T_{\text{onset}}$  bastante inferior ao estágio de decomposição do PLLA, corresponde a decomposição dos NCCBs incorporados ao filme (que pode ser estudada no tópico 4.2.3 desta dissertação).

Dentre os dois métodos conclui-se que o Método 2 permitiu uma melhoria da estabilidade térmica do polímero.

Figura 21. Curvas de TG e DTG do PLLA puro e dos bionanocompósitos reforçados com NCCBs, preparados pelo Método 1 (a) e pelo Método 2 (b).



(a)



(b)

Tabela 7. Dados da análise de TGA do PLLA puro e dos bionanocompósitos reforçados com NCCBs, preparados pelos Métodos 1 e 2.

<b>Amostras</b>	<b>Método</b>	<b>Perda de massa 1 (%)</b>	<b>T<sub>onset2</sub> (°C)</b>	<b>Perda de massa 2 (%)</b>	<b>T<sub>max2</sub> (°C)</b>	<b>T<sub>onset3</sub> (°C)</b>	<b>T<sub>max3</sub> (°C)</b>
PLLA puro	---	5,0	319,8	85,2	339,5	---	---
PLLA/NCCBs 2,5 %	M1	7,8	316,5	92,5	341,2	---	----
PLLA/NCCBs 5,0 %	M1	8,0	322,7	85,1	351,0	237,1	276,9
PLLA/NCCBs 2,5 %	M2	7,5	328,6	94,7	348,2	---	---
PLLA/NCCBs 5,0 %	M2	8,1	330,2	90,2	348,1	---	---

#### 4.4.2 Calorimetria explanatória diferencial (DSC)

A Figura 22 corresponde às curvas de DSC do PLLA puro e dos bionanocompósitos reforçados com 2,5 e 5 % de NCCBs, preparados de acordo com o Método 1 (NCCBs desidratados) e dos bionanocompósitos reforçados com 2,5 e 5 % de NCCBs, preparados de acordo com o Método 2 (modificados quimicamente). A Tabela 8 relaciona os dados determinados a partir destas curvas.

Para o PLLA puro observou-se a temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ) em 46,1 °C, a temperatura de cristalização ( $T_c$ ) em 102,1 °C e a presença de duas temperaturas de fusão ( $T_m$ ), sendo a primeira em 137,4 °C e a segunda em 145,3 °C. A presença de dois picos de fusão está relacionado a cristais de tamanho diferentes, sendo que os cristais menores fundem a uma temperatura menor e os cristais maiores fundem a uma temperatura maior. A entalpia de fusão encontrada foi de 37,8 J/g, que corresponde a 40,38 % de cristalinidade. Estes dados concordam com a literatura (PEZZIN, 2012).

Independentemente do método utilizado e do percentual de reforço adicionado, para os bionanocompósitos observou-se uma diminuição da  $T_g$ . A  $T_g$  está relacionada com a movimentação das cadeias poliméricas e neste caso indica que a adição dos NCCBs aumentou a flexibilidade do PLLA. Este aumento de flexibilidade pode ser explicado pelo elevado módulo elástico dos nanocristais de celulose, de aproximadamente 140 GPa (STURCOVÁ; DAVIES; EICHHORN, 2005).

A adição de NCCBs não alterou significativamente a  $T_c$  e  $T_m$ , independentemente do método de preparação dos filmes e do percentual de NCCBs adicionado.

O grau de cristalinidade diminuiu com a adição de NCCBs.

Figura 22. Curvas de DSC do PLLA puro e dos bionanocompósitos reforçados com NCCBs, preparados pelo Método 1 e pelo Método 2.

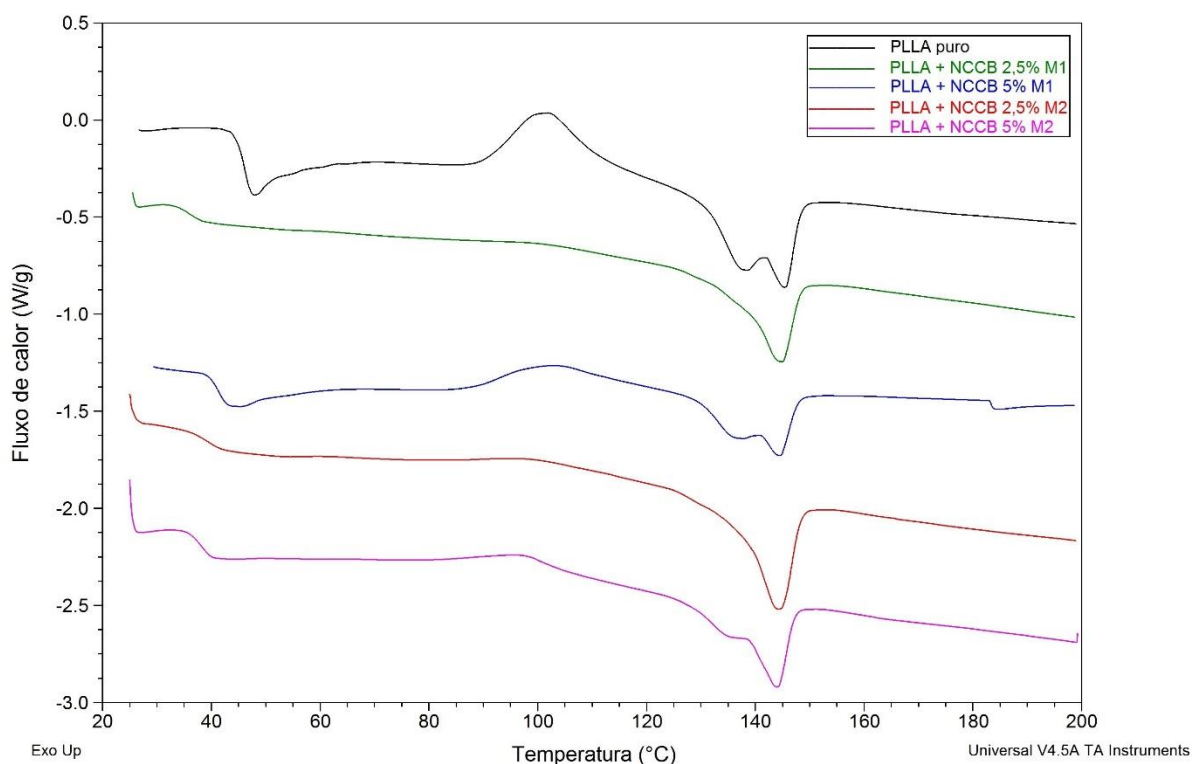


Tabela 8. Dados da análise de TGA do PLLA puro e dos bionanocompósitos reforçados com NCCBs, preparados pelos Métodos 1 e 2.

Amostras	Método	T <sub>g</sub> (°C)	T <sub>c</sub> (°C)	T <sub>m</sub> (°C)	ΔH <sub>m</sub> (J/g)	X <sub>c</sub> (%)
PLLA puro	---	46,1	102,1	137,4; 145,3	37,80	40,38
PLLA/NCCBs 2,5%	M1	35,7	-	144,6	23,90	25,53
PLLA/NCCBs 5%	M1	41,3	102,7	137,1 144,5	22,98	24,55
PLLA/NCCBs 2,5%	M2	38,9	-	144,1	31,46	33,61
PLLA/NCCBs 5%	M2	38,5	97,3	143,9 135,3	23,15	24,73

Onde:

T<sub>g</sub> = temperatura de transição vítrea

T<sub>c</sub> = temperatura de cristalização

T<sub>m</sub> = temperatura de fusão

ΔH<sub>m</sub> = entalpia de fusão

X<sub>c</sub> = grau de cristalinidade

## CONCLUSÕES

Os resultados obtidos mostram que foi possível a obtenção de NCCBs, sob condições específicas de hidrólise ácida. Foi possível também a incorporação destes NCCBs como reforço em matriz de PLLA, um polímero de produção comercial assegurada.

A produção de membranas de CB foi garantida por meio da bactéria *Gluconacetobacter hansenii*, em cultura estática.

Dentre os ensaios planejados, a extração de NCCBs por hidrólise ácida foi eficiente nas condições: 80 % de concentração de ácido sulfúrico (m/m), 60 °C e 60 min.

Quando em suspensão, os NCCBs (extraídos conforme as condições de hidrólise destacadas) apresentaram carga de potencial zeta superficial adequada (-38 mV), indicando estabilidade eletrostática favorável, relacionada à presença de cargas negativas na superfície das partículas, o que causa repulsão entre os NCCBs.

Os bionanocompósitos preparados por meio do Método 2 (após funcionalização dos NCCBs, por troca de solventes) mostraram visivelmente uma melhor afinidade entre matriz e reforço. Este comportamento ocorreu, pois, a troca de solventes provocou uma redução no caráter hidrofílico dos NCCBs e compatibilizou características de polaridade entre matriz e reforço, reforçando a teoria que incentiva a funcionalização da superfície de NCCBs, compreendida como foco principal para promover melhoria de dispersão entre meios hidrofílicos e hidrofóbicos.

Os resultados de TGA indicam que os bionanocompósitos preparados por meio do Método 2 possuem melhor estabilidade térmica quando comparados ao PLLA puro, chegando ao incremento de 10,4 °C na  $T_{onset2}$ , para amostras com 5 % de reforço. Os resultados de TGA também indicam que os bionanocompósitos preparados por meio do Método 2 apresentam melhor estabilidade térmica quando comparados aos bionanocompósitos preparados por meio do Método 1, chegando ao incremento de 7,5 °C na  $T_{onset2}$ , para amostras com 5 % de reforço.

Os resultados de DSC indicam que, independentemente do método utilizado para a preparação dos bionanocompósitos e do percentual de reforço adicionado, observou-se a diminuição da  $T_g$ , ou seja, houve um aumento na flexibilidade do PLLA,



explicado pelo elevado módulo elástico nos NCCBs. O grau de cristalinidade diminuiu com a adição de NCCBs.

Seguindo a estrutura apresentada, conclui-se que a formação de materiais compósitos utilizando o PLLA como matriz é viável no âmbito ambiental. O uso do polímero não contribui para o esgotamento de recursos naturais. Além disto, é um material biodegradável, fator que contribui para a preservação da vida útil de aterros e favorece a drenagem urbana. Nesta discussão, a CB (fonte de NCCBs) também se constitui em um polímero biodegradável e independente da utilização de fontes não renováveis. Esta celulose desprovida de lignina pode ser produzida a partir de resíduos e seu uso também promove qualidade ambiental. No entanto, a aplicabilidade específica de NCCBs deve ser determinada, pois o isolamento de *wiskers* acarreta diminuição no rendimento de produção, ocasionada pela perda de material (aproveita-se somente cerca de 30 % da CB). Ademais, a etapa de hidrólise ácida também gera resíduo líquido.

## SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

É válido comentar que com este trabalho não ocorreu o esgotamento do assunto. Sendo assim, são muitas as possibilidades de trabalhos futuros.

Abaixo algumas sugestões para trabalhos referentes aos NCCBs:

- Avaliar a cristalinidade dos NCCBs obtidos neste trabalho por análise de difração de raio-X (DRX);
- Estudar técnicas de encapsulamento de NCCBs;
- Testar a hidrólise da CB com outros ácidos (Ex: HCl) e misturas de ácidos;
- Testar a hidrólise enzimática, afim de diminuir a toxicidade do efluente gerado após a hidrólise ácida e facilitar o processo de neutralização dos NCCBs;
- Testar outras estratégias de troca de solventes (que não altere a morfologia dos NCCBs), com a finalidade de emprega-los em PLLA;
- Intensificar a dissolução dos NCCBs em PLLA;
- Testar a incorporação de NCCBs em outras matrizes poliméricas biodegradáveis.

Abaixo algumas sugestões para trabalhos referentes aos bionanocompósitos:

- Avaliar o comportamento mecânico dos bionanocompósitos obtidos;
- Avaliar as propriedades de barreira a gases dos bionanocompósitos;
- Avaliar a biodegradação em solo e a compostabilidade;
- Avaliar a degradação em câmara de envelhecimento acelerado;
- Avaliar a degradação em condições de intemperismo natural;
- Preparar *masterbatches* com os materiais estudados neste trabalho e testá-los em processo de fusão;
- Indicar os bionanocompósitos preparados para usos específicos;
- Para a preparação de filmes, buscar solventes menos tóxicos (Ex: dimetilcarbonato). O clorofórmio apesar de ser amplamente utilizado devido ao baixo custo e pela capacidade de solubilizar uma larga gama de polímeros, possui elevada toxicidade e está incluso na lista de compostos orgânicos voláteis (PARIZE, 2016);

- Realizar análises comparativas de Ciclo de Vida (ACV) entre os bionanocompósitos tratados neste estudo e outros termoplásticos aceitos comercialmente, com finalidade de analisar qualidade ambiental dos processos.

## REFERÊNCIAS

ABDOLLAHI, Mehdi *et al.* Reducing water sensitivity of alginate bio-nanocomposite film using cellulose nanoparticles. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 54, n. 1, p.166-173, 2013.

ABICOM. **Polímeros biodegradáveis e compostáveis**. Disponível em: <[http://media.wix.com/ugd/285c7b\\_05e3ee8f0e8046a2a7303a85ce0e7943.pdf](http://media.wix.com/ugd/285c7b_05e3ee8f0e8046a2a7303a85ce0e7943.pdf)>. Acesso em: 11 abr. 2016.

ALEMDAR, Ayse; SAIN, Mohini. Isolation and characterization of nanofibers from agricultural residues: wheat straw and soy hulls. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 6, p. 1664-1671, 2008.

ANGLÈS, M. Neus; DUFRESNE, Alain. Plasticized starch/tunicin whiskers nanocomposites. **Macromolecules**, v. 33, n. 22, p.8344-8353, 2000.

ANTÔNIO, Regina Vasconcellos *et al.* Produção de celulose bacteriana a partir de diferentes substratos. **Revista Técnico Científica (IFSC)**, v. 3, n. 1, p.176-182, 2012.

ARROYO, O. H. *et al.* Processing and properties of PLA/thermoplastic starch/montmorillonite nanocomposites. **Polymer Composites**, v. 31, n. 1, p.114-127, 2010.

**ASTM D-618**: Standard Practice for Conditioning Plastics for Testing, 2008.

**ASTM D-882**: Standard Test Method for Tensile Properties of Thin Plastic Sheeting, 2009.

AVÉROUS, L. Polylactic acid: synthesis, properties and applications. In: BELGACEM, Mohamed N.; GANDINI, Alessandro (Ed.). **Nanomers, polymers and composites from renewable resources**. Oxford: Elsevier, 2008. Cap. 21. p. 433-450.

AZEREDO, H. M. *et al.* Edible films from alginate-acerola puree reinforced with cellulose whiskers. **Food Science and Technology**, v. 46, n. 1, p.294-297, 2012.

\_\_\_\_\_. Nanocellulose reinforced chitosan composite films as affected by nanofiller loading and plasticizer content. **Food, Science and Technology**, v. 75, n. 1, 2010.

BARUD, Hernane da Silva. **Novos materiais multifuncionais baseados em celulose bacteriana**. 2010. 172 f. Tese (Doutorado) - Curso de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2010.

BECK-CANDANEDO, S.; ROMAN, M.; GRAY, D. G. Effect of reaction conditions on the properties and behavior of wood cellulose nanocrystal suspensions. **Biomacromolecules**, v. 6, n. 2, p.1048-1054, 2005.

BERTOLINI, Andréa C. **Starches: characterization, properties and applications**. Boca Raton: CRC Press, 2007.

BILLMEYER JR., Fred W. **Textbook of polymer science**. 3.ed. New York: John Wiley & Sons, 1984.

BLAKER, Jonny J. *et al.* Renewable nanocomposite polymer foams synthesized from pickering emulsion templates. **Green Chemistry**, v. 11, n. 9, p. 1321-1326, 2009.

BORZANI, Walter; DE SOUZA, Silvio J. Mechanism of the film thickness increasing during the bacterial production of cellulose on non-agitated liquid-media. **Biotechnology Letters**, v. 17, n. 11, p. 1271-1272, 1995.

BRASKEM. **Glossário de termos aplicados a polímeros**. 2002. Disponível em: <[http://www.braskem.com.br/Portal/Principal/Arquivos/html/boletm\\_tecnico/Glossario\\_de\\_termos\\_aplicados\\_a\\_polimeros.pdf](http://www.braskem.com.br/Portal/Principal/Arquivos/html/boletm_tecnico/Glossario_de_termos_aplicados_a_polimeros.pdf)>. Acesso em: 11 abr. 2016.

BROWN JR, Malcolm; SAXENA, Inder M.; KUDLICKA, Krystyna. Cellulose biosynthesis in higher plants. **Trends in Plant Science**, v. 1, n. 5, p. 149-156, 1996.

BROWN JR., Malcolm; NOBLES JR., David R. **Cellulose and biofuels research**. Disponível em: <<http://www.botany.utexas.edu/FACSTAFF/FACPAGES/MBROWN/>>. Acesso em: 11 abr. 2016.

BROWN, Adrian J. An acetic ferment which forms cellulose. **Journal of the Chemical Society**, v. 49, p. 432-439, 1886.

CALLISTER JR, William D. **Ciência e engenharia de materiais: uma introdução**. 8. ed. São Paulo: LTC, 2012.

CAMPBELL, Dan; PETHRICK, Richard A.; WHITE, Jim R. **Polymer characterization: physical techniques**. 2. ed. London: Chapman & Hall, 1989.

CAO, X. D. *et al.* Green composites reinforced with hemp nanocrystals in plasticized starch. **Agriculture and Agri-food Canada**, v. 109, n. 6, p.3804-3810, 2008.

CHEN, D. *et al.* Biocomposites reinforced with cellulose nanocrystals derived from potato peel waste. **Carbohydrate Polymers**, v. 90, n. 1, p.709-716, 2012.

CIRIGO Y PÉREZ, Ericka. **Produção de biocompósitos por policondensação de L-ácido láctico em hidrogéis de celulose bacteriana**. 2014. 99 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2014.

CLASEN, C. *et al.* Effects of different drying processes on the material properties of bacterial cellulose membranes. **Macromolecular Symposia**, v. 244, n. 1, p.48-58, 2006.

CZAJA, Wojciech K. *et al.* Microbial cellulose - the natural power to heal wounds. **Biomaterials**, v. 27, n. 2, p. 145-151, 2006.

\_\_\_\_\_. The Future prospects of microbial cellulose in biomedical applications. **Bio Macromolecules**, v. 8, n. 1, p .1-12, 2007.

DAL CASTEL, Charles. **Estudo sobre compatibilizantes em nanocompósitos de polipropileno-montmorilonita**. 2008. 78 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

DE ALMEIDA, Alessandra dos Santos. **Obtenção e caracterização de nanocompósitos de poli(L-lactídeo) e nanopartículas de argila sódica, argilas organofílicas e óxidos de sílica**. 2010. 112 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências, em Ciência e Tecnologia de Polímeros, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

DE MESQUITA, João P. *et al.* Bio-based nanocomposites obtained through covalent linkage between chitosan and cellulose nanocrystals. **Carbohydrate Polymers**, v. 90, n. 1, p.210-217, 2012.

DE PAOLI, Marco-Aurélio. **Degradação e estabilização de polímeros**. 2008. Disponível em: <<http://www.chemkeys.com/blog/wp-content/uploads/2008/09/polimeros.pdf>>. Acesso em: 11 abr. 2016.

DE PAULA, Everton Luiz; MANO, Valdir; PEREIRA, Fabiano. Influence of cellulose nanowhiskers on the hydrolytic degradation behavior of poly(D, L- lactide). **Polymer, Degradation and Stability**, v. 96, n. 9, p.1631-1638, 2011.

DE SOUZA, Drielle Justiniano. **Estudo de biocompósitos de poli(L-ácido láctico) (PLLA) com celulose bacteriana visando aplicações como membranas biomédicas**. 2012. 35 f. TCC (Graduação) - Curso de Engenharia Química, Universidade da Região de Joinville, Joinville, 2012.

DENARI, Gabriela B.; CAVALHEIRO, Éder T. G. Princípios e aplicações de análise térmica. 2012. Disponível em: <[file:///C:/Users/Juliana/Downloads/GabrielaBuenoDenari\\_Revisado\\_Anexo \(2\).pdf](file:///C:/Users/Juliana/Downloads/GabrielaBuenoDenari_Revisado_Anexo%20(2).pdf)>. Acesso em: 11 abr. 2016.

DINGEE, Fabrício. **Fabricação de arcabouços tridimensionais: aplicação futura em regeneração guiada de tecido ósseo**. 2007. 79 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciência e Engenharia de Materiais, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007.

**Dixon's Q-test: detection of a single outlier**. 2016. Disponível em: <[www.chem.uoa.gr/applets/appletqtest/text\\_qtest2.htm](http://www.chem.uoa.gr/applets/appletqtest/text_qtest2.htm)>. Acesso em: 15 jun. 2016.

DOI, Yoshiharu; STEINBÜCHEL, Alexander. **Biopolymers: polyesters III - applications and commercial products**. 4. ed. Weinheim: Wiley-vch, 2002.

DONG, Xue Min; REVOL, Jean-Francois; GRAY, Derek G. Effect of microcrystallite preparation conditions on the formation of colloid crystals of cellulose. **Cellulose**, v. 5, n. 1, p.19-32, 1998.

DONINI, Ígor A. N. *et al.* Biossíntese e recentes avanços na produção de celulose bacteriana. **Eclética Química**, v. 35, n. 4, p.165-178, 2010.

DORGAN, John R. *et al.* Polylactides: properties and prospects of an environmentally benign plastic from renewable resources. **Macromolecular Symposia**, v. 175, n. 1, p. 55-66, 2001.

DUDMAN, W. F. Cellulose production by *Acetobacter* strains in submerged culture. **Journal of General Microbiology**, v. 22, n. 1, p. 25-39, 1960.

DUFRESNE, Alain. Processing of polymer nanocomposites reinforced with polysaccharide nanocrystals. **Molecules**, v. 15, n. 6, p.4111-4128, 2010.

DURÁN, Nelson; MATTOSO, Luiz Henrique C.; DE MORAIS, Paulo Cezar. **Nanotecnologia**. São Paulo: Saraiva, 2006.

ELAZZOUI-HAFRAOUI, S. *et al.* The shape and size distribution of crystalline nanoparticles prepared by acid hydrolysis of native cellulose. **Biomacromolecules**, v. 9, n. 1, p.57-65, 2008.

ERENO, Dinorah. **Celulose na pele**. 2004. Disponível em: <<http://revistapesquisa.fapesp.br/wp-content/uploads/2004/07/070-073-biotecnologia.pdf?6d3365>>. Acesso em: 11 abr. 2016.

FCUP. **Polímeros e materiais poliméricos**. Disponível em: <<http://educa.fc.up.pt/ficheiros/noticias/69/documentos/108/Manual%20Pol%20A1meros%20e%20Materiais%20polimericos%20NV.pdf>>. Acesso em: 11 abr. 2016.

FONTANA, J. D. *et al.* *Acetobacter* cellulose pellicle as a temporary skin substitute. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 24, n. 1, p. 253-264, 1990.

FORTUNATI, E. *et al.* Effects of modified cellulose nanocrystals on the barrier and migration properties of PLA nano-biocomposites. **Carbohydrate Polymers**, v. 90, n. 2, p.948-956, 2012.

GARLOTTA, Donald. A literature review of poly(lactic acid). **Journal of Polymers and the Environment**, v. 9, n. 2, p. 63-84, 2001.

GOFFIN, Anne-lise *et al.* From interfacial ring-opening polymerization to melt processing of cellulose nanowhisker-filled polylactide-based nanocomposites. **Biomacromolecules**, v. 12, n. 7, p.2456-2465, 2011.

HAMBARDZUMYAN, A. *et al.* Structure and optical properties of plant cell wall bio-inspired materials: cellulose-lignin multilayer nanocomposites. **Comptes Rendus Biologies**, v. 334, n. 11, p.839-850, 2011.



HASSAN, Mohammad L. *et al.* Polycaprolactone/modified bagasse whisker nanocomposites with improved moisture-barrier and biodegradability properties. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 125, n. 2, p.10-19, 2012.

HIRAI, Asako; TSUJI, Masaki; HORII, Fumitaka. TEM study of band-like cellulose assemblies produced by *Acetobacter xylinum* at 4 °C. **Cellulose**, v. 9, n. 2, p.105-113, 2002.

HUBBE, Martin A. *et al.* Cellulosic nanocomposites: a review. **Bioresources**, v. 3, n. 3, p. 929-980, 2008.

JAHNO, Vanusca Dalosto. **Síntese e caracterização do poli(L-ácido láctico) para uso como biomaterial**. 2005. 79 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

JONAS, Rainer; FARAH, Luiz F. Production and application of microbial cellulose. **Polymer Degradation and Stability**, v. 59, n. 1, p.101-106, 1998.

JORDAN, Jeffrey *et al.* Experimental trends in polymer nanocomposites—a review. **Materials Science and Engineering**, v. 393, n. 1, p.1-11, 2005.

KÖHNKE, Tobias *et al.* Nanoreinforced xylan–cellulose composite foams by freeze-casting. **Green Chemistry**, v. 14, p.1864-1869, 2012.

LASPRILLA JR, Astrid. *et al.* Poly-lactic acid synthesis for application in biomedical devices — a review. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 1, p. 321-328, 2012.

LEHERMEIER, Hans J.; DORGAN, John R.; WAY, J. Douglas. Gas permeation properties of poly(lactic acid). **Journal of Membrane Science**, v. 190, n. 2, p.243-251, 2001.

LI, Qian; ZHOU, Jinping; ZHANG, Lina. Structure and properties of the nanocomposite films of chitosan reinforced with cellulose whiskers. **Journal of Polymer Science**, v. 47, n. 11, p.1069-1077, 2009.

LIMA, Helder L. *et al.* Celulose bacteriana obtida por diferentes fontes agroindustriais. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE POLÍMEROS, 13., 2015, Natal. **Anais do 13º Congresso Brasileiro de Polímeros**.

LIMA, Lais R. *et al.* Nanocristais de celulose a partir de celulose bacteriana. **Química Nova**, v. 38, n. 9, p. 1140-1147, 2015.

LIN, Ning *et al.* Effect of polysaccharide nanocrystals on structure, properties, and drug release kinetics of alginate-based microspheres. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 85, n. 2, p.270-279, 2011.

LIN, Ning *et al.* Surface acetylation of cellulose nanocrystal and its reinforcing function in poly(lactic acid). **Carbohydrate Polymers**, v. 83, n. 4, p.1834-1842, 2011.

LIU, D. *et al.* Characterisation of solution cast cellulose nanofibre - reinforced poly(lactic acid). **Express Polymer Letters**, v. 4, n. 1, p.26-31, 2010.

LONGO, Elson. **Nanotecnologia**. 2004. Disponível em: <[http://www.sbpcnet.org.br/livro/56ra/banco\\_conf\\_simp/textos/ElsonLongo.htm](http://www.sbpcnet.org.br/livro/56ra/banco_conf_simp/textos/ElsonLongo.htm)>. Acesso em: 11 abr. 2016.

LOPES, Sônia. **Biologia essencial**. São Paulo: Saraiva, 2003.

LUCAS, Elizabete F.; SOARES, Bluma G.; MONTEIRO, Elisabeth. **Caracterização de polímeros: determinação de peso molecular e análise térmica**. Rio de Janeiro: E-papers, 2001.

LUNT, James. Large-scale production, properties and commercial applications of polylactic acid polymers. **Polymer Degradation and Stability**, v. 59, n. 1, p. 145-152, 1998.

MALVERN - **Products**. Disponível em: <<http://www.malvern.com/en/products/default.aspx>>. Acesso em: 11 abr. 2016.

MAZUR, Luciana Prazeres. **Preparação e caracterização de nanocompósitos de poli (L-ácido láctico) e diferentes argilas organofílicas**. 2012. 117 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia de Processos, Universidade da Região de Joinville, Joinville, 2012.

MELLO, Luis R. *et al.* Duraplasty with biosynthetic cellulose: an experimental study. **Journal of Neurosurgery**, v. 86, n. 1, p. 143-150, 1997.

\_\_\_\_\_. Uso da celulose liofilizada em lesões de nervos periféricos com perda de substância. **Arquivos Neuropsiquiatria**, v. 59, n. 2-B, p. 372-379, 2001.

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

MOTTA, Adriana C.; DUEK, Eliana A. R. Síntese, caracterização e degradação "in vitro" do poli(L-ácido láctico). **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 16, n. 1, p. 26-32, 2005.

NEGRÃO, S. W. *et al.* A eficácia do stent recoberto com celulose bio sintética comparado ao stent convencional em angioplastia em coelhos. **Revista Brasileira de Cardiologia Invasiva**, v. 14, n. 1, p. 10-19, 2006.

NOISHIKI, Yasutomo *et al.* Mechanical properties of silk fibroin–microcrystalline cellulose composite films. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 86, n. 13, p.3425-3429, 2002.

OLHAR NANO. **Técnicas de medida do tamanho de nanopartículas**. 2016. Disponível em: <<http://www.olharnano.com/artigos/4001/72001/Técnicas-de-medida-do-tamanho-de-nanopartículas->>. Acesso em: 11 abr. 2016.

OLIVEIRA, Vanessa A.; RAMBO, Carlos Renato; PORTO, Luismar M. Produção e degradação in vitro de estruturas tubulares de celulose bacteriana. **Polímeros - Ciência e Tecnologia**, v. 23, n. 4, p.559-564, 2013.

PARIZE, Delne Domingos da Silva. **Estudo de filmes de poli(ácido láctico) obtidos por fiação por sopro em solução reforçados com nanocristais de celulose**. 2016. Tese (Doutorado) - Curso de Ciência e Engenharia de Materiais, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2016.

PATRÍCIO, Patrícia S. de O. *et al.* Increasing the elongation at break of polyhydroxybutyrate biopolymer: Effect of cellulose nanowhiskers on mechanical and thermal properties. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 127, n. 5, p.3613-3621, 2013.

PEREIRA, Fabiano V. *et al.* Bionanocompósitos preparados por incorporação de nanocristais de celulose em polímeros biodegradáveis por meio de evaporação de

solvente, automontagem ou eletrofição. **Química Nova**, v. 37, n. 7, p. 1209-1219, 2014.

PETERSSON, L.; KVIEN, I.; OKSMAN, K. Structure and thermal properties of poly(lactic acid)/cellulose whiskers nanocomposite materials. **Composites Science and Technology**, v. 11, n. 67, p.2535-2544, 2007.

PEZZIN, Ana Paula Testa. **Obtenção e caracterização de blendas de poli(p-dionanona)/poli(L-acido lactico) (PPD/PLLA) para aplicação como prótese de menisco bioreabsorvível**. 2001. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia Mecânica, Universidade de Campinas, Campinas, 2001.

RAVEN, Peter H. *et al.* **Biologia vegetal**. 8. ed. São Paulo: Saraiva, 2014.

RECOUVREUX, Derce de Oliveira Souza. **Desenvolvimento de novos biomateriais baseados em celulose bacteriana para aplicações biomédicas e de engenharia de tecidos**. 2008. 124 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.

REDE SPM. **Nanotecnologia**. 2015. Disponível em: <<http://www.redespm.org.br/>>. Acesso em: 11 abr. 2016.

RESENDE, Nathane Silva. **Elaboração de bionanocompósito quitosana/nanofibra de celulose e seu efeito sobre a qualidade de morangos**. 2015. 98 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2015.

ROITMAN, Tamar; ALMEIDA, Luiz F. M.; BORSCHIVER, Suzana. Monitoramento tecnológico e mercadológico de biopolímeros. **Polímeros - Ciência e Tecnologia**, v. 18, n. 3, p. 256-261, 2008.

ROSA, Simone Maria Leal. **Isolamento de nanocristais de celulose de resíduos agrícolas e emprego em nanocompósitos de polipropileno**. 2012. 97 f. Tese (Doutorado) - Curso de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.

ROSS, P; MAYER, R; BENZIMAN, M. Cellulose biosynthesis and function in bacteria. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 55, n. 1, p. 35-58, 1991.

ROTHON, Roger N.; DEARMITT, Chris. **Particulate-filled polymer composites**. 2002. Disponível em: <<http://phantomplastics.com/wp-content/uploads/2013/08/Particulate-Filled-Polymer-Composites-2nd-Edition-Chapter-10-Composites-Using-Nano-Fillers.pdf>>. Acesso em: 11 abr. 2016.

SAMEERRAHATEKAR. **Celulose**. 2008. Disponível em: <<http://www.sameerrahatekar.org/>>. Acesso em: 11 abr. 2016.

SAMIR, Ahmed S. A.; ALLOIN, Fannie; DUFRESNE, Alain. Review of recent research into cellulosic whiskers, their properties and their application in nanocomposite field. **Biomacromolecules**, v. 6, n. 2, p. 612-626, 2005.

SANCHEZ, Fernanda. **Avaliação do processo de reparação tecidual em úlceras crônicas utilizando curativos de celulose bacteriana associados ou não à laserterapia**. 2012. 84 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação Interunidades Bioengenharia EESC/FMRP/IQSC, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012.

SANTOS, Molíria Vieira dos. **Nanocompósitos baseados em celulose bacteriana para aplicações ópticas**. 2012. 89 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2012.

SAVADEKAR, N. R. *et al.* Preparation of nano cellulose fibers and its application in kappa-carrageenan based film. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 51, n. 5, p.1008-1013, 2012.

SAVADEKAR, N. R.; MHASKE, S. Synthesis of nano cellulose fibers and effect on thermoplastics starch based films. **Carbohydrate Polymers**, v. 89, n. 1, p.146-151, 2012.

SHI, Q. F. *et al.* Mechanical properties and in vitro degradation of electrospun bio-nanocomposite mats from PLA and cellulose nanocrystals. **Carbohydrate Polymers**, v. 90, n. 1, p.301-308, 2012.

SILVA, Deusanilde de Jesus; D'ALMEIDA, Maria Luiza O. Nanocristais de celulose. **O Papel**, v. 70, n. 7, p. 34-52, 2009.

SILVA, Jania B. A. da; PEREIRA, Fabiano V.; DRUZIAN, Janice I. Cassava starch-based films plasticized with sucrose and inverted sugar and reinforced with cellulose nanocrystals. **Journal of Food Science**, v. 77, n. 6, p.14-19, 2012.

SIMÕES, Marcelo Simoni. **Desenvolvimento e estudo in vitro de implante biorreabsorvível em poli (L-lactídeo) (PLLA) para artrodese de coluna lombar**. 2007. 124 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia e Tecnologia de Materiais, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

STURCOVÁ, A.; DAVIES, G. R.; EICHHORN, S. J.. Elastic modulus and stress-transfer properties of tunicate cellulose whiskers. **Biomacromolecules**, v. 6, n. 2, p.1055-1061, 2005.

SVENSSON, A. *et al.* Bacterial cellulose as a potential scaffold for tissue engineering of cartilage. **Biomaterials**, v. 26, n. 4, p. 419-431, 2005.

TA INSTRUMENTS - Products. Disponível em: <<http://www.tainstruments.com/products/>>. Acesso em: 11 abr. 2016.

TAIPINA, Márcia de Oliveira. **Nanocristais de celulose: obtenção, caracterização e modificação de superfícies**. 2012. 89 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Química, Universidade de Campinas, Campinas, 2012.

TEIXEIRA, Eliangela de M. *et al.* Nanofibras de algodão obtidas sob diferentes condições de hidrólise ácida. **Polímeros**, v. 20, n. 4, p.264-268, 2010.

TEN, Elena *et al.* Thermal and mechanical properties of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)/cellulose nanowhiskers composites. **Polymer**, v. 51, n. 12, p.2652-2660, 2010.

UREÑA-BENAVIDES, Esteban E.; BROWN, Philip J.; KITCHENS, Christopher L. Effect of jet stretch and particle load on cellulose nanocrystal-alginate nanocomposite fibers. **Langmuir**, v. 26, n. 17, p.14263-14270, 2010.

USBERCO, João; SALVADOR, Edgard. **Química essencial**. 9. ed. São Paulo: Saraiva, 2013.

WAN, Emerson; GALEMBECK, Eduardo; GALEMBECK, Fernando. **Polímeros sintéticos**. 2001. Disponível em: <<http://qnesc.sbq.org.br/online/cadernos/02/polimer.pdf>>. Acesso em: 11 abr. 2016.

WANG, Y.; CAO, X.; ZHANG, L. Effects of cellulose whiskers on properties of soy protein thermoplastics. **Macromolecular Bioscience**, v. 6, n. 7, p.524-531, 2006.

WATANABE, Kunihiko. *et al.* Structural features and properties of bacterial cellulose produced in agitated culture cellulose. **Cellulose**, v. 5, n. 3, p. 187-200, 1998.

YAMADAA, Yuzo; HOSHINO, Ken-ichiro; ISHIKAWA, Tetsuya. The phylogeny of acetic acid bacteria based on the partial sequences of 16 ribosomal RNA: the elevation of the subgenus *Gluconoacetobacter* to the generic level. *Bioscience*, **Biotechnology and Biochemistry**, v. 61, n. 8, p. 1244-1251, 1997.

YU, Hou-yong; QIN, Zong-yi; ZHOU, Zhe. Cellulose nanocrystals as green fillers to improve crystallization and hydrophilic property of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate). **Progress in Natural Science: Materials International**, v. 21, n. 6, p.478-484, 2011.