



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

GINA ALEJANDRA GIL GIRALDO

**FUNCIONALIZAÇÃO DE NANOCELULOSE DE
CELULOSE BACTERIANA COM COLÁGENO
HIDROLISADO**

Londrina
2016

GINA ALEJANDRA GIL GIRALDO

**FUNCIONALIZAÇÃO DE NANOCELULOSE DE
CELULOSE BACTERIANA COM COLÁGENO
HIDROLISADO**

Dissertação submetida à Universidade Estadual de Londrina como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Cesar Augusto Tischer

Co-orientador: Prof. Dr. Renato Ribeiro-Viana

Londrina
2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Giraldo, Gina Alejandra Gil .

Funcionalização de nanocelulose de celulose bacteriana com colágeno hidrolisado / Gina Alejandra Gil Giraldo. - Londrina, 2016.
100 f. : il.

Orientador: Cesar Augusto Tischer.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2016.
Inclui bibliografia.

1. Nanotecnologia - Tese. 2. Glicoconjugados - Tese. 3. Funcionalização - Tese. 4. QCM - Tese. I. Tischer, Cesar Augusto . II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. III. Título.

GINA ALEJANDRA GIL GIRALDO

**FUNCIONALIZAÇÃO DE NANOCELULOSE DE CELULOSE
BACTERIANA COM COLÁGENO HIDROLISADO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, em nível de mestrado, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial necessário à obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Cesar Augusto Tischer
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof^a. Dr^a. Suzana Mali de Oliveira
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof^a. Dr^a. Gizilene Maria de Carvalho
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 12 de setembro de 2016.

Dedico este trabalho, com todo amor, às
pessoas que sempre acreditaram em mim
e em especial a Deus, meu esposo e meu
filho, pelo apoio e dedicação
incondicional

AGRADECIMENTOS

Há muitas pessoas a quem deveria expressar os meus sinceros agradecimentos, mesmo não citando o nome de cada uma delas, deixo aqui registrado, agradecimentos, aos funcionários do bloco de biotecnologia, e professores que de alguma forma contribuíram para a concretização deste projeto.

Ao professor Dr. Cesar Augusto Tischer, orientador da minha dissertação, gostaria de expressar a gratidão por seus ensinamentos, pela confiança e pela amizade desde o primeiro ao último momento deste trabalho.

Ao Dr. Renato Ribeiro-Viana, meu co-orientadora, agradeço o apoio incondicional, a disponibilidade, os conselhos que me ajudaram durante esta jornada e sua amizade.

À Paula C S. Faria Tischer, agradeço pela amizade, pelo apoio e a compreensão durante todo este tempo.

Aos professores Josiane Vignoli, Maria Ines Rezende e o Domit Camillos Neto, obrigada pelo amor, compreensão e valiosas amizade.

À secretária do Departamento de Bioquímica e Biotecnologia Elda Jonas Aguiar, pela amizade, os momentos de descontração, a ajuda e a eficiência no atendimento.

Ào Técnico do laboratório, Nelson Janeiro Rodriguez pela ajuda e colaboração no desenvolvimento do trabalho.

Aos funcionários que contribuíram para manutenção dos laboratórios o Sergio do Nascimento Evangelista, o Edivaldo Santos da Silva e a Sandra Defende, que sempre disponibilizam um ótimo ambiente de trabalho.

A todos meus colegas de mestrado obrigado pela boa camaradagem e apoio demonstrados, em particular as colegas Monica Alzate, Francielle Vidotto, Sabrina Alves de Oliveira, Mayara Barbosa e Fernanda de Oliveira pela força que me deram

em todos os momentos, pelas palavras de apoio quando eu mais precisava, pela companhia nas aulas e nos laboratórios e principalmente pela amizade dedicada.

À Fundação ARAUCARIA pela bolsa de mestrado, muito obrigada.

Por fim, agradeço a Deus por ter me guiado até aqui, ao meu esposo (Miguel Navarro), amado filho (Emanuel Navarro), aos meus pais (Alberto e Amparo), às minhas irmãs (Liliana e Erica) pelo carinho, apoio e compreensão. Vocês são as pessoas mais importantes na minha vida, pois acompanharam junto comigo todos os momentos, tristes, difíceis, alegres e compensadores, durante estes dois anos e meio. A vocês todo o meu amor e gratidão para sempre.

“Se eu ví mais é por estar sentada
sobre os ombros de gigantes”
(Isaac Newton)

GIRALDO, Gina Alejandra Gil. **Funcionalização com colágeno hidrolisado de nanocelulose de celulose bacteriana**. 2016. 100 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2016.

RESUMO

A nanocelulose vêm se destacando devido a suas propriedades físico-químicas únicas, elevada pureza, alto índice de cristalinidade, biodegradabilidade e benefícios ambientais causados pelo seu uso, hoje é profundamente estudada com intuito de desvendar suas potencialidades. Processos como funcionalização de superfícies utilizando polímeros têm despertado grande atenção, devido a sua vasta gama de aplicações tecnológicas, além disso, sua versatilidade pode ser muito incrementada pela otimização de suas propriedades através deste processo. Diante disso, a nanocelulose foi produzida e funcionalizada com colágeno hidrolisado (NCW-Co) a partir de celulose bacteriana. Para obtenção de fibras de celulose em nanoescala, o método utilizado foi hidrólise com ácido sulfúrico (H_2SO_4), já que as regiões amorfas das fibras celulósicas são solúveis em ácidos, enquanto que as regiões cristalinas não. A nanocelulose produzida (NCW) passou por reações de succinilação (NCW-sc), seguida de funcionalização (NCW-co). A través da técnica de FT-IR foi possível evidenciar a funcionalização da nanocelulose. Outras técnicas também foram utilizadas para caracterização como microscopia óptica de luz polarizada (MOLP), microscopia de força atômica (MFA) e análise termogravimétrica (ATG/DTG). Foi escolhida outra técnica, a microbalança de cristal de quartzo (QCM), na identificação da funcionalização, com esta técnica é possível relacionar a variação de frequência na oscilação no cristal de quartzo e a variação de massa na superfície do mesmo, permitindo acompanhar continuamente a quantidade de massa depositada sobre o cristal de quartzo. Quando estabelecidos os parâmetros de padronização da técnica, foi possível comprovar a funcionalização em tempo real. O QCM é, provavelmente, a técnica mais utilizada na avaliação in-situ do processo de construção de filmes. As alterações realizadas na estrutura da nanocelulose no processo de funcionalização, proporcionando novas e melhores características a serem aplicadas pela indústria.

Palavras-chave: Succinilação. Funcionalização. Colágeno. Microbalança.

GIRALDO, Gina Alejandra Gil. **Functionalization with collagen hydrolyzate of nanocelulose bacterial**. 2016. 100 p. Dissertation (MSc in Biotechnology) – State University of Londrina, Londrina, 2016.

ABSTRACT

The nanocelulose have stood out due to their unique physicochemical properties, high purity, high degree of crystallinity, biodegradability and environmental benefits arising from its use today is deeply studied in order to unlock its potential. Processes such as functionalization of surfaces using polymers have attracted great attention, due to its wide range of possible technological applications, in addition, its versatility can be much enhanced by optimization its properties through this process. Therefore, the nanocelulose was produced and functionalized with collagen hydrolyzate (NCW-Co) from bacterial cellulose. To obtain cellulose fibers at the nanoscale, the method used was hydrolysis with sulfuric acid (H₂SO₄) as amorphous regions of the cellulose fibers are soluble in acid, while the crystalline regions does not. The produced nanocelulose (NCW) passed by reactions succinylation (NCW-sc), followed by functionalization (NCW-co). Through FT-IR technique it was possible to demonstrate the functionalization of nanocelulose. Other techniques were also used to characterize as Polarized Light Microscopy Optics (PLMO), Atomic Force Microscopy (AFM) and thermogravimetry (TGA / DTG). It was chosen another technique, quartz crystal microbalance (QCM), for the identification of functionalization, with this technique it is possible to relate the frequency change in oscillation of the quartz crystal and the mass variation on the surface of it, allowing continuously monitor the amount mass deposited on the quartz crystal. When established the technical standardization of parameters, it was possible to prove the functionalization in real time. The QCM is probably the most used technique in-situ evaluation film-building process. Changes made in nanocelulose structure in functionalization process optimize their properties by providing new and better features to be applied by the industry.

Keywords: Succinylation. Functionalization. Collagen. Microbalance.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática da estrutura da celulose, regiões cristalinas conectadas com regiões amorfas.....	23
Figura 2 - Estrutura molecular da celulose	24
Figura 3 - Diagrama do polimorfismo da celulose	27
Figura 4 - Representação da estrutura de celulose do tipo $I\alpha$ e $I\beta$	28
Figura 5 - Esquema da via metabólica de <i>G. xylinus</i>	29
Figura 6 - Ataque ácido nas regiões cristalinas e regiões amorfas	33
Figura 7 - Obtenção de nanocelulose por hidrólise ácida.....	33
Figura 8 - Descrição do equipamento de QCM	39
Figura 9 - Fluxograma esquemático da padronização da técnica do QCM	55
Figura 10 - Filme de celulose bacteriana produzida em meio glucose 4% estático.....	56
Figura 11 - Micrografias de contraste de altura por MFA das fibras de celulose produzidas por <i>G. xylinus</i> em meio glucose em fermentação estática.....	59
Figura 12 - Microscopia eletrônica de varredura da celulose bacteriana produzida por <i>G. xylinus</i> em meio glucose estático	60
Figura 13 - Espectro de RMN de ^{13}C da celulose bacteriana	62
Figura 14 - Espectro vibracional infravermelho de membrana de celulose	63
Figura 15 - Espectro de difração de raios-x da celulose bacteriana produzida no meio glucose 4 % pelo método estático	65
Figura 16 - Nanocristais de celulose produzido após 45 minutos de hidrólise ácida	66
Figura 17 - Reação de succinilação do NCW	67
Figura 18 - Funcionalização do NCW-sc.....	67
Figura 19 - Espectros vibracionais infravermelho dos nanocristais de celulose	69
Figura 20 - Micrografias ópticas dos nanocristais de celulose	70
Figura 21 - Micrografias de contraste por microscopia de força atômica dos nanocristais de celulose	71
Figura 22 - Curvas termogravimétricas dos nanocristais de celulose.....	72

Figura 23 - Resposta de resistência para o aumento da concentração de glicerol eluído na calha no QCM para a calibração da técnica.....	74
Figura 24 - Mudança de Frequência (Hz) e Desvio Resistência (Ohms) em relação a percentagem de peso de glicerol (em água), como previsto na teoria e a medida com QCM200 e 5 MHz em cristal polido.....	75
Figura 25 - Aumento da massa por área (ug/cm ²) após a deposição sequencial de nanocristais de celulose	76
Figura 26 - Cruzamento de dados gráficos obtidos a partir de procedimento experimental que foi observado na Figura 25. Observa-se a real massa depositados através do valor por centímetro quadrado	76
Figura 27 - Estabilidade da nanocristal de celulose reconstituída com 50 ug de película.....	77
Figura 28 - Estabilidade de nanocristais de celulose com massa limite para sensibilidade	78
Figura 29 - Monitoramento em tempo real da funcionalização da nanocristal de celulose (NCW-co).....	80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Diferentes aplicações do QCM no monitoramento de material biológico	41
Tabela 2 -	Bandas características na análise de FT-IR.....	63
Tabela 3 -	Bandas características para celulose bacteriana na análise de FT-IR.....	64

LISTA DE ABREVIATURAS

ALP	Fosfatase alcalina
BSA	Albumina Bovina
CB	Celulose Bacteriana
C-DI-GMP	Nucleotideo Cíclico Diguanilmonofosfato
CES-A	Celulose Sintetase
DRX	Difratometria Raios-X
EDC	N-(3-Dimetillainopropil)-N-Etilcarbonamida hidro-clorida
FT-IR	Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier
IC	Índice de Cristalinidade
MAF	Microscopia de Força Atômica
MCB	Membrana de Celulose Bacteriana
MET	Microscopia Eletronica de Transmissão
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MOLP	Microscopia Óptica de Luz Polarizada
NCW	Nanocelulose Whisker
NCW-co	Nanocelulose Whisker Colágeno
NCW-sc	Nanocelulose Whisker Succinilado
NHS	N-Hidroxisuccinamida
PHB	Polihidroxibutirato
PLA	Ácido Poli-Láctico
QCM	Microbança de Quartzo de Ouro
RMN	Resonancia Margetica Nuclear
UDPG	Uridina Difosfato Glucose
UDPG-F	Uridina Difosfato Glucose Fosforilase
UTP	Uridina Trifosfato

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	OBJETIVOS	21
2.1	OBJETIVO GERAL.....	21
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
3	REVISÃO DA LITERATURA	22
3.1	CELULOSE BACTERIANA(CB).....	22
3.1.1	Estrutura Química e Aplicações da Celulose Bacteriana	23
3.1.2	Biossínteses da Celulose Bacteriana	26
3.1.3	Processo Fermentativo da Produção de Celulose Bacteriana	30
3.1.3.1	Fermentação estática.....	30
3.2	NANOCELULOSE	31
3.2.1	Aplicações da Nanocelulose	34
3.3	FUNCIONALIZAÇÃO DE BIOPOLÍMEROS	37
3.4	MICROBALANÇA DE CRISTAL DE QUARTZO (QCM – QUARTZ CRYSTAL MICROBALANCE).....	38
3.4.1	Aplicações do QCM.....	41
4	MATERIAIS E MÉTODOS	44
4.1	PRODUÇÃO DE CELULOSE	44
4.1.1	Material	44
4.1.1.1	Microorganismo.....	44
4.1.1.2	Manutenção dos microrganismos.....	44
4.1.1.3	Meios de cultura	44
4.1.1.4	Equipamentos	45
4.1.2	Métodos	46
4.1.2.1	Métodos químicos	46
4.1.2.1.1	<i>Tratamento da celulose</i>	46
4.1.2.2	Métodos biológicos.....	46
4.1.2.2.1	<i>Manutenção dos microrganismos</i>	46
4.1.2.2.2	<i>Cepa Gluconoacetobacter xylinus</i>	46

4.1.2.2.3	<i>Produção dos meios de cultura</i>	47
4.1.2.2.3.1	<i>Meio Hestrin Schramm Modificado</i>	47
4.1.2.2.4	<i>Preparo dos pré-inóculos e inóculos</i>	47
4.1.2.2.4.1	<i>Celulose bacteriana</i>	47
4.1.2.2.5	<i>Produção de celulose bacteriana por fermentação estática</i>	47
4.1.3	Caracterização da Celulose Bacteriana	48
4.1.3.1	Microscopia eletrônico de varredura (MEV)	48
4.1.3.2	Microscopia força atômica (MFA).....	48
4.1.3.3	Ressonância magnética nuclear(RMN).....	48
4.1.3.4	Espectroscopia no infravermelho por transformada de fourier	49
4.1.3.5	Difratometria de raios-X	49
4.2	PRODUÇÃO DE NANOCRISTAIS DE CELULOSE (NCW)	50
4.2.1	Materiais.....	50
4.2.2	Equipamentos	50
4.2.3	Método	51
4.2.3.1	Preparação das membranas	51
4.2.3.2	Produção de nanocristais de celulose (NCW) por hidrólise ácida.....	51
4.3	SUCCINILAÇÃO DE NANOCRISTAIS DE CELULOSE (NCW-sc)	52
4.4	FUNCIONALIZAÇÃO DE NANOCRISTAIS DE CELULOSE SUCCINILADA (NCW-co)	52
4.5	CARACTERIZAÇÃO DAS NANOCRISTAIS DE CELULOSE (NCW, NCW-sc, NCW-co).....	52
4.5.1	Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FT- IR).....	52
4.5.2	Microscopia óptica de luz polarizada (MOLP)	53
4.5.3	Microscopia de força atômica (MFA).....	53
4.5.4	Análise termogravimétrie (TGA/DTG)	53
4.5.5	Quantificação do Colágeno Funcionalizado em NCW-Co.....	53
4.6	OPERAÇÃO DO QCM PARA PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA.....	54
4.6.1	Estudo da Resposta de Parâmetros de QCM em Relação ao Aumento da Massa Depositada Sobre o Disco	55
4.6.2	Descrição da Formação de Filme Sobre o Disco de QCM.....	55
4.6.3	Estudo de Estabilidade de Filme de NCW com Água	56

4.7	MONITORAMENTO DA REAÇÃO DE FUNCIONALIZAÇÃO DO NCW-co POR QCM.....	56
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
5.1	PRODUÇÃO DE CELULOSE BACTERIANA EM FERMETAÇÃO ESTÁTICA.....	57
5.2	CARACTERIZAÇÃO DA CELULOSE BACTERIANA	58
5.2.1	Microscopia Força Atômica (MFA)	58
5.2.2	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	59
5.2.3	Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	61
5.2.4	Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FT-IR).....	62
5.2.5	Difratometria Raios-X (DRX)	64
5.3	PRODUÇÃO DE NANOCRISTAIS DE CELULOSE (NCW, NCW-sc, MCW-co)	65
5.3.1	Produção de Nanocristais de Celulose (NCW).....	65
5.3.2	Reação de Succinilação nos Nanocristais de Celulose (NCW-sc)	67
5.3.3	Funcionalização do Nanocristal de Celulose Succinilado (NCW-co)	67
5.4	CARACTERIZAÇÃO DE NANOCRISTAIS DE CELULOSE (NCW, NCW-sc, NCW-co).....	68
5.4.1	Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FT-IR).....	68
5.4.2	Microscopia Óptica de Luz Polarizada (MOLP).....	69
5.4.3	Microscopia de Força Atômica (MFA)	70
5.4.4	Tremogravimetria (TGA/DTG).....	74
5.5	ESTUDO POR QCM DO MONITORAMENTO DAS REAÇÕES DE SUCCINILAÇÃO DE NANOCRISTAIS DE CELULOSE (NCW-SC) E POSTERIOR FUNCIONALIZAÇÃO COM PROTEÍNA HIDROLISADA DO NANOWHISKER SUCCINILADO (NCW-co).....	72
5.5.1	Resposta do QCM a Variação da Viscosidade e Composição do Meio	74
5.5.2	Resposta à Deposição de Nanocristais de Celulose sobre o Disco de Quartzo.....	75

5.5.3	Estabilidade do Filme de Nanocristais de Celulose Despositado sobre o Disco de Quartzo Frente a Eluição de Água	77
5.6	MONITORAMENTO EM TEMPO REAL DA FUNCIONALIZAÇÃO DE NCW-CO EM DISCO POR QCM	78
	CONCLUSÃO	81

1. INTRODUÇÃO

A celulose é a macromolécula biológica mais abundante da terra, profundamente estudada e usada pelo homem por milhares de anos, contudo, ainda há muito para se aprender a respeito deste polímero quanto a sua formação e aplicações.

A Celulose Bacteriana (CB) é caracterizada pelo seu alto grau de pureza, o que a diferencia da celulose vegetal, devido a ausência da lignina, hemicelulose e pectina. Sua estrutura contém ligações de hidrogênio entre os grupos hidroxila, podendo ocorrer na mesma molécula (ligações intramoleculares), sendo responsáveis pela rigidez das cadeias unitárias proporcionando estabilidade lateral, ou entre moléculas adjacentes (ligações intermoleculares), que são responsáveis pela formação da estrutura supramolecular (D'ALMEIDA, 1981; OKSMAN et al., 2006).

Esta CB apresenta fibras com regiões altamente ordenadas, regiões cristalinas, entrecortadas por regiões menos ordenadas, regiões amorfas. Esse arranjo estrutural confere propriedades físicas únicas, como: força de tensão, elasticidade, durabilidade, além de elevada capacidade de absorção e retenção de água, biodegradabilidade, além de não ser tóxica, nem alergênica. Devido tais propriedades é considerada um material biológico com potencial de uso industrial, o que leva a muitas pesquisas investigar o seu comportamento térmico, químico e até mesmo mecânico (DONINIL et al., 2010; LESTARI et al., 2014).

Há anos é utilizada em diversos campos industriais na sua forma cristalina (MIMMS, 1993), como emulsificante em fármacos (CERQUEIRA et al. 2009), produtos light (BARUFFALDI, 1998) e cosméticos (ISHIZU, 1991). É usada também na melhoria da resistência mecânica de filmes polieletrólitos de baixa espessura em baterias de lítio, e na medicina (HUBBE; ROJAS, 2008), para melhorar propriedades físico-mecânicas (IOELOVICH, 2010; HASSAN; HASSAN; OKSMAN, 2011), como reforço de materiais compósitos, seja na forma cristalina ou amorfa (YANO; NAGAYTO, 2004; WANG et al, 2006; GAGNON et al., 2010), e tem sido extensamente pesquisada como fonte para geração de etanol (OLSSON et al., 2006; ZHU et al., 2010).

Inúmeras pesquisas têm sido realizadas com intuito de melhorar a produção biotecnológica de celulose, por meio de testes de estirpes selecionadas, diferentes

modelos de fermentador, diferentes formulações de nutrientes e através da modificação de O₂ parciais e pressões de CO₂. Dentre as estirpes utilizadas está *Gluconacetobacter xylinus*, é o microrganismo modelo no estudo da produção de CB e é a única espécie conhecida capaz de produzir celulose em quantidades comerciais, apresentando-a livre de componentes indesejáveis (RING; NASHED; DOW, 1986; CALDEIRA, 2013).

A obtenção de nanocelulose e sua aplicação como reforço de compósitos e nanocompósitos biodegradáveis, têm despertado grande atenção nos últimos anos, devido às excelentes propriedades mecânicas, melhores que a própria CB, combinadas com baixo peso, biodegradabilidade e pelos benefícios ambientais causados pelo seu uso (SIRÓ; PLACKETT, 2010; EICHHORN et al., 2010; MONDRAGON et al., 2015).

Esta nanocelulose é formada a partir da hidrólise ácida da celulose. Neste processo ocorre rompimento principalmente da região amorfa com liberação da porção cristalina, resultando em bastões de polímeros de celulose da ordem no nanométrica. Estes são altamente rígidos e cristalinos, propriedades de grande interesse para a indústria (LIMA et al., 2015; MARTÍNEZ-SANZ; LOPEZ; LAGARON, 2011; PEREIRA et al., 2014).

Os grupos hidroxilas presentes na superfície dos nanocelulose são locais para introdução de grupos funcionais, processo denominado "Funcionalização da Superfície". Entre as principais formas de celulose utilizadas para funcionalização e formação de filmes finos, estão a celulose microcristalina (KONTTURI; TAMMELIN; OSTERBERG, 2006; AULIN et al., 2009) e a nanocelulose (DONG; REVOL; GRAY, 1998; JEAN et al., 2008; JEAN et al., 2009). Esta interação que ocorre entre as nanopartículas com o exterior é mediada pelas características químicas da sua superfície, podendo se obter nanocelulose funcionalizada com características químicas pretendidas, tudo isto, devido a sua compatibilidade com os diferentes grupos funcionais (DANIEL; ASTRUC, 2004; RIBEIRO-VIANA 2016). Processo que não tem sido muito estudado em biopolímeros de origem microbiana.

Estas interações podem ser identificadas por microgravimetria com microbalança de cristal de quartzo (QCM), equipamento que trabalha com a técnica de piezoelectricidade, onde um cristal de quartzo vibra com uma determinada frequência, em resposta à aplicação de um campo elétrico. Este permite acompanhar

continuamente a quantidade de massa depositada sobre o cristal em cada passo do processo de funcionalização, podendo relacionar a variação de frequência na oscilação no cristal de quartzo e a variação de massa na superfície do mesmo. (DAMOS; MENDES; KUBOTA, 2004; PESQUERO, 2010; PEDROSO et al., 2012; SANTOS, 2012). Por esta razão é que o QCM é provavelmente, a técnica mais utilizada na avaliação *in-situ* do processo de construção dos filmes (DECHER; SCHELENOFF, 2003).

Dentro deste contexto, a proposta desta dissertação foi funcionalizar nanocelulose com colágeno (NCW-Co) e demonstrar sua funcionalização em tempo real, um evento biológico de interação de proteína-ligantes em sinal elétrico por meio da técnica de microbalança de quartzo.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Produzir e funcionalizar nanocelulose bacteriana com colágeno hidrolisado, monitorando o processo por QCM.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Sintetizar e caracterizar filmes de celulose bacteriana em fermentação estática;
- Produzir e caracterizar nanocelulose (NCW) a partir de membranas de celulose bacteriana;
- Produzir e caracterizar nanocelulose funcionalizada com ácido succínico (NCW-sc);
- Produzir e caracterizar nanocelulose funcionalizada com colágeno hidrolisado (NCW-co);
- Estabelecer metodologia para o monitoramento de processos por microbalança de quartzo (QCM);
- Quantificar a funcionalização de nanocelulose com colágeno hidrolisado em tempo real em microbalança de quartzo.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 CELULOSE BACTERIANA (CB)

Os microrganismos são capazes de produzir celulose como metabólito primário extracelular, este exopolissacarido é produzido por várias espécies de bactérias *Gluconacetobacter*, *Alcaligenes*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Sarcina*, *Agrobacterium* e *Salmonella* (SHODA; SUGANO, 2005). O primeiro relato de produção de celulose foi em 1886 por A. J. Brown, que observou que células de *Acetobacter* produziam celulose na presença de oxigênio e glicose (BROWN, 1886).

A celulose bacteriana é um biopolímero não ramificado, composto por dezenas de unidades de glucose lineares arranjadas em paralelo (NABE et al., 1979), considera-se uma estrutura única composta por fibras muito finas, 100 vezes menor que a celulose vegetal. É um dos materiais orgânicos mais rígidos produzidos pela natureza e apresenta algumas vantagens a celulose vegetal, por ter uma pureza elevada apresentando a vantagem de não requerer tratamentos químicos de purificação (HORNUNG et al., 2006a), exibir um maior grau de polimerização e índice de cristalinidade (60-90%) (PRASHANT et al., 2009), apresenta grande elasticidade, resistência a secagem e pode ser moldável, além disso, possui maior capacidade de retenção de água e maior força de tensão, maior resistência à tração, biocompatibilidade e estabilidade química (JONAS; FARAH, 1998; KLEMM et al., 2006; WAN et al., 2006; KOON-YANG et al., 2014).

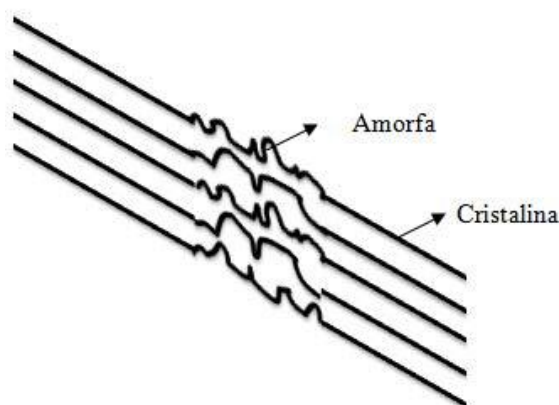
Observações com microscopia eletrônica mostraram que a celulose produzida por microrganismos ocorre na forma de nanofibras. As bactérias primeiro secretam uma substância, estruturalmente viscosa e homogênea, dentro da qual, depois de um curto tempo, as fibras de celulose são formadas (PRASHANT et al., 2009).

As fibras de celulose são definidas como um conjunto de microfibrilas, onde as moléculas de celulose são estabilizadas lateralmente através de ligações de hidrogênio entre os grupos hidroxilas (OKSMAN et al., 2006).

A CB apresenta regiões cristalinas que são resultados da ação combinada da biopolimerização e cristalização da celulose comandada por processos enzimáticos, e as regiões amorfas, que são resultados da má

formação da estrutura devido à alteração no processo de cristalização, denominadas, por alguns autores, de regiões em que a cristalização ocorreu com defeito (HABIBI et al., 2007; HABIBI; LUCIA; ROJAS, 2010). As microfibrilas consistem em celulose cristalina ligada por regiões amorfas, como indicado no esquema da Figura 1.

Figura 1 - Representação esquemática da estrutura da celulose, com regiões cristalinas conectadas com regiões amorfas



Fonte: Adaptado de Pakzad, Yassar (2010)

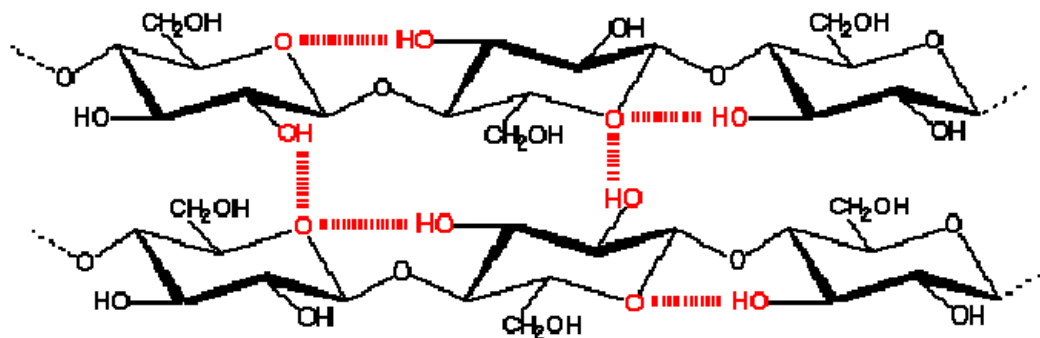
Na literatura, o termo microfibrila, apesar do prefixo micro, é normalmente usado para descrever fibras de celulose com 2-10 nm de diâmetro e comprimento de várias dezenas de micrômetros, dependendo da fonte de onde a fibra foi extraída (EICHHORN, 2010; CHEN, ZHANG; WU, 2010)

3.1.1 Estrutura Química e Aplicações da Celulose Bacteriana

A Celulose Bacteriana possui a mesma estrutura química da celulose vegetal, $(C_6H_{10}O_5)_n$, monômeros de glucose unidos entre si por ligações do tipo β -(1-4). (HONG et al., 2006). O polímero linear de celulose apresentado na Figura 2, é fortemente associado através das ligações de hidrogênio intramoleculares e intermoleculares sendo que o primeiro tipo de interação é

responsável pela rigidez da cadeia e o segundo pela formação da fibra (IGOR et al., 2010)

Figura 2 - Estrutura molecular da celulose



Fonte: Moyna (1999)

Membranas de CB foram descritas por Sisson, como "pergaminhos densos, muito resistentes à penetração de líquidos" (SISSON, 1935), propriedades que atraíram significativamente a atenção, gerando numerosos esforços em pesquisa e desenvolvimento. Como possui propriedades que lhe garantem vantagens em termos industriais, como alta pureza, alto grau de cristalinidade, alta densidade, melhor razão de aspecto, grande capacidade de se ligar à água e maior área superficial. Por apresentar todas estas características, a CB tem sido utilizada em diversas áreas (KUN-YANG et al., 2014) tais como:

- Biomedicina e Farmacêutica: principalmente para melhoramentos de tratamentos de reconstrução tecidual. O tamanho de nanofibras da CB, juntamente com a sua alta capacidade de retenção de água são adequados para feridas (úlceras crônicas ou trauma mecânico), permitindo a transferência do medicamento para dentro da ferida enquanto serve como uma barreira física eficiente contra infecção externa (KLEMM, 2013). Películas de celulose hidratada podem filtrar seletivamente, absorver ou liberar a passagem de diferentes compostos através desta, como medicamentos, antibióticos ou controlar a perda de líquidos (RAJWADE; PAKNIKAR; KUMBHAR, 2015)

Empresas brasileiras como a Bionext e a Membracel produzem tecido biológico a partir de CB, substituindo temporariamente a pele. A Biofill, investigou as propriedades do biopolímero para o tratamento de ferimentos (KLOIMSTELN; EATERMANN, 1990) e produziu dois produtos: Bioprocess e Gengiflex (AMAR et al., 1989) para serem utilizados na cura de feridas extensas. Outro produto patenteado veio da empresa americana Xylos Corp. que criou o produto Prima Cel™ para ser utilizado no tratamento de úlceras e ferimentos.

Chengdong et al. (2014) apresentaram um estudo de permeação/absorção de medicamentos através de membrana de celulose bacteriana como potenciadores de permeação. Com a utilização da CB há um aumento do coeficiente de permeabilidade e coeficiente de difusão com uma diminuição no tempo de atraso de permeação em comparação com a formulação de controle (pele).

Zang et al. (2014) exploraram o potencial da CB na engenharia tecidual, semeando células tronco derivadas do tecido adiposo sobre matrizes de CB, produzindo “scaffolds”. Estes foram avaliados quanto à diferenciação osteogênica por meio de Von Kossa, Alizarin vermelho, Fosfatase alcalina (ALP) e PCR. Após esta confirmação do potencial osteogênico, os scaffolds foram implantados em defeitos ósseos criados em ulnas de coelhos. Os autores concluíram que os scaffolds produzidos apresentam excelente habilidade de reparo em defeitos ósseos constituindo uma importante ferramenta para a engenharia tecidual.

- Alimentícias: para proteger e preservar os alimentos, a atenção especial deve ser dada à embalagem do produto. Além disso, há uma preocupação crescente com a biodegradabilidade de embalagens visto que questões ambientais são muito pertinentes nos tempos atuais. Embalagens de CB têm sido pesquisadas por serem resistentes à água e por serem biodegradáveis, porém o fato do polímero não possuir propriedades antibacterianas e antioxidantes faz com que seja necessária a formação de compósitos de CB/aditivos (SONIA; PRIYA DASAN, 2013; ARRIETA et al., 2014; GAO et al., 2014)

- Agricultura: a porosidade e a capacidade de absorção foram estudadas por Mohite e Patil (2014) o efeito da CB no solo. No seu trabalho eles concluíram que o polímero aumenta a capacidade máxima de retenção de água pelo solo e

que a porosidade também é influenciada diretamente pela presença do biopolímero. Os autores, no entanto, acreditam que mais estudos devem ser feitos na tentativa de explorar mais as possibilidades de se utilizar a CB para melhorias no solo.

- Eletrônica: uma aplicação muito interessante do potencial de fibras de celulose bacteriana combinadas com nanopartículas metálicas é no seu uso como membranas trocadoras de prótons em células combustíveis (YANG et al., 2009). Esforços estão sendo focadas em demonstrar uma maneira simples e de baixo custo de se sintetizar compósitos altamente condutores e flexíveis para serem aplicados em eletrônicos utilizando películas de CB como matéria prima e demonstrando que a mesma consegue manter-se eletricamente condutora sob situações de torção e alongamento (LIANG et al., 2012).

As propriedades únicas da CB permitiram também a síntese de uma membrana transdutora de som que mantém alta velocidade sônica com ampla frequência resultando em um dos materiais mais nobres na indústria do áudio (MOHITE; PATIL, 2014). Utilização de nano-membranas de celulose para aplicações em acústica, como diafragmas para transdutores eletroacústicos (NISHI et al., 1990). A Sony Corporation (Japão) em conjunto com Ajinimoto (Japão) desenvolveu os primeiros diafragmas de alto-falante de áudio utilizando celulose microbiana (IGUCHI et al., 1988). O melhor material para atender as rígidas exigências para a transdução de som ideal.

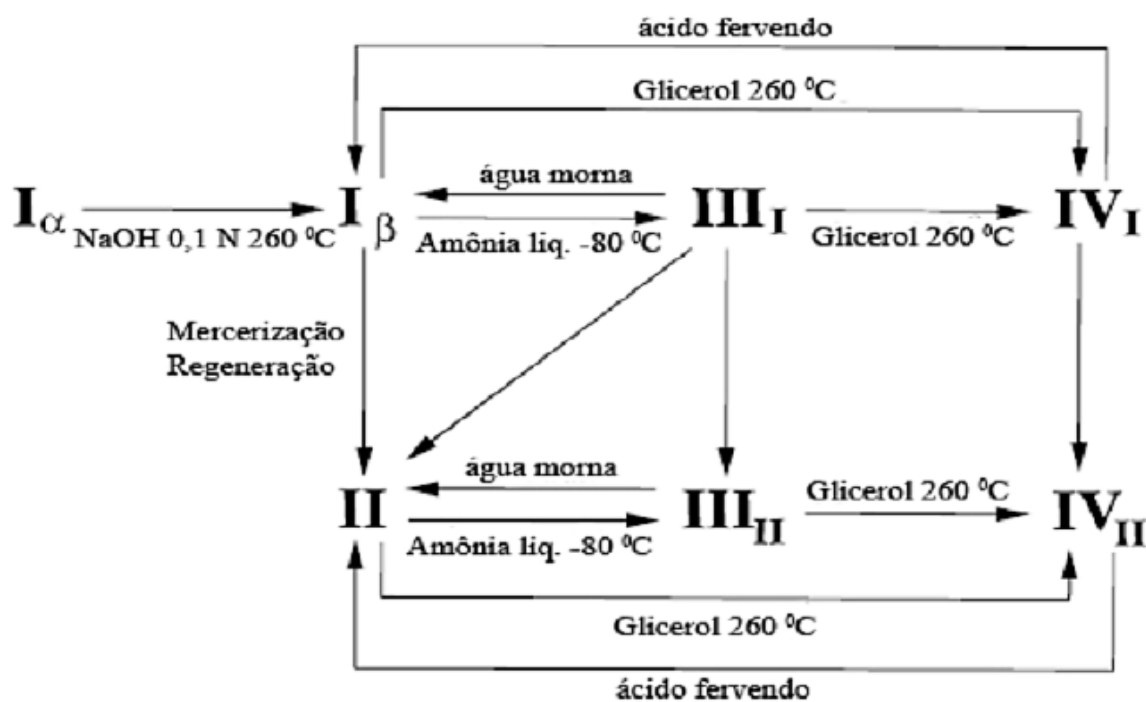
Outra aplicação encontrada para CB na indústria é como matéria prima na produção de derivados de celulose, como carboximetilcelulose, hidroximetilcelulose, acetato de celulose e metil celulose (PATENTS, 2015).

3.1.2 Biossíntese da Celulose Bacteriana

A *Gluconacetobacter xylinus* é identificada como uma espécie estritamente aeróbia e gram-negativa e é o microrganismo mais utilizado para produção de CB pela alta produção sendo considerado como o microrganismo mais importante para o estudo da biossíntese de celulose (RING; NASHED; DOW, 1986; CALDEIRA, 2013).

O mecanismo de cristalização das microfibrilas em *G. xylinus* pode dar origem a sete aloformas de celulose: I_α e I_β (celulose nativa), II, III_I, III_{II}, IV_I, IV_{II} interconvertíveis, como mostrado no diagrama do polimorfismo da celulose apresentado na Figura 3, a rede de ligações de hidrogênio e orientação molecular pode variar amplamente (MESQUITA, 2012).

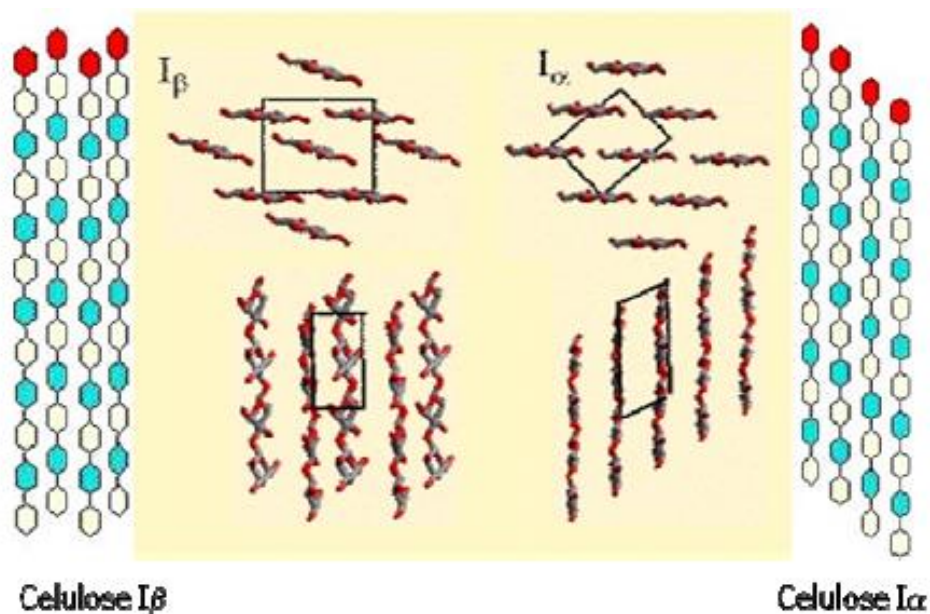
Figura 3 - Diagrama do polimorfismo da celulose



Fonte: Gurgel (2007)

A celulose I é composta por duas distintas fases cristalinas conhecidas como I_α e I_β que se diferenciam por diferentes padrões de difração, como descrito na Figura 4. A celulose I (alfa) é dominante nas algas e bactérias, possui uma estrutura cristalina triclinica, a celulose I (beta) predominante em plantas superiores, possui uma estrutura cristalina monoclinica com duas cadeias de celulose por célula unitária. A diferença ocorre nas ligações de hidrogênio e na conformação das cadeias de celulose vizinhas (FINK et al., 1997; KOYAMA et al., 1997; KLEMM et al., 2006; MESQUITA, 2012).

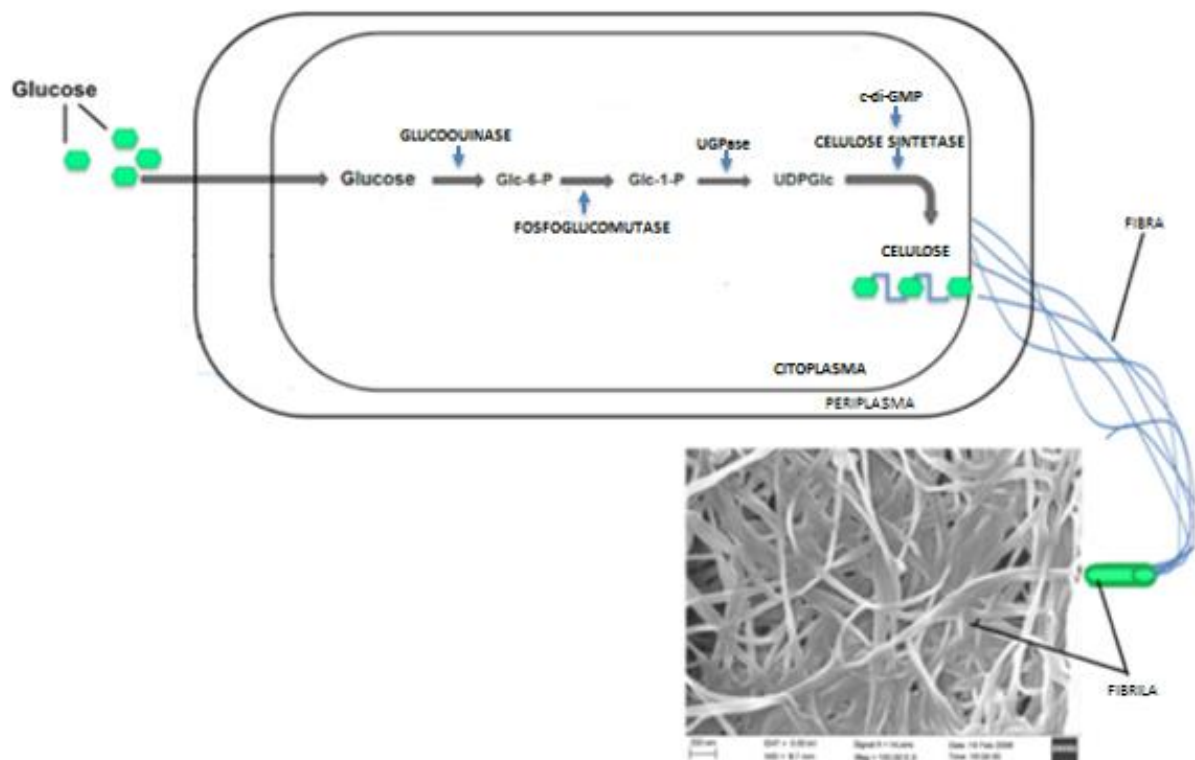
Figura 4 - Representação da estrutura de celulose do tipo I_α e I_β



Fonte: Adaptado de Vietor et al. (2000)

A biossíntese da CB apresentada na Figura 5, envolve quatro enzimas chaves, complexos catalíticos, e proteínas reguladoras (KRYSTYNOWICZ et al., 2005; KOON-YANG et al., 2014). No começo do processo da síntese, a enzima glucoquinase é a responsável pela fosforilação no C-6 da glucose, transformando a glucose em glucose-6-fosfato. A fosfoglucomutase catalisa a isomerização da glucose-6-fosfato a glucose-1-fosfato que é convertida em UDP-glucose (uridina difosfato glucose) na presença de UTP (uridina trifosfato) e da enzima UDPG fosforilase. O UDP-glucose produzido é utilizado como substrato para a enzima celulose sintetase, CesA (RICHMOND, 2000), esta enzima é ativada pelo nucleotídeo cíclico diguanilmonofosfato, (c-di-GMP). O ácido (c-di-GMP) desempenha um importante papel na síntese de CB. É um ativador alostérico para a enzima celulose sintetase. Na ausência de c-di-GMP, a enzima permanece inativa ou apresenta baixa atividade (ROSS et al., 1990; ROSS; MAYER; BENZIMAN, 1991). A síntese de celulose ocorre entre a membrana externa e a membrana citoplasmática que está em associação com os poros na superfície da bactéria.

Figura 5- Esquema da via metabólica de *G. xylinus*



Fonte: Adaptada de Koon-Yang et al. (2014)

A celulose é sintetizada pelos microrganismos em dois passos intermediários: i) a formação de cadeias 1,4- β -glucano e ii) a montagem e cristalização de cadeias de celulose. O passo limitante da velocidade é a montagem e a cristalização da celulose (DE LEY; GILLIS; SWINGS, 1984; BROWN; SAXENA, 2000). As moléculas de celulose são sintetizadas inicialmente no interior das bactérias. Estas são então giradas por meio de componentes de exportação de celulose para formar protofibrilas, que apresentam aproximadamente 2-4 nm de diâmetro. Uma fita em forma de microfibrilas de cerca de 80 nm é montada a partir de protofibrilas (IGUCHI et al., 2000).

3.1.3 Processo Fermentativo da Produção de Celulose Bacteriana

A produção e a produtividade da CB por bactérias é afetada principalmente pelas condições da cultura, tais como a composição do meio e fatores ambientais, como pH, temperatura, teor de oxigênio dissolvido e o tipo de culturas utilizada (fermentação estática ou aerada). O desenho ideal tanto para o meio como para as condições da cultura são importantes para o crescimento de bactérias produtoras estimulando a formação do produto (KOON-YANG et al., 2014). Na produção de filmes de CB é utilizada fermentação em condição estática (GOELZER et al., 2009), e para produção de esferas de CB ou feixes de fibras (grânulos irregulares dispersos por todo o meio) são produzidos a partir de condições agitadas (agitação do reator) (LOPES et al., 2014).

O grande interesse na celulose bacteriana decorre da sua estrutura específica, composta de resíduos de glucose, que gera diversas arquiteturas. A variação das condições de cultura pode fornecer celulose com características morfológicas e propriedades mecânicas distintas (PA'E; ZAHAN; MUHAMAD, 2011).

3.1.3.1 Fermentação estática

A fermentação estática é simples e não precisa de alta tecnologia, as culturas estáticas de *G. xylinus* são caracterizadas pela formação de um filme de celulose espessa na interface ar/líquido, onde as microfibrilas vão sendo liberadas pelas bactérias e se organizam em feixes que se sobrepõem formando planos paralelos (ROSS; MAYER; BENZIMAN, 1991; JONAS; FARAH, 1998). São membranas de celulose gelatinosas na superfície do meio de cultura (KRYSTYNOWICZ et al., 2002). Na superfície das culturas, primeiramente ocorre a formação de fragmentos de celulose no meio de cultivo como se fossem ilhas, mais tarde esses fragmentos aumentam de tamanho até se unirem e formarem um filme de celulose. A espessura do filme aumenta com o passar do tempo e pode atingir de 2-3 cm em quatro semanas (HORNUNG et al., 2006a)

Milleo et al. (2008) demonstraram que a fermentação estática apresenta um maior rendimento tanto de biomassa quanto de celulose, quando realizado em um tempo de cultivo igual a 168 horas. O microrganismo produz uma quantidade elevada de celulose nas primeiras 96 horas de fermentação seguida de um maior aumento na produção de biomassa.

Ao comparar os métodos de fermentação estática e aerada, a produção estática alcança maior crescimento bacteriano, assim como também maior produção de CB (GOELZER et al., 2009; GOMES et al., 2013; ZHONG, 2013).

3.2 NANOCELULOSE

Nos anos recentes o termo "nanoescala" tem atraído muita atenção devido ao impacto que as nanoestruturas causam nas diferentes áreas de aplicação industrial, pelas propriedades de alta razão de aspecto, cristalinidade e área superficial, excelentes propriedades mecânicas, combinadas com baixo peso, biodegradabilidade e pelos benefícios ambientais causados pelo seu uso. Geralmente são formadas pela estrutura da celulose I (KOCH, 2007; ZARBIN, 2007; SILVA; ALMEIDA, 2009; SIRÓ; PLACKETT, 2010; SIQUEIRA; BRAS; DUFRESNE, 2010; PENG et al., 2011; MONDRAGON et al., 2015).

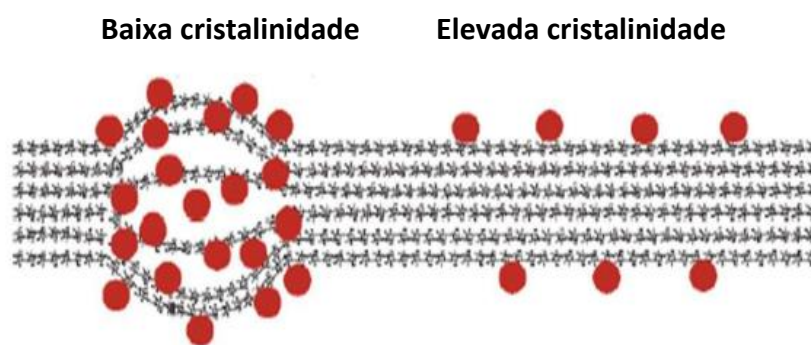
O primeiro relato sobre nanocelulose foi feito por Ranby em 1950. Ranby obteve suspensões coloidais estáveis de celulose vegetal a partir da degradação controlada das fibras de celulose catalisada com ácido sulfúrico. Esse trabalho foi inspirado a partir do trabalho de Nickerson e Habrle, em que eles observaram a degradação das fibras de celulose induzida por aquecimento em solução ácida, alcançando um limite após certo tempo de tratamento. Imagens de microscopia eletrônica de transmissão da suspensão seca revelaram a presença de agregados de partículas em forma de agulha e mais tarde medidas de difração de raio X mostraram que essas partículas tinham a mesma estrutura cristalina das fibras originais (HABIBI; LUCIA; ROJAS, 2010).

Nanocelulose é um termo geral para os diferentes tipos de partículas que têm pelo menos uma dimensão em nanoescala (MOON et al., 2011). A respeito da sua nomenclatura não há uma padronização e, por isso, há um uso inconsistente de termos na literatura. Existem apenas tendências atuais de

terminologia de acordo com o tamanho da partícula, propriedades, cristalinidade e morfologia. Existe três tipos principais: as Microfibras de celulose (MFCs), que possuem razão de aspecto elevada (10-100 nm de largura e 0,5-10 mm de comprimento), compostas basicamente de 100% de celulose, e contém tanto regiões amorfas como regiões cristalinas; as Nanofibras de celulose (NFCs), que possuem razão de aspecto elevada, geralmente maior que 50 (4-30 nm de largura e 500-2000 nm de comprimento), compostas basicamente de 100% de celulose, e contém tanto regiões amorfas como regiões cristalinas. A diferença entre MFCs e NFCs radica no processo de fibrilação que produz os diâmetros menos finos e mais finos, respectivamente. Os nanocristais de celulose (NCCs) ou nanowhiskers de celulose (NCW), que possuem razão de aspecto menor que NFCs, geralmente entre 5 a 50 (3-10 nm de largura e 50-500 nm de comprimento), compostas basicamente de 100% de celulose, com uma alta cristalinidade, na faixa de 54-88% (GARCIA DE RODRIGUEZ; THIELEMANS; DUFRESNE, 2006; SAITO et al., 2009; ABDUL KHALIL; BHAT; IREEANA YUSRA, 2012; TAPPI, 2014).

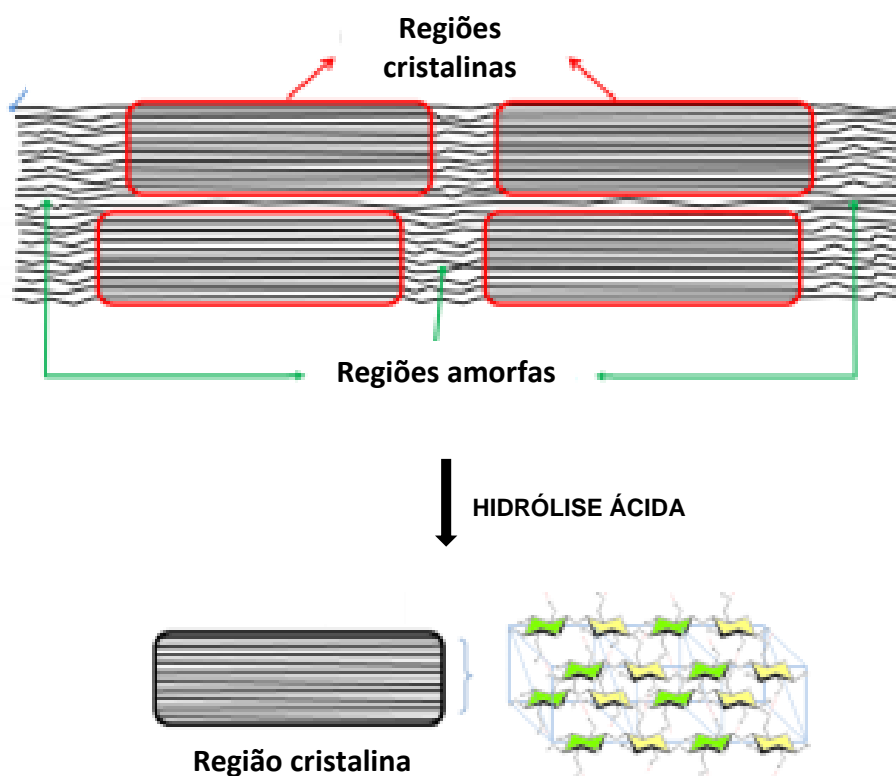
Para a obtenção de nanocelulose, o método mais comumente utilizado é a hidrólise ácida, com ácidos fortes como o ácido sulfúrico (H_2SO_4), clorídrico (HCl) ou combinação destes em diferentes concentrações e tempos de reação. O ataque do ácido nas fibras de celulose acontece primeiramente nas regiões amorfas da celulose, pois além de possuírem menor densidade em relação às regiões cristalinas, são regiões de acesso mais fácil, como apresentado na Figura 6, seguido de agitação mecânica da suspensão em água, se pode obter nanocelulose (PAULA et al., 2009; PAKZAD; YASSAR, 2010; HABIBI; LUCIA; ROJAS, 2010; BOUJEMAOUI et al., 2015). Os principais processos de isolamento destes materiais se apoiam no fato de que as regiões amorfas das fibras celulósicas serem solúveis em ácidos com concentração em torno de 60% m/m, enquanto que as regiões cristalinas não, levando à formação de estruturas altamente cristalinas, como apresentadas na Figura 7 (SEHAQUI et al., 2011).

Figura 6 – Ataque ácido nas regiões cristalinas e regiões amorfas



Fonte: Adaptado de Mesquita (2012)

Figura 7 - Obtenção de nanocelulose por hidrólise ácida



Fonte: Adaptado de Camargos. (2016)

As condições de hidrólise, como tempo e temperatura de reação, e tipo de ácido, influenciam diretamente na energia superficial, na morfologia e nas propriedades das nanocelulose (QUA et al., 2011; HABIBI et al., 2007; BENINI, 2015; YONG-HU; WANG, 2015).

Segundo Elazzouzi-Hafraoui et al. (2008), quando o ácido sulfúrico é utilizado, o nano-whisker obtido possui maior dispersão em meio aquoso que o material obtido com ácido clorídrico. Ao utilizar este ácido observou-se que suas dispersões tendiam à floculação. Além disso, existe diferença no comportamento térmico e reológico entre os nanocristais obtidos. A hidrólise com ácido sulfúrico resulta em nanocristais mais estáveis em suspensão, devido à elevada carga negativa gerada pelos grupos sulfatos presentes nas superfícies dos cristalitos.

Um aspeto relevante da nanocelulose na sua formação, é que contém grupos hidroxilas livres ligados aos carbonos, os quais são responsáveis pelas interações intermoleculares. A partir dessas interações sucessivas as estruturas são formadas, dando origem à fibra: micelas, agrupamento das cadeias em feixes; microfibrilas, agregados de micelas; e fibrilas, agregados de microfibrilas que também podem ser denominados de macrofibrilas (ZHIMING; CHENG, 2012; SAMIR; ALLOIN; DUFRESNE, 2005). Portanto, as microfibrilas que compõem as fibras, são resultantes do arranjo das moléculas de celulose (monocristais com alta perfeição, semelhantes a agulhas) além da suas pequenas dimensões podendo vir a substituir os nanotubos de carbono (KVIEN; TANEM; OKSMAN, 2005; PAKZAD; YASSAR, 2010).

A nanocelulose apresenta diferentes propriedades de interesse para indústria, como propriedades, de modo geral, a nanocelulose apresenta maior rigidez quando comparada com outros tipos de materiais (vidro), além de possuir baixa densidade, os trabalhos tem se concentrados sobre esta propriedade tem se concentrado na determinação da elasticidade deste material. Outra propriedade importante da nanocelulose é a propriedade térmica, em termos de degradação da nanocelulose, que pode ser obtida por termogravimetria (TG) que apresenta porcentagem de massa em função da temperatura, dependendo de la velocidades de aquecimento e do nanomaterial se dá o aparecimento da degradação térmica (LAHIJI et al., 2010; MOON et al., 2011).

3.2.1 Aplicações da Nanocelulose

Há uma variedade de aplicações potenciais para a nanocelulose, como dispositivos eletrônicos, curativos e implantes bioartificiais, e, principalmente,

agente de reforço em compósitos. Em geral, a nanocelulose possui propriedades mecânicas superiores às das fibras convencionais de celulose devido à altíssima razão de aspecto, baixa densidade da celulose ($1,5 \text{ g/cm}^3$) e elevado módulo elástico (as nanocelulose podem atingir valores de até 220 GPa na direção paralela e um valor de 15 Gpa para a direção perpendicular as cadeias. É possível ressaltar que a superior estabilidade química, as refinadas propriedades mecânicas e o distinto aspecto físico são características gerais da nanocelulose, principalmente dos nanocristais de celulose, que conseqüentemente, fazem dela um material que pode ser usado em inúmeras aplicações promissoras (EICHHORN et al., 2010; KLEMM, D. et al., 2011; ABDUL KHALIL et al., 2014; BOUJEMAOUI et al., 2015).

As duas maiores razões para estes materiais apresentarem características particulares nestas dimensões são: o aumento relativo da área superficial e os efeitos quânticos que surgem do confinamento espacial dos elétrons entre as fronteiras cristalinas (ANDERSEN; FONG; PICKETT, 2002). Em uma partícula com 30 nm de tamanho, cerca de 5% dos seus átomos estão na superfície. Em uma partícula com 10 nm, este número sobe para 20% e em uma partícula que tenha 3 nm, cerca de 50% de seus átomos estarão em sua superfície. Este aumento de átomos na superfície leva ao aumento de reatividade, fazendo de alguns nanomateriais ótimos catalisadores, que podem ser utilizados para melhorar a eficiência de baterias e pilhas, além da produção de semi-condutores. Com o tamanho da matéria sendo reduzido a alguns nanômetros os efeitos começam a ter um papel importante em suas propriedades (LI et al., 2009; LI, 2011; ABDUL KHALIL et al., 2014).

A cristalinidade e razão de aspecto da nanocelulose, influenciam notavelmente nas diferentes aplicações, como é no caso da capacidade que tem a nanocelulose de ser utilizada como reforço, quando incorporada em matrizes poliméricas (SILVA; D'ALMEIDA, 2009).

Belbekhouche et al. (2011) no seu trabalho desenvolveram duas formas de filmes de celulose para aplicação de barreira de gases, os autores produziram filmes de nanocristais e microcristais de celulose, e investigaram o efeito do tamanho da partícula nas propriedades de transporte de gás (O_2 , N, CO_2), como resultado eles observaram que os filmes de nanocristais foram mais permeáveis

a gases, comparados com a forma microcristalina, isto devido ao fato da alta porosidade que possuem.

Visakh et al. (2012) produziram compósitos de borracha natural reforçados com nanocristais de celulose. Os melhores resultados encontrados pelos autores para a resistência à tração foram para os compósitos reforçados com 10% (m/m) de nanowhiskers, com uma resistência à tração 88% superior a da borracha pura.

Al-Turaif et al. (2013) avaliaram a influência das nanofibras de celulose nas propriedades da resina epóxi. Uma quantidade de reforço de 0,1% (m/m) aumentou o módulo de Young da resina de 200 MPa para 400 MPa. Os autores ainda estudaram a cinética de formação de filmes da resina epóxi e concluíram que há uma quantidade ótima de CNF que pode ser adicionada para que os filmes sejam formados de maneira rápida e uniforme, e que qualquer teor mais elevado de nanopartículas pode levar à aglomeração das mesmas, prejudicando o desempenho mecânico dos compósitos

Kargarzadeh et al. (2015) avaliaram as propriedades dinâmico-mecânicas de compósitos poliéster/CNC. Segundo os autores, a adição de CNC à resina poliéster aumentou a dureza dos compósitos em 96% em comparação com a resina pura, e o módulo de armazenamento dos compósitos aumentou em 22% em relação à resina com a adição de apenas 2% de CNC.

Além de sua aplicação majoritária como agente de reforço, também apresenta potenciais aplicações no campo tecnológico como embalagens, revestimentos, cosmético, filmes antimicrobianos, filmes transparentes, *displays* flexíveis, implantes biomédicos, produtos farmacêuticos, liberação de drogas, indústria especial, indústria automotiva, materiais de construção, moldes para componentes eletrônicos, baterias, supercapacitores, polímeros eletroativos, carregadores de agentes terapêuticos (SONIA, 2013; ARRIETA, 2014; ABDUL KHALIL et al., 2014; BOUJEMAOUI et al., 2015; CAMARGO, 2016). Dispositivos e nanossensores para detecção precoce de doenças e patógenos (diagnóstico *in vitro*, através de biochips ultrasensíveis e altamente integrados, que respondem à reação da DNA polimerase acoplada com micro ou nanofluidos), incorporados em dispositivos sensíveis a estímulo (cateteres), capazes de fornecer informações sobre o estado patológico, identificando a patologia ou

alteração molecular (BAWA, 2007; MARTÍNEZ-SANZ et al., 2013; ARRIETA et al., 2014; YU; QIN, 2014;).

Outros dois exemplos de aplicações de nanocristais de celulose são: solidificação de cristais líquidos para aplicações ópticas, como o papel de segurança e o uso como agentes de reforço mecânico para filmes finos de eletrólitos poliméricos para aplicações de bateria de lítio (MOON, 2011; BRINCHI et al., 2013; GIRI; ADHIKARI, 2013).

3.3 FUNCIONALIZAÇÃO DE BIOPOLÍMEROS

São muitos os esforços centrados nesta área, como é no caso do desenvolvimento de nanomateriais funcionalizados, a fim de gerar produtos de alto valor agregado, alterando seus atributos com propriedades específicas (HU, CHEN, YANG, LI, E WANG, 2014).

De acordo com a União internacional de química pura e aplicada - IUPAC (HORIE et al., 2004), a definição de polímeros funcionais é:

1) Um polímero que carrega grupos funcionais específicos (tais como grupos hidroxila, carboxila ou amino) e que tornam o polímero reativo, ou;

2) Um polímero que exerce uma função específica pela qual é produzido e utilizado. A função pode ser tanto uma função química como uma função física, como condutividade elétrica. Um polímero funcional, ainda de acordo com a IUPAC, é aquele que possui reatividade química específica ou usos físico, químico, biológico, farmacológico, dentre outros usos, que dependem de grupos químicos específicos existentes. A funcionalização da superfície com grupos reativos apropriados pode constituir um pré-requisito para uso de partículas poliméricas em aplicações biotecnológicas (PICHOT, 2004; RIBEIRO-VIANA, 2016).

O tratamento químico convencional da superfície de polímeros implica no seu manuseio prévio, com o uso frequente de solventes e posteriores tratamentos térmicos, os quais são desnecessários com a adição de agentes de acoplamento (um destes agentes muito utilizados são os grupos anidrido) simplificando posteriormente o processo de funcionalização. O mecanismo de compatibilização propõe a formação de ligações covalentes entre os grupos

anidrido com os grupos hidroxilas das cadeias poliméricas (CORREA et al., 2003; KIM et al., 2007; ROSA; FERREIRA; NACHTIGALL, 2009).

Na literatura já foram descritas algumas estratégias para a funcionalização da superfície de um polímero. TIAN et al. (2011) citam duas estratégias principais:

(a) introdução de grupos funcionais por meio dos monômeros polimerizados (muitas vezes de forma protegida antes da polimerização, para exposição após a reação);

(b) introdução de grupos funcionais nas cadeias poliméricas com auxílio de reações químicas adicionais, após a polimerização, como é o caso deste trabalho.

Alterações químicas típicas já feitas com êxito em fibras vegetais (KIM, NISHIYAMA; KUGA, 2002; OSHIMA, et al., 2008; SHEN et al., 2009; SANTOS et al., 2010), foram também reportadas com sucesso em celulose bacteriana (RIBEIRO-VIANA, 2016). Estas alterações foram reproduzidas em nanocelulose bacteriana (técnica pouco estudada em nanomateriais a partir de microorganismos), modificando principalmente o hidroxilo de glucose, induzindo variações nas propriedades.

O processo de funcionalização de nanocelulose tem despertado grande atenção, devido a sua vasta gama de possíveis aplicações tecnológicas, além disso, sua versatilidade pode ser incrementada pela otimização de suas propriedades físico-químicas, incluindo alterações estruturais que proporcionam novas e melhores características.

3.4 MICROBALANÇA DE CRISTAL DE QUARTZO (QCM – QUARTZ CRYSTAL MICROBALANCE)

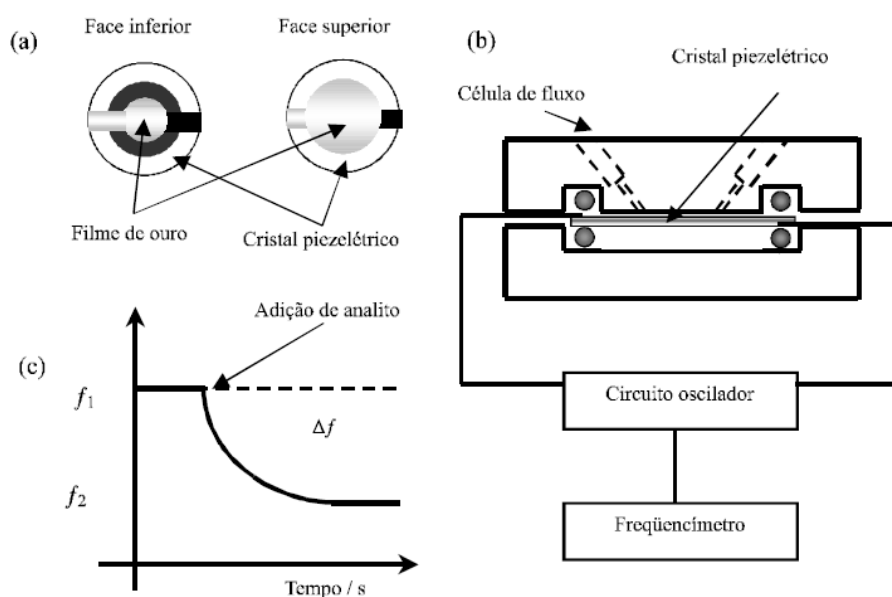
É uma técnica baseada no fenômeno da piezoelectricidade que consiste na capacidade que alguns cristais possuem de gerar um campo elétrico quando os mesmos sofrem algum estresse mecânico ou o efeito oposto - a aplicação de uma voltagem sobre o cristal provoca distorções físicas no mesmo (ANDRADE et al., 1991; COOPER; HAUSMAN, 2007). O material mais comumente utilizado e que possui essa propriedade piezoelétrica é o quartzo, que consiste de uma

forma cristalina específica do dióxido de silício (SiO_2), sendo insolúvel em água e resistente a altas temperaturas (DAMOS et al., 2004)

O equipamento consiste, basicamente, em um disco confeccionado em cristal piezelétrico de quartzo revestido nas faces superior e/ou posterior por um depósito metálico, como mostra a Figura 8a. Este é acoplado a um circuito oscilador responsável pela aplicação do campo elétrico alternado ao cristal, cujo propósito é provocar uma oscilação no centro do cristal piezelétrico (O'SULLIVAN; GILBAULT, 1999), diretamente ligado ao circuito oscilador (freqüencímetro) responsável pelo monitoramento das variações na freqüência de oscilação do cristal e um computador para obtenção e tratamento dos dados, como apresentado na Figura 8b.

À medida que o potencial elétrico alternado é aplicado, promove um movimento vibracional no cristal, estabelecendo uma onda acústica transversa que se propaga através do cristal. Desta forma, se um material é depositado sobre a superfície do cristal ocorre redução no movimento de oscilação, resultando em diminuição da freqüência (f) de ressonância do mesmo. Conseqüentemente, mediante um monitoramento contínuo da freqüência do cristal é possível se investigar os fenômenos interfaciais e superficiais, como apresentado na Figura 8c.

Figura 8 - Descrição do equipamento de QCM



Fonte: Damos, Mendes, Kubota. (2004) (a) Desenho esquemático da vista superior e inferior de um cristal de quartzo com depósitos metálicos em ambos os lados; (b) esquema ilustrativo de uma célula de fluxo para operação de cristais piezelétricos em meios líquidos, incluindo o sistema oscilador e o freqüencímetro; (c) massograma esquemático representativo da variação da freqüência de um cristal de quartzo em função do tempo. (f_1) freqüência inicial do cristal; (f_2) freqüência após adição do analito; (Δf) variação da freqüência do sistema

É, provavelmente, a técnica mais utilizada na avaliação in-situ do processo de construção dos filmes (DECHER; SCHLENOFF, 2003) Por meio desta técnica é possível relacionar a variação de freqüência na oscilação no cristal de quartzo e a variação de massa na superfície do mesmo, permitindo acompanhar continuamente a quantidade de massa depositada sobre o cristal de quartzo em cada passo do processo, através da variação da freqüência de vibração desse cristal ao longo da deposição de cada camada (pois quando uma interação ocorre a massa sobre a superfície do cristal aumenta e por consequência sua freqüência de oscilação diminui de maneira proporcional). O cristal de quartzo vibra com uma determinada freqüência, em resposta à aplicação de um campo elétrico alterno. Com a deposição de material na superfície do cristal, a sua freqüência de vibração é alterada, podendo relacionar-se a variação da freqüência de vibração do cristal com a massa de material depositado através da equação de Sauerbrey (Equação 1) (DAMOS et al., 2004; PESQUERO et al., 2010; PEDROSO et al., 2012; SANTOS, 2012).

$$\Delta f' = - \frac{f_0^2}{F_q \rho_q A_{el}} \Delta m$$

Equação 1

Na Equação 1, temos que Δf é a variação da freqüência, f_0 é a freqüência fundamental do cristal de quartzo, Δm é a variação da massa sobre o eletrodo, ρ_q é a densidade do cristal de quartzo, F_q é a constante de freqüência ($F_q = f_0 d_q$, sendo que d_q é a espessura do cristal) e A_{el} é a área do eletrodo depositada sobre o cristal.

Utilizando as variações de frequência é possível a construção de uma curva cinética e de saturação permitindo cálculos das constantes cinéticas e de afinidade da interação receptor-ligante (QCM 2013) é possível relacionar a variação de frequência de oscilação do cristal com a massa aderida em sua superfície.

3.4.1 Aplicações do QCM

De acordo com Damos, Mendes, Kubota. (2004) a técnica de QCM segundo seu parâmetro de frequência de ressonância do cristal de quartzo pode apresentar as seguintes informações:

- velocidade de corrosão em filmes;
- adsorção, dessorção e decomposição;
- variações de massa em processos redox;
- constante de associação;
- constantes de cinéticas;
- grau de cobertura em superfícies;
- energia de adsorção.

O QCM devido a sua alta sensibilidade há tempo vem apresentando varias aplicações de detecção e monitoramento de material biológico como apresentado na Tabela 1.

Tabela 1 - Diferentes aplicações do QCM no monitoramento de material biológico.

Aplicação	Propósito	Referência
Filmes orgânicos	Estudo dos parâmetros associados com adsorção por QCM, bem como identificação e divisão entre adsorção física e	KUBONO et al., 2002

	química durante o estágio de formação do filme.	
Monocamadas auto-organizadas	Estudo da cinética de formação de butanotiósio sobre ouro.	QU; MORIN, 2002
Filmes protéicos	Estudo de interação em (tempo real) e cálculo das constantes de associação, dissociação e equilíbrio de cloreto de berbelina com albumina de soro bovino.	MAO et al., 2002
Polímeros conductores	Avaliação de processos redox e mecanismos de condutividade em filmes de poripirrol modificados com diferentes ânions.	SYRITSKI; OPIK; FORSEN, 2003

Fonte: Adaptada Damos, Mendes, Kubota. (2004)

Em outros estudos mais recentes esta técnica tem sido utilizada em processos biológicos que envolvem a interação receptor-ligante, como por exemplo, na interação antígeno-anticorpo (SVOBODOVÁ et al., 2006) e lectina-carboidrato (PESQUERO et al., 2010; PEDROSO et al., 2012; SANTOS, 2012). O estudo destas interações pode ser realizado por meio do desenvolvimento de biossensores (PEI et al., 2005; SVOBODOVÁ et al., 2006; PEDROSO et al., 2012) e superfícies de reconhecimento para avaliação das constantes cinéticas de medidas de afinidade (PESQUERO et al., 2010; SANTOS, 2012) e a partir desses, há a decodificação de processos de reconhecimento molecular em sinais mensuráveis.

De acordo com os trabalhos de Tan et al. (2009) e Huang et al. (2010), a QCM devido a sua alta sensibilidade na detecção de aumento de massa, operação fácil e monitoramento dinâmico, tem facilitado vários estudos de interação biológica, como o monitoramento do efeito citotóxico de algumas drogas sobre células tumorais, detetando pequenas concentrações pela variação da massa.

Segundo Jerez et al. (2011) que estudaram as propriedades termodinâmicas da adsorção direcionada eletroquimicamente de colágeno e albumina bovina (BSA), em superfícies de ácido poli-láctico (PLA) onde foram ativadas pela irradiação com luz UV (0 v e 0,3 v). Estes autores fizeram monitoramento em tempo real da adsorção mediante técnica de microgravimétrica (QCM). Eles obtiveram uma resposta típica de mudança de frequência versus tempo causada pela adsorção de BSA a 37°C, de uma solução de 20µg/mL. Curvas semelhantes foram obtidas para o colágeno. Com base nas alterações de frequência em estado de equilíbrio de adsorção, obteve-se a quantidade de proteína (BSA:1051J/mol e Colágeno: 434 J/mol) adsorvida na superfície do revestimento de PLA usando a equação de Sauerbre (QCM 2011)

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 PRODUÇÃO DE CELULOSE

4.1.1 Material

4.1.1.1 Microorganismo

O microrganismo que foi explorado para a produção de celulose bacteriana e metabolitos é da estirpe *Gluconacetobacter xylinus* ATCC 23769, proveniente da fundação André Tosello localizada em Campinas, São Paulo, em junho de 2014.

4.1.1.2 Manutenção do microrganismo

A bactéria *G. xylinus* produtora de celulose foi mantida em tubos do tipo Eppendorf em glicerol 10 % v/v sob-refrigeração a - 80 °C (LUDLAM et al., 1989; BÂATI et al., 2000).

4.1.1.3 Meio de cultura

O meio de cultura utilizado para o pré-inóculo e inóculo para a produção de celulose bacteriana, teve sua composição baseada nas principais fontes para o crescimento do microrganismo, e está apresentado no quadro a seguir.

Glucose 4% (Hestrin Schramm Modificado)

Reativos	Quantidade
Levedura	0,4 g
Peptona	0,4 g
Na ₂ HPO ₄	0,4 g
Ac. Cítrio	0,092 g
Glucose	3,2 g
Água	80 mL
pH	5,5

O meio foi esterilizado por 20 minutos em autoclave, a 121° C, com 1,1 kgf/cm².

4.1.1.4 Equipamentos

- Microcentrífuga refrigerada.
- Centrífuga.
- Freezer - 85 °C.
- Cabine de segurança biológica classe II A1.
- Autoclave.
- Microscópio eletrônico de varredura.
- Microscópio eletrônico de transmissão.
- Microscopia força atômica.
- Ressonância magnética nuclear.
- Difratometria de raios X.
- Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier.
- Fermentador microprocessado multifunção.
- Balança analítica.
- Estufa bacteriológica.
- Estufa para secagem e esterilização.
- Bomba peristáltica.

4.1.2 Métodos

4.1.2.1 Métodos químicos

4.1.2.1.1 *Tratamento da celulose*

A celulose obtida a partir do meio de glucose 4 %, primeiramente, foi retirada na forma de filme nas culturas estáticas. A centrifugação foi em 5000 rpm, por 15 minutos, sem refrigeração. Em seguida, a celulose foi tratada com solução de 0,1N de NaOH por 24 horas a temperatura ambiente para fins de remoção de bactérias e clareamento. Posteriormente, a celulosa bacteriana foi lavada com água purificada e procedeu uma nova centrifugação, a 5000 rpm, por 10 minutos. A celulose centrifugada foi secada em estufa.

4.1.2.2 Métodos biológicos

4.1.2.2.1 *Manutenção dos microrganismos*

A técnica utilizada para preservação da cepa *Gluconoacetobacter xylinus*, diminuindo o risco de alteração no perfil genético foi o congelamento das linhagens.

4.1.2.2.2 *Cepa Gluconoacetobacter xylinus*

Foi preparada uma suspensão da cultura pura liofilizada do microrganismo *G. xylinus* em meio de glucose 4 %, esta suspensão foi deixada por 7 dias em agitador de bancada a 28°C sob agitação de 100 rpm. A partir desta suspensão, um pré-inóculo de 200 mL foi preparado em meio glucose 4 % permanecendo sob as mesmas condições de temperatura e agitação por 48 h, após esse período alíquotas de 1 mL foram retiradas do meio e colocadas em Eppendorfs estéreis, centrifugados por 1 minuto a 13000 rpm em microcentrífuga refrigerada. Esse processo foi repetido 2 vezes para cada Eppendorf e entre as

centrifugações o material foi ressuspenso. Após as centrifugações o sobrenadante foi desprezado e 1 mL de glicerol 10 % v/v estéril foi adicionado ao precipitado de cada frasco foi identificado e armazenado em freezer - 85°C. Todo procedimento foi realizado de forma asséptica (LUDLAM et al., 1989; BÂATI et al., 2000).

4.1.2.2.3 *Produção dos meios de cultura*

4.1.2.2.3.1 *Meio Hestrin Schramm Modificado*

Para o meio de cultura é utilizado 4% (p/v) de glucose anidra, 0,4% (p/v) de extrato de levedura, 0,4% (p/v) peptona, 0,4% (p/v) Na₂HPO₄ e 0,092% (p/v) ácido cítrico hidratado para um volumem total de 80 mL, ajustado o pH a 5.5, esterilizado por 20 minutos em autoclave, a 121°C, com 1,1 kgf/cm². (HESTRIN; SCHRAMM, 1954).

4.1.2.2.4 *Preparo dos pré-inóculos e inóculos*

4.1.2.2.4.1 *Celulose bacteriana*

Uma vez preparado o meio de glucose 4%, em frasco de erlermeyers de 250 mL contendo 80 mL, estes foram inoculados com quatro eppendorf contendo *Gluconacetobacter xylinus*. O pré-inóculo ficou sob agitação em agitador orbital de bancada a 100rpm, por 48 h a 28 °C. Foi realizado este mesmo procedimento para obter 650 mL do inóculo.

4.1.2.2.5 *Produção de celulose bacteriana por fermentação estática*

A obtenção de membranas de celulose através de fermentação estática, foi realizada conforme à metodologia 4.1.2.2.4.1. O volume total foi homogeneizado e distribuído em placas de petri, cada uma com 55 mL, mantidas a uma temperatura de 28 °C, em estufa bacteriológica durante dez dias. A celulose produzida foi retirada com pinça e submetida ao tratamento com

hidróxido de sódio para limpeza e clareamento conforme a metodologia 4.1.2.1.1.

4.1.3 Caracterização da Celulose Bacteriana

4.1.3.1 Microscopia eletrônico de varredura (MEV)

A morfologia e microestrutura da celulose, produzida no meio de glucose 4%, foi observada em microscópio eletrônico de varredura. Estas foram fixadas em um suporte com auxílio de fita de carbono e foram submetidas ao recobrimento metálico com ouro, espessura de 40 nm sob atmosfera de argônio, utilizando equipamento de recobrimento metálico marca Bal-Tec SCD 005. Em seguida as amostras metalizadas foram submetidas à análise em microscópio eletrônico de varredura FEI Quanta 200 operando de 15 a 20 kV.

4.1.3.2 Microscopia de força atômica (MFA)

As amostras de celulose produzidas no meio de glucose 4%, tratadas e secas conforme metodologia 4.1.2.1.1, foram observadas no microscópio modelo Discoverer TMX 2010 (TopoMetrix) operando no modo de contato intermitente, sob condições ambientais (25 °C e umidade relativa de 50%). As imagens topográficas e de contraste de fase, foram obtidas simultaneamente utilizando sondas de silício. As varreduras foram realizadas de 30 x 30 µm e alturas de até 5 µm e altura máxima da amostra de 5 mm.

4.1.3.3 Ressonância magnética nuclear (RMN)

As análises em RMN foram realizadas a 25°C utilizando um espectrômetro Bruker Avance III de 400 MHz operado a uma frequência de ^{13}C de 100 MHz, utilizando a técnica de polarização cruzada (CP), no ângulo mágico (MAS) a partir das amostras finamente trituradas, ou de partículas que foram

preenchidas com CaO em pó em rotor 4 mm, e utilizando glicina como um padrão externo. Os espectros ^{13}C foram obtidos utilizando o programa padrão de pulso (CP, Bruker) com SI de 32 K e tempo de contato de 2 ms (p15).

4.1.3.4 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR)

Para a espectroscopia de absorção na região do infravermelho as amostras e o padrão foram misturados com brometo de potássio, sempre com 2% de amostra e prensadas sob forma de pastilhas. Os espectros foram obtidos em espectrofotômetro Bomem, modelo MB com uma resolução de 4 cm^{-1} .

4.1.3.5 Difratometria de raios-X (DRX)

As amostras de celulose foram submetidas à análise em difratômetro de raios-X para identificação da cristalinidade do material obtido, usando um equipamento PRO MPD PANalytical X PERT. Os filmes foram colocados em um plano do goniômetro para background no suporte de amostra. Os raios X da fonte de cobre, excitado a 40 kV X 30 mA, foram colimados a 0.04° , onde a 1° primeira fenda vertical diverge 10 mm da horizontal. A radiação difratada $\text{Cu}(K_\alpha)$ foi medida a partir de 5 a 60 graus (2θ), com uma taxa de escaneamento de $0.002^\circ/\text{s}$.

O tamanho do cristalito foi medido pela equação de Scherrer, onde o fator de forma é $k=0,90$, o comprimento de onda é $1,54\text{ \AA}$ e o θ é o ângulo de difração da amostra em graus e o β é a largura total a meia da altura (FWHM) em 2θ radianos. Para os picos de refração de raios X equipado com função lorentziana, β pode estar corrigido subtraindo o dado instrumental FWHM (β_{inst}) a partir de uma medida (β_{meas}) como mostrado na Equação 2.

$$D = \frac{k \cdot \lambda}{\beta_{2\theta} \cdot \cos \theta}$$

$$\beta_{2\theta} = \beta_{measured} - \beta_{instrumental}$$

Equação 2

O índice de cristalinidade foi determinado pela Equação 3, do método Segal et al. (1959) onde I_{am} é a intensidade do alo amorfo em $18,05^\circ$ (2θ) e I_{002} é a intensidade da difração 002 do pico de celulose.

$$I_{cr} = \left(1 - \frac{I_{am}}{I_{002}} \right) \times 100$$

Equação 3

4.2 PRODUÇÃO DE NANOCRISTAIS DE CELULOSE (NCW)

A obtenção de nanocelulose foi realizada através da hidrólise ácida, com ácido sulfúrico 64%. Esta hidrólise ocorre primeiramente nas regiões amorfas das cadeias de celulose, devido a maior acessibilidade química, e emseguida nas regiões cristalinas. Esse processo resulta na formação de estruturas cristalinas denominadas de nanocristais de celulose.

4.2.1 Materiais

- Membranas de Celulose tratadas;
- Ácido Sulfúrico 64% (H_2SO_4);
- Água destilada;
- Álcool Etílico;
- Hidróxido de Sódio 25% (NaOH).

4.2.2 Equipamentos

- Balão de fundo redondo

- Balão volumétrico
- Banho de óleo
- Barra magnética
- Béquer
- Centrífuga
- Estufa
- Liofilizador
- Proveta
- Termômetro
- Microscópio de luz polarizada
- Microscópio eletrônico de varredura.
- Ressonância magnética nuclear.
- Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier

4.2.3 Método

4.2.3.1 Preparação das membranas

As membranas de celulose bacteriana foram tratadas até pH próximo de 7,0 e secas em estufa a 60 °C. Posteriormente foram colocadas em um béquer com água destilada deixando hidratar por uma hora e depois as membranas foram cortadas em pequenos pedaços.

4.2.3.2 Produção de nanocristais de celulose (NCW) por hidrólise ácida

Em um balão de fundo redondo foram adicionados o ácido sulfúrico 64% (a proporção de ácido sulfúrico adicionada na reação deve ser equivalente a 0,5 g de membranas secas para 30 mL de H₂SO₄ - 64 %), e as membranas cortadas, depois colocadas em banho de óleo, previamente aquecido a 45 °C com agitação por 45 minutos. Neutralizou-se a solução resultante com NaOH 25 % e o produto foi precipitado com álcool etílico gelado, em uma proporção de 1:3, centrifugado e o precipitado formado foi dialisado. Finalmente o material foi seco a

temperatura ambiente. O filme reconstituído foi analisado por espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR), microscopia óptica de luz polarizada (MOLP), microscopia de força atômica (MFA) e análise termogravimétrica (ATG/DTG).

4.3 SUCCINILAÇÃO DE NANOCRISTAIS DE CELULOSE (NCW-SC)

A reação de succinilação do NCW foi realizada segundo metodologia descrita por Ribeiro-Viana et al. (2016) com modificações. Para esta reação foram adicionadas em um balão 0,028 g do NCW com 0,0080 g de anidrido succinico (II), 5 mL de diclorometano (III) e 200 μ L de piridina (IV). A reação ocorreu a 70°C com refluxo por 16 horas. Após este tempo, o material foi lavado com água e centrifugado três vezes e finalmente seco à temperatura ambiente. O filme reconstituído foi analisado por FT-IR, MOLP, MFA e ATG/DTG.

4.4 FUNCIONALIZAÇÃO DE NANOCRISTAIS DE CELULOSE SUCCINILADA (NCW-CO)

Para a funcionalização do NCW-sc, foram adicionados em uma placa de petri 4 mg de NCW-sc, 9,5 mg de EDC, 6 mg de NHS e 8 mL de água destilada. Após uma hora, foi retirado o sobrenadante e adicionado sobre o NCW-sc uma solução aquosa de colágeno hidrolisado (8 mL - 250 mg/mL). Esta mistura foi agitada por 15 horas e o resíduo lavado com água e centrifugado três vezes e finalmente seco à temperatura ambiente. O filme reconstituído foi analisado por FT-IR, MOLP, MFA e ATG/DTG.

4.5 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOCRISTAIS DE CELULOSE (NCW, NCW-sc, NCW-CO)

4.5.1 Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FT- IR)

Para a espectroscopia de absorção na região do infravermelho foram realizadas análises diretamente dos filmes reconstituídos ou do material

incorporado em pastilha de KBr. Os espectros foram obtidos em espectrofotômetro Bomem, modelo MB com uma resolução de 4 cm^{-1} .

4.5.2 Microscopia óptica de luz polarizada (MOLP)

Para obter as imagens de microscopia óptica de luz polarizada, foram depositadas as amostras líquidas no disco de quartzo de ouro, deixando secar para formação do filme, utilizando microscópio óptico marca LABOMED, modelo Lx-400, em aumento de 20x e entre polarizadores cruzados a 90° .

4.5.3 Microscopia de força atômica (MFA)

As imagens de topografia e gradiente de capacitância (dC/dz), os mapas dos compósitos dos nanocristais de celulose foram obtidos FlexAFM em um microscópio de força atômica (Nanosurf), usando um PPP-EFM (Nanosensores) Si sonda Ptlr revestido, com constante de elasticidade de $2,8\text{ N m}^{-1}$ e com frequência de ressonância em 75 kHz.

4.5.4 Análise termogravimetria (TGA/DTG)

A estabilidade térmica dos nanocristais de celulose foram avaliadas por termogravimetria em um equipamento Shimadzu TGA-50. As amostras foram aquecidas em panelas de alumina abertas com taxa de aquecimento constante de $20\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$, a partir de 30 a $600\text{ }^\circ\text{C}$, sob atmosfera inerte com fluxo de nitrogênio. Em média, a massa de amostra utilizada nas análises de TG foram 5 mg.

4.5.5 Quantificação do Colágeno Funcionalizado em NCW-Co

A quantificação do colágeno foi realizada pelo método de Bradford, para a preparação do reagente de Bradford, dissolveu-se 50 mg de Coomassie

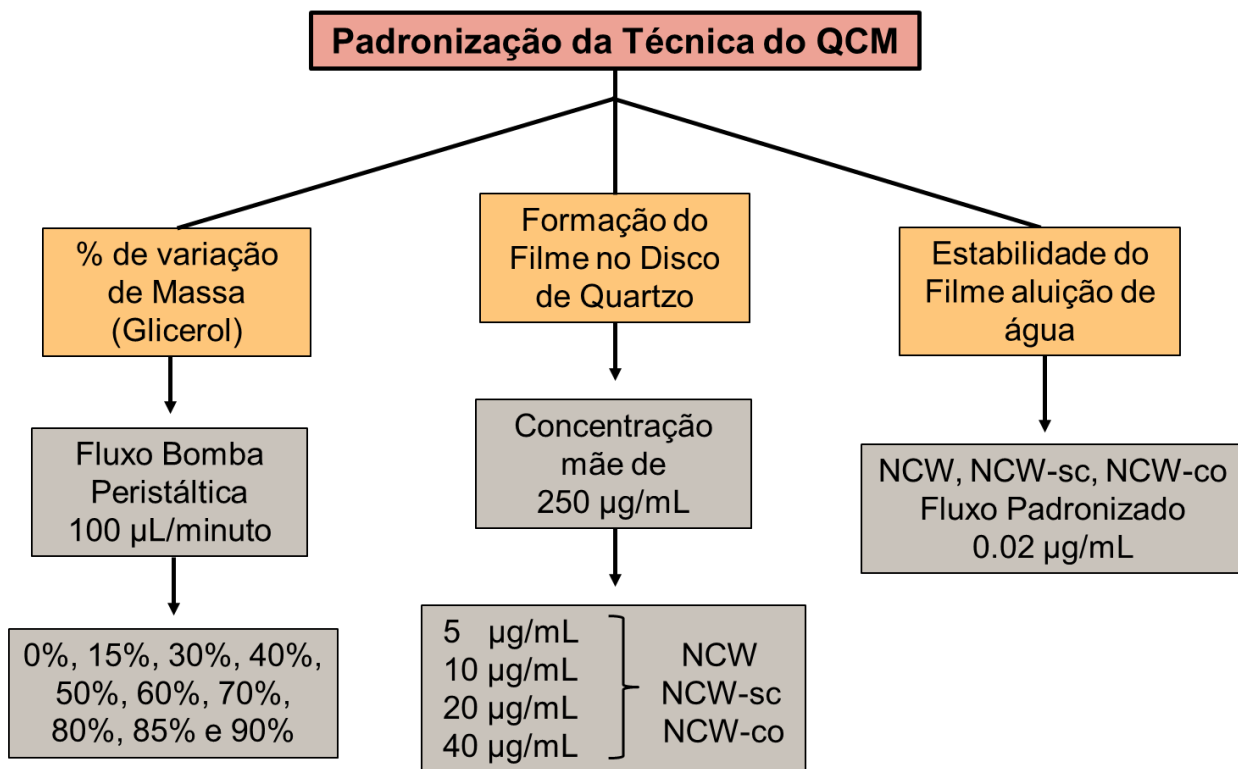
Brilliant Blue - G-250 em 25 mL de etanol 95% e, em seguida, adicionou-se 500 mL de ácido fosfórico concentrado, completando o volume para 100 mL com água destilada. A solução obtida foi filtrada em papel de filtro, diluída 5 vezes e acondicionada na geladeira até o momento do uso. A solução tampão continha 5,0 g de Cloreto de Sódio, 0,2 g de Cloreto de Potássio, 1,15 g de Fosfato Dissódico e 0,2 g de Fosfato Monopotássico, resultando em uma concentração de 0,015 M/L e pH 7,3. A solução padrão utilizada foi a soro albumina bovina (1 mg/mL).

Foram testadas concentrações de 0,833 $\mu\text{g/mL}$ até 250,0 $\mu\text{g/mL}$, para concentrações inferiores ao ponto tres, que corresponde a 25 $\mu\text{g/mL}$, foram realizadas duas diluições apartir dele, sendo o ponto um diluído 1:30 e o ponto dois 1:20. Nos tubos de ensaio, foram adicionadas 1 mL do reagente de Bradford diluído, após a adição da solução tampão e do padrão. Por fim, os tubos foram agitados, deixados em repouso por 5 minutos e realizadas leituras de absorbâncias em 595 nm.

4.6 OPERAÇÃO DO QCM PARA PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA

Os métodos desenvolvidos para padronização da técnica, foram realizados de acordo com o fluxograma da Figura 9, que descreve um esquema geral e simplificado das etapas envolvidas.

Figura 9 - Fluxograma esquemático da padronização da técnica do QCM



Fonte: Propria do autor (2016)

4.6.1 Estudo da Resposta de Parâmetros de QCM em Relação ao Aumento da Massa Depositada Sobre o Disco

Para obter a curva da concentração de massa foram, as medidas foram realizadas no equipamento QCM200 com cristal de 5 MHz e bomba peristáltica com fluxo de 100 µL/minuto. Foram estudadas diferentes concentrações de glicerol 0%, 15%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85% e 90%, cada uma das concentrações até estabilizar, para evidenciar a variação da massa relativa e a viscosidade do meio.

4.6.2 Descrição da Formação de Filme Sobre o Disco de QCM

Para cada um dos nanocristais de celulose (NCW, NCW-sc e NCW-co) foi pesado 1 mg e suspenso em 4 mL de água destilada, posteriormente

fragmentado por submersão durante 20 minutos no ultrasonicador para obter solução homogênea com uma concentração mãe de 250 µg/mL. Dessa solução foram testadas para análises diferentes concentrações 5 µg/mL, 10 µg/mL, 20 µg/mL e 40 µg/mL, de cada um dos nanocristais de celulose. De cada solução foi colocado 500 µL/mL sobre o disco de quartzo ocupando quase toda a área do disco, e deixando secar entre 15 - 20 minutos em estufa a 110 °C, formando assim o filme.

4.6.3 Estudo de Estabilidade de Filme de NCW com Água

Uma vez depositadas as diferentes concentrações no disco, foi testada a estabilidade do filme em água, em uma primeira etapa onde o fluxo foi de 100 µL/minuto e posteriormente foi padronizado para um fluxo constante de 0,02 µL/minuto. Após estabilização da curva de saturação, deixou-se durante 20 minutos confirmando estabilidade do filme no disco.

4.7 MONITORAMENTO DA REAÇÃO DE FUNCIONALIZAÇÃO DO NCW-CO POR QCM

No monitoramento em tempo real da reação de funcionalização de NCW-co, as medidas foram realizadas no equipamento QCM200 com cristal de 5 MHz e bomba de seringa SP-UNK-2014, com fluxo padrão de 0,020uL/minuto. Foram estudadas diferentes concentrações para cada um dos nanocristais de celulose (NCW, NCW-sc e NCW-co) 5 µg/mL, 10 µg/mL, 20 µg/mL e 40 µg/mL, sendo cada uma analisada no QCM, começando com o NCW, após estabilização com ar, foi adicionada água aumentando sua massa e deixando estabilizar novamente, posteriormente foram analisadas todas as concentrações de NCW-sc, adicionando o ativador (EDC-NHS), e finalmente o NCW-co utilizando o mesmo procedimento para todas as concentrações, evidenciando as diferentes reações.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Esta seção foi dividida em cinco etapas: 1) produção da CB; 2) caracterização da CB; 3) produção de nanocristais de celulose (NCW, NCW-sc, NCW-co); 4) caracterização de nanocristais de celulose (NCW, NCW-sc, NCW-co) e 5) estudo por QCM do monitoramento da reação de funcionalização com colágeno hidrolisado do NCW-sc.

5.1 PRODUÇÃO DE CELULOSE BACTERIANA EM FERMENTAÇÃO ESTÁTICA

A produção de celulose em fermentação estática foi realizada em meio glucose 4% tamponada em um período de 2 a 10 dias mantida à temperatura de 28°C, segundo materiais e métodos, resultando na produção de filmes de celulose que puderam ser retirados manualmente, como apresentada na Figura 10. Houve a formação de filmes entre a superfície líquido/ar conforme observado por Jonas e Farah (1998). A membrana após ser removida do meio foi tratada com NaOH 2%, por 24h a temperatura ambiente e lavada com água destilada para remoção de resíduos celulares. Uma vez limpa foi seca para posteriores análises de caracterização (JONAS; FARAH. 1998)

Figura 10 - Filme de celulose bacteriana produzida em meio glucose 4% estático



É apresentada fotografia da membrana obtida após 10 dias de fermentação estática. Pode-se verificar que o aspecto que da membrana

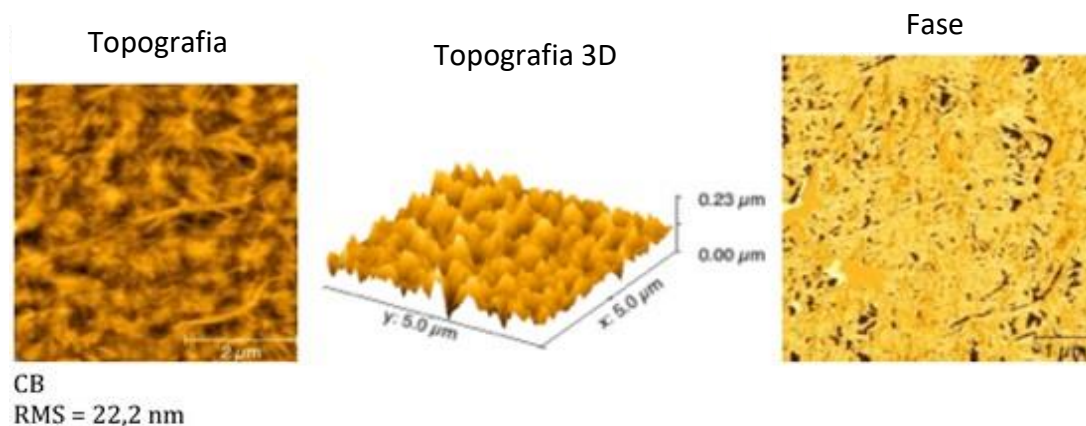
apresentada é bastante gelatinoso e é necessário referir que as membranas obtidas não eram totalmente lisas e uniformes.

5.2 CARACTERIZAÇÃO DA CELULOSE BACTERIANA

5.2.1 Microscopia de Força Atômica (MFA)

A microscopia de força atômica tem sido utilizada largamente no estudo de polímeros (JANDT, 1998), fornecendo imagens da superfície dos materiais, se tornando em um dos equipamentos mais completos para estudo de materiais em micro e nano escala. Esta técnica utiliza uma sonda de silício que oscila em sua frequência natural de ressonância, sobre a superfície de uma amostra tocando-a periodicamente. No decorrer de uma varredura a produção das imagens ocorre devido as variações na interação entre a sonda e a amostra ocasionada pelas mudanças na frequência, amplitude e fase da vibração da sonda (COSTA; RIPPEL; GALEMBECK, 2002), seu princípio fundamental é a medida das deflexões de um suporte (de 100 a 200 mm de comprimento) cuja extremidade livre está montada a sonda. Estas deflexões são causadas pelas forças que agem entre a sonda e a amostra. A técnica, permitiu a observação física da topografia exata da microestrutura, como apresentada na Figura 11. À medida que ocorre a varredura na frequência de oscilação da sonda, vales e picos foram desenhados em função da morfologia das celulosas estudadas. Através destas micrografias foi possível diferenciar com nitidez o produto formado pelo processo fermentativo, observou-se a presença de microfibras de comprimento não elevado, paralelos e não paralelos formando um emaranhado compacto sem poros visíveis no meio estático. Com utilização das imagens de MFA, obteve-se o mapeamento topográfico 3D e planialtimétrico do material estudado, apresentando informação da morfologia em relação á rugosidade da amostra, com valores de RMS: 22,2 nm e com uma altura de 0,23 μm , da superfície da membrana. Estes resultados foram consistentes com os encontrados na literatura (DAMMSTRÖM 2005; CAO et al., 2010; DAMASIO, 2015).

Figura 11 - Micrografias de contraste de altura por MFA das fibras de celulose produzidas por *G. xylinus* em meio glucose em fermentação estática

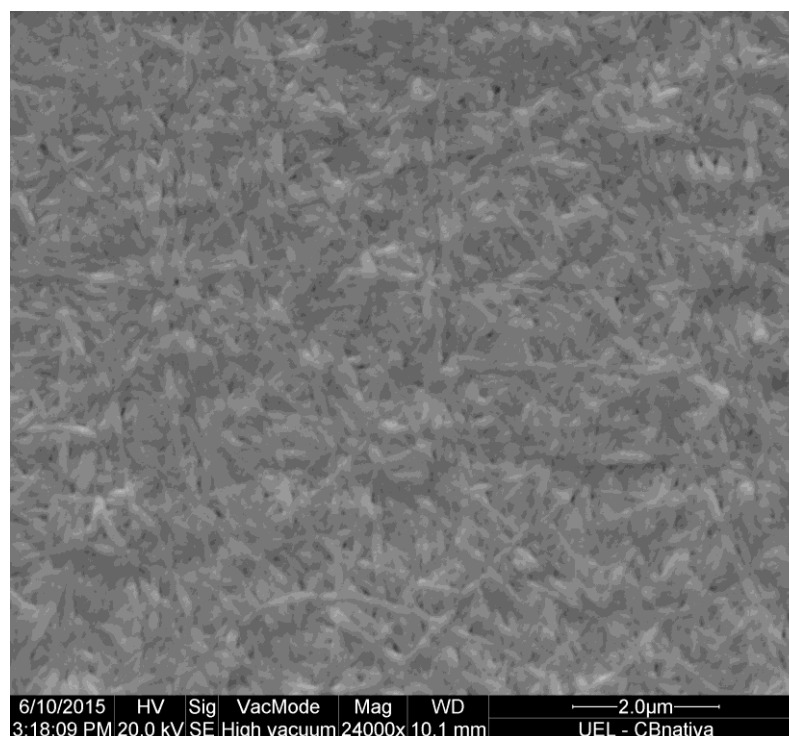


5.2.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) é uma das técnicas mais usadas para analisar e explicar corretamente os fenômenos que ocorrem na escala micrométrica, pois permite observar aumentos muito superiores ao da microscopia óptica (até 900.000 vezes de aumento). Em relação à CB a MEV consegue revelar com qualidade a microestrutura da membrana (GOELZER et al., 2009). O princípio da MEV consiste em utilizar um feixe de elétrons de pequeno diâmetro para explorar a superfície da amostra, ponto a ponto, por linhas sucessivas e transmitir o sinal do detector a uma tela catódica cuja varredura está perfeitamente sincronizada com aquela do feixe incidente. A técnica utiliza um feixe de elétrons, no lugar de fótons, utilizados em um microscópio óptico convencional, o que permite solucionar o problema de resolução relacionado com a fonte de luz branca (DEDAVID; GOMES; MACHADO, 2007). A MEV é um dos mais versáteis instrumentos disponíveis para a observação e análise de características microestruturais de objetos sólidos. A principal razão de sua utilidade é a alta resolução que pode ser obtida quando as amostras são observadas; valores da ordem de 2 a 5 nm são geralmente apresentados por instrumentos comerciais, enquanto instrumentos de pesquisa avançada são capazes de alcançar uma resolução melhor que 1 nm (NAGATANI et al., 1987; MALISKA, 2006).

Com a técnica foram obtidas micrografias de CB após 10 dias de cultivo em meio estático, a membrana foi formada por microfibras entrelaçadas de forma compacta, como apresentado na Figura 12, com aumento de 24.000 vezes foi observada as fibras de CB. Nesta análise, foi possível observar que as micrografias apresentam estruturas reticuladas, entrelaçadas randomicamente (rede bem interligada com a presença de pequenos poros.) que é a estrutura típica esperada para a celulose produzida por *G. xylinus* em fermentação estática. A estrutura da rede randômica e suas microfibras apresentam diâmetro nanométrico, semelhantes as micrografias descritas na literatura (WOJCIECH et al. 2004; JEON et al., 2010; SHEYKHNAZARI et al., 2011; CASTRO et al., 2012; GU; CATCHMARK, 2012; ZHONG, 2013; LIMA, 2014; LOPES et al., 2014).

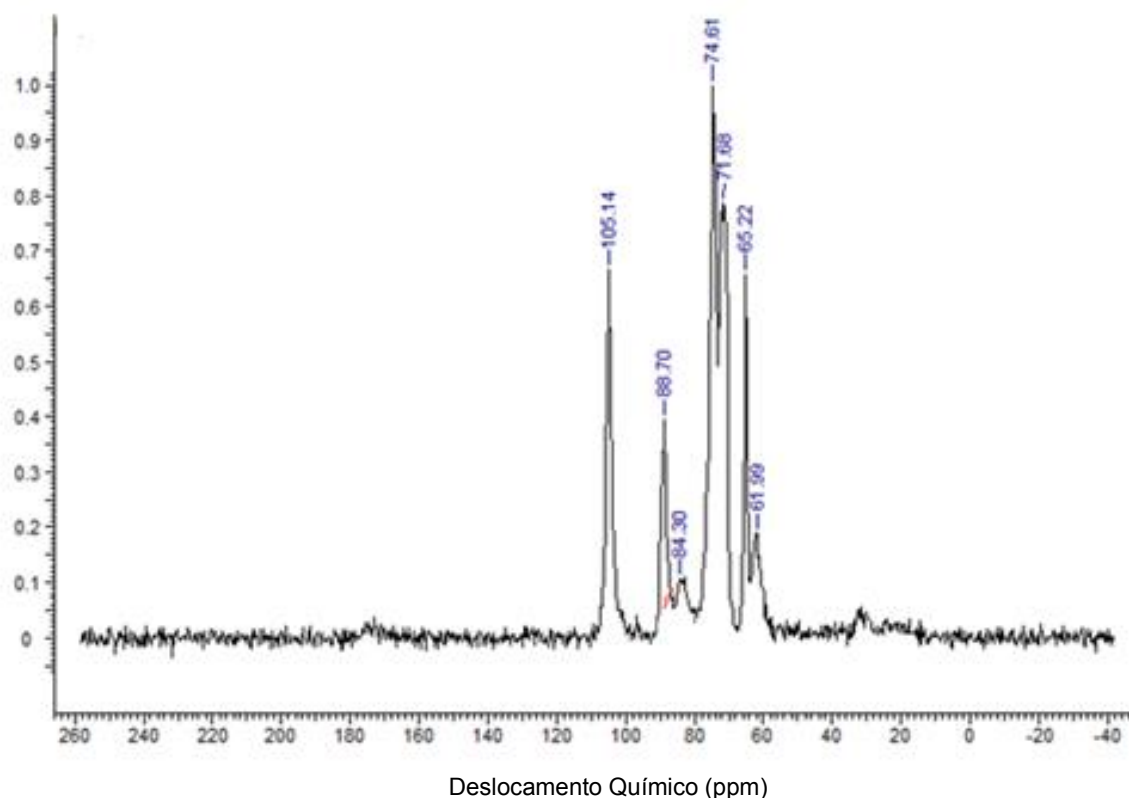
Figura 12 - Microscopia eletrônica de varredura da celulose bacteriana produzida por *G. xylinus* em meio glucose estático



5.2.3 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

A técnica RMN é utilizada para determinar estrutura tridimensional de biopolímeros e estruturas supramoleculares. É uma técnica de espectroscopia nuclear utilizada em vários ramos da ciência, na qual os núcleos, ao absorverem e emitirem radiofrequência, revelam seus espectros característicos. A aplicação da RMN na caracterização de celuloses em estados sólidos e líquidos cresceu nas décadas passadas. Isto, devido aos átomos de carbono dos grupos funcionais que contêm o oxigênio (como a carbonila e o aldeído) e substitutos do anel aromático que podem ser observados (PANTZE, 2006).

As membranas de celulose bacteriana produzidas foram analisadas por ^{13}C CP-MAS-RMN 400 MHz (δ , PPM) apresentando deslocamentos químicos característicos para a mesma, como apresentados na Figura 13, é possível observar os deslocamentos em ^1C (102 - 108 ppm) sinal anomérico, ^4C (81 - 93 ppm) cristalino e amorfo e ^6C (60 - 70 ppm), bem como um conjunto de ressonâncias atribuídas aos carbonos ^2C , ^3C e ^5C (73 - 79 ppm) da unidade de anidroglicose (RONDEAU-MOUR; BIZOT; BERTRAND, 2011). Os sinais químicos obtidos exibem uma mistura de celulose tipo I α e tipo I β . Estes resultados foram consistentes com os encontrados na literatura (PERIN de MELO, 2007; OLIVEIRA, 2013; FARIA-TISCHER et al., 2015; MARTINEZ-SANZ et al. 2016). As caracterizações dos materiais obtidos são essenciais para que se façam suposições e/ou afirmações sobre o comportamento e características destes.

Figura 13 - Espectro de RMN de ^{13}C da celulose bacteriana

5.2.4 Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FT-IR)

A FT-IR é indicada para identificar um composto ou investigar a composição de uma amostra, fornecendo evidências da presença de vários grupos funcionais, nas estruturas orgânicas em membrana de celulose bacteriana (MCB) e nanocristais de celulose (NCW), como apresentadas na Tabela 2. Isto devido à interação das moléculas ou átomos com a radiação eletromagnética, em um processo de vibração molecular. Uma vantagem desta técnica é a possibilidade de analisar amostras sólidas e determinar qualitativamente ésteres (YANG et al., 2007; RIBEIRO-VIANA, 2016). A técnica de FT-IR é também sensível aos padrões de ligações de hidrogênio que fornecem coesão à cadeia de empacotamento (LOPES et al., 2014).

Tabela 2 - Bandas características na análise de FT-IR

Celulose	Número de onda CB (cm ⁻¹)	Atribuição	Referencia
NCW	1185 – 1420	(R-O-SO ₂ -O-R') Sulfatos	BARBOSA, 2007
MCB-su	1730 - 1735	(C=O) Éster e Ácido	RIBEIRO-VIANA, 2016
MCB-co	1640 - 1655	(N-C=O) Carbonil Amida	RIBEIRO-VIANA, 2016

Fonte: Propria do autor (2016)

O espectro vibracional na região de infravermelho para amostra de CB está representado na Figura 14. Pode-se observar várias bandas relevantes características de CB, relacionadas com O-H, CH₂, C(O-H), C-O, C-OH, apresentadas na Tabela 3. Estas amostras seguem o perfil característico relatado na literatura (SANZ; RUBIO; LAGARON, 2011; ASHORI et al., 2012; LIMA, 2014; LOPES et al., 2014; YING et al., 2014; FENG et al., 2015).

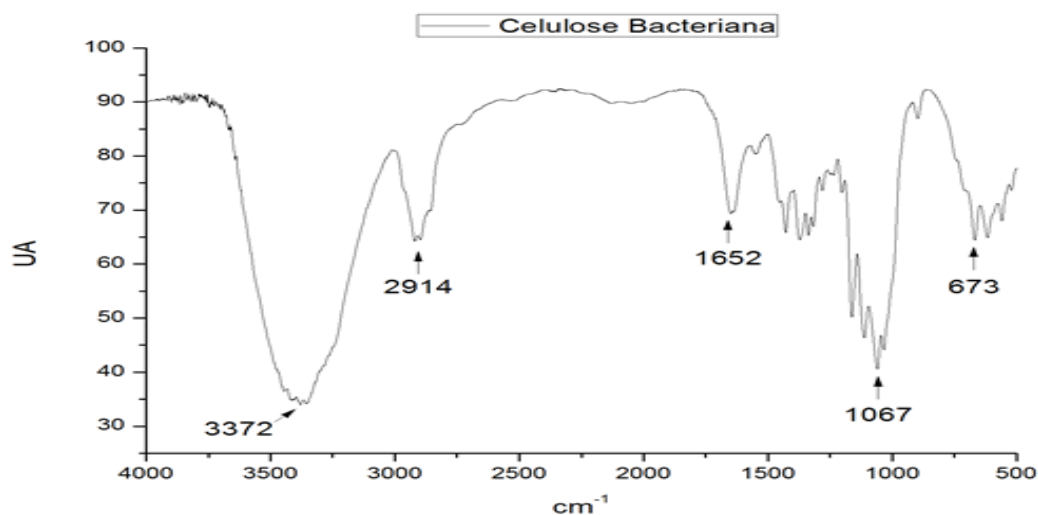
Figura 14 - Espectro vibracional infravermelho de membrana de celulose bacteriana

Tabela 3 - Bandas características para celulose bacteriana na análise de FT-IR

Número de onda CB (cm ⁻¹)	Atribuição
3345	(O-H) - celulose I
2860 – 2930	(CH ₂)
1635 – 1645	C(O-H) - Água absorvida
1425 – 1435	HCH, OCH
1358 – 1375	CH
1146 – 1160	(C-O-C, CH)
1111	(C-C) – Anel (Polissacarídeos, Celulose)
1046	(C-O) C-OH Carbodratos
870 – 900	(C-H)
665 – 70	(C-OH)

Fonte: Geat et al. (2011)

5.2.5 Difractometria Raios-X (DRX)

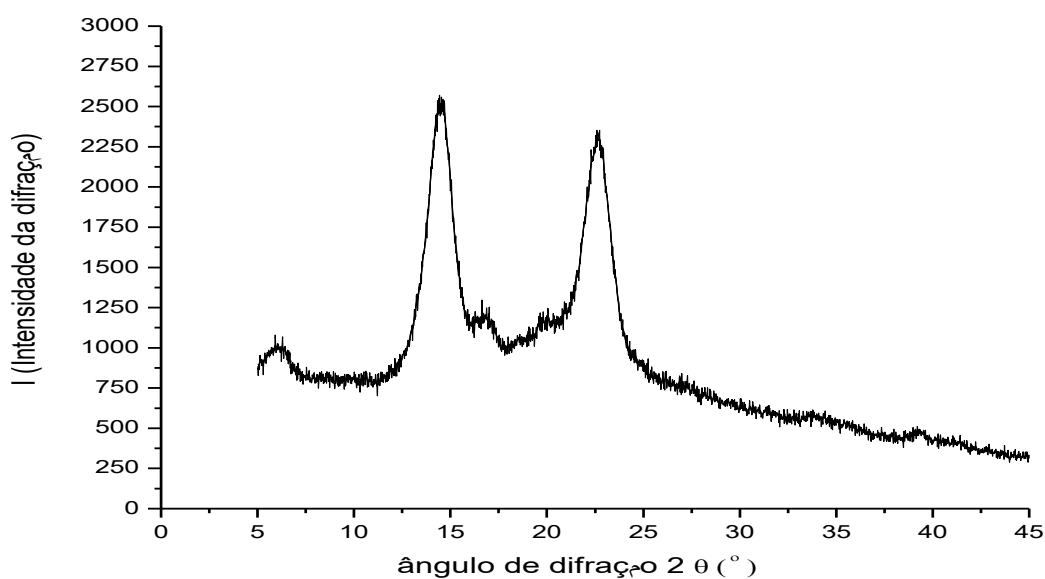
Outra técnica que auxilia na caracterização da celulose é a difração de raios-X, que é utilizada para obtenção de características importantes sobre a estrutura do composto. Os Raios-X, são radiações eletromagnéticas que, como tais, podem ser polarizadas, difratadas, refratadas ou refletidas. A difração destes raios pelos cristais resulta de um processo em que os raios-X são dispersos pelos elétrons dos átomos, sem mudança de comprimento de onda. A difração resultante de um cristal, compreendendo posições e intensidades das linhas de difração, é uma propriedade física fundamental da substância, servindo não só para a identificação como também para o estudo da estrutura (GOMES; DUTRA, 1984).

As amostras de celulose foram submetidas a esta análise e exibiram perfil similar a de celulose tipo I, como apresentado na Figura 15. No gráfico de difração o indicativo da presença de celulose cristalina do tipo I é a ocorrência de picos em $2\theta = 14, 16$ e $22,6^\circ$, são atribuídos à CB em cultura estática (LANDIN et al., 1993; BARUD et al., 2008; RETEGI et al., 2010). De acordo com a análise

a membrana de celulose apresentou um índice de cristalinidade (IC) de 66,7% que em membrana de CB pode variar de 50 a 90%. Estes resultados foram consistentes com os encontrados na literatura (SEGAL et al., 1959; WOJCIECH; ROMANOVICZ; BROWN,2004; BARUD et al., 2007; GOELZER et al., 2009; GOMES et al., 2013; POLETO; PISTOR; ZATTERA, 2013; FARIA-TISCHER et al., 2015; SANTOS et al., 2015)

Na produção de CB em forma de filme é importante optar pelas melhores condições de fermentação que mantenham uma elevada porcentagem de cristalinidade da CB, característica diretamente com sua resistência mecânica (PECORARO et al., 2008).

Figura 15 - Espectro de difração de raios-X da celulose bacteriana produzida no meio glucose 4 % pelo método estático



5.3 PRODUÇÃO DE NANOCRISTAIS DE CELULOSE (NCW, NCW-SC, MCW-CO)

5.3.1 Produção de Nanocristais de Celulose (NCW)

Para a obtenção de nanocristais de celulose por hidrólise ácida, foram testados diferentes tempos de reação 15, 30 e 45 minutos. Os tempos de 15 e

30 minutos apresentaram fibras perceptíveis a olho nú, com pedaços de membranas. Desta forma foram utilizados somente os materiais produzidos após 45 minutos de hidrólise, como apresentados na Figura 16. Esta técnica se apóia no fato que as regiões cristalinas são insolúveis em ácidos, devido a sua alta organização, assim, o isolamento dos nanocristais é facilitado pela cinética de hidrólise mais rápida, apresentada pelas regiões amorfas que são naturalmente desorganizadas, em relação às regiões cristalinas (SAMIR; ALLOIN; DUFRESNE, 2005). As principais variações encontradas na literatura para a obtenção de nanocristais de celulose fazem referência à concentração do ácido, tempo, temperatura e a relação ácido/celulose (SILVA et al., 2011).

Também é importante ressaltar que a obtenção de nanocelulose não depende somente da hidrólise, senão também, do processo de obtenção da celulose, como é o caso da fermentação estática, que permite obter uma celulose com alto IC. Os cristais de celulose formados através de hidrólise ácida controlada vêm sendo aplicados visando aumento das propriedades mecânicas, ópticas e elétricas de diversos materiais nas diferentes indústrias (LENGOWSKI et al., 2013).

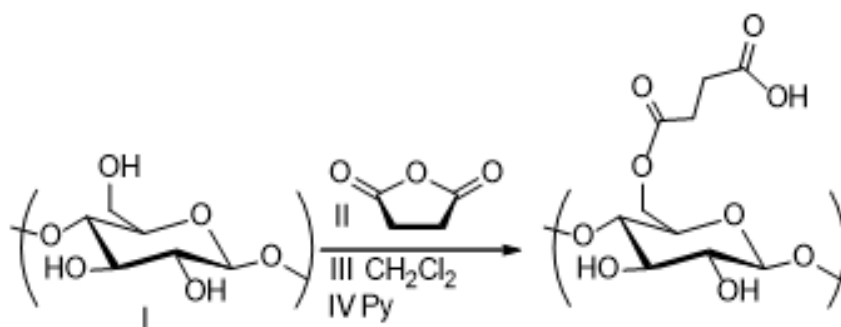
Figura 16- Nanocristais de celulose produzido após 45 minutos de hidrólise ácida



5.3.2 Reação de Succinilação nos Nanocristais de Celulose (NCW-sc)

A reação de succinilação dos NCW ocorreu utilizando-se anidrido succínico em presença de piridina e diclorometano sob refluxo, como apresentado na Figura 17. O sucesso da reação foi confirmado pelas análises dos seus espectros no FT-IR, outras caracterizações deste material também foram realizadas, como MFA, MOLP e TGA/DTG.

Figura 17- Reação de succinilação do NCW

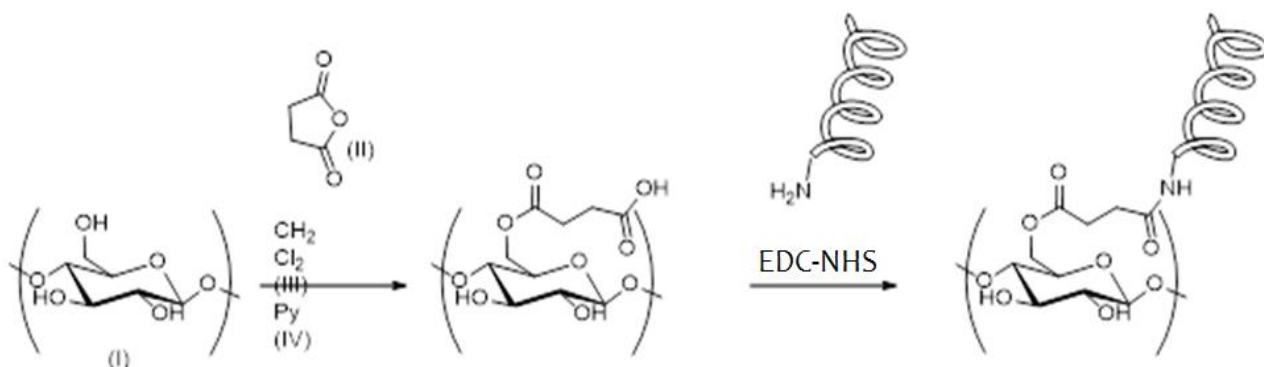


Fonte: Gentilmente cedida por Renato Ribeiro-Viana, 2016

5.3.3 Funcionalização do Nanocristal de Celulose Succinilado (NCW-co)

A reação de acoplamento do colágeno a NCW-sc se deu em presença dos reagentes EDC-NHS em água. Nestas condições, as carbonilas dos ácidos carboxílicos pendentes na superfície são ativadas pelos reagentes de acoplamento EDC-NHS e posteriormente sofrem ataque dos grupos amino livre presentes na estrutura do colágeno, formando assim ligações do tipo amida e prendendo-o covalentemente à estrutura da nanocelulose como apresentada na Figura 18. O sucesso da reação foi confirmado pelas análises dos seus espectros no FT-IR, outras caracterizações deste material também foram realizadas, como AFM, MOLP e TGA/DTG.

Figura 18 - Funcionalização do NCW-sc

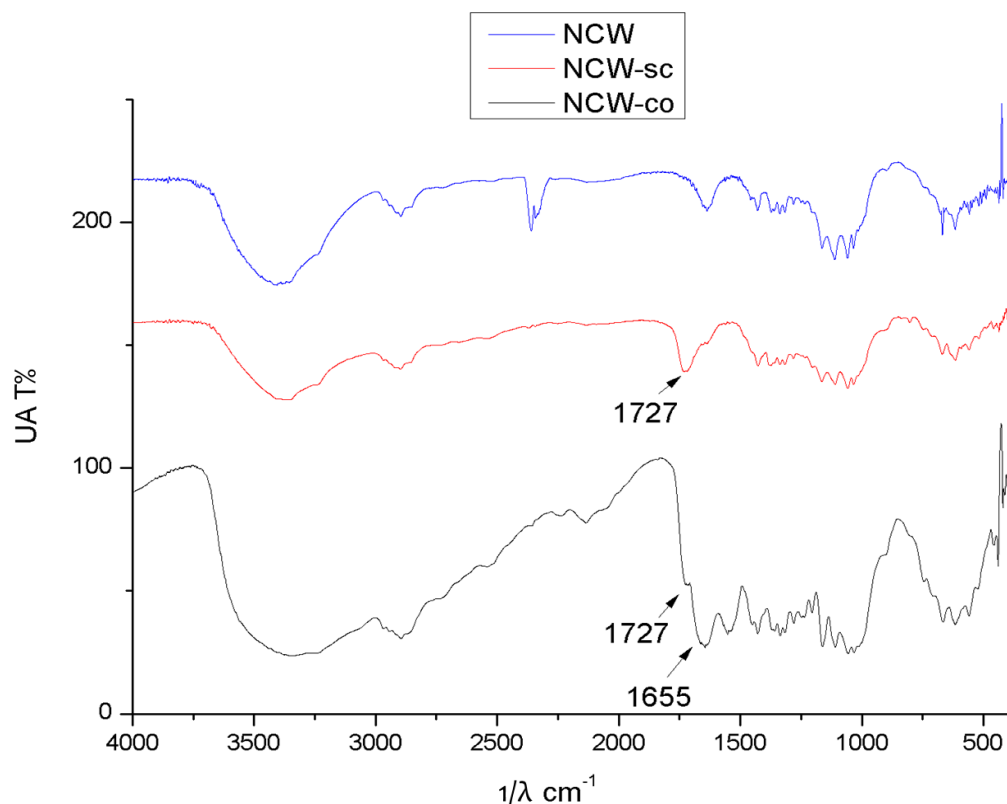


Fonte: Gentilmente cedida por Renato Ribeiro-Viana, 2016

5.4 CARACTERIZAÇÃO DE NANOCRISTAIS DE CELULOSE (NCW, NCW-sc, NCW-co)

5.4.1 Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FT-IR)

Nos espectros avaliados apresentados na Figura 19, pode-se observar que o espectro para NCW foi bastante similar ao observado anteriormente na Figura 14, uma vez que se trata de materiais originados de um mesmo polímero-base (celulose bacteriana). Estiveram presentes as bandas típicas características deste biopolímero, como 3348 (O-H), 2901 (C-H alifático), 1045 (C-O). As amostras succiniladas NCW-sc, mostraram mudanças significativas, acrescentando as informações já obtidas do NCW, além das bandas típicas já descritas, apresentou-se em destaque a banda em 1727 (C=O éster e ácido), pelas adições do n-(3-dimetilainopropil)-n-etilcarbonamida hidro-clorida – n-hidroxisuccinamida (EDC-NHS), indicando a presença do ligante. E finalmente as amostras funcionalizadas NCW-co, agregaram informações particulares pelas modificações introduzidas, os espectros das amostras funcionalizadas apresentaram bandas referentes a outra molécula orgânica introduzida (proteína), em destaque 1655 N-C=O carbonil amida. Observou-se que a banda 1727 diminuiu, isto é, devido a que os grupos ácidos foram substituídos pelo grupo amida da proteína. Estes resultados foram consistentes com os encontrados na literatura (HSIEH, 2010; NETO et al., 2013; MOURA, 2014; FENG et al., 2015; RIBEIRO-VIANA; FARIA-TISCHER; TISCHER, 2016).

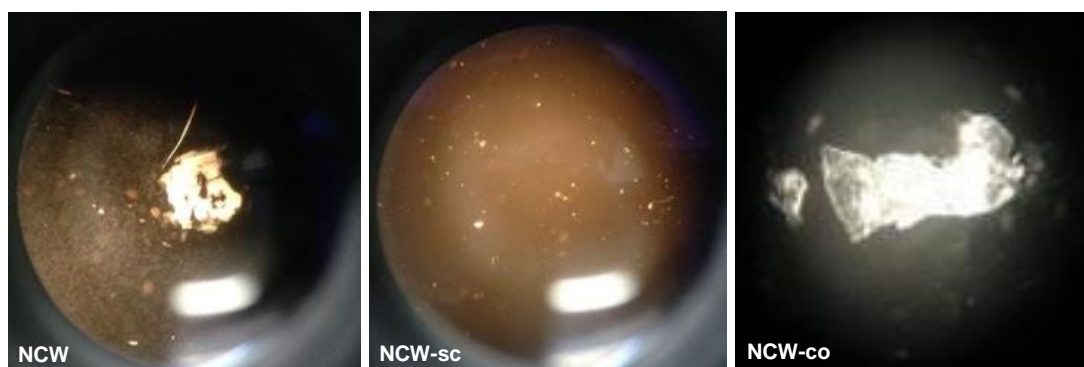
Figura 19 - Espectros vibracionais infravermelho dos nanocristais de celulose

5.4.2 Microscopia Óptica de Luz Polarizada (MOLP)

A celulose é opticamente ativa e apresenta contribuições quirais que podem ser observadas por diferentes técnicas, como por exemplo microscopia de luz polarizada. Nanocristais de celulose têm um empacotamento helicoidal o que gera uma capacidade de rotação da luz polarizada refletindo-a em comprimentos de onda bem específicos, ou seja, com cores bem definidas dependendo do ângulo de visualização. Estes filmes podem ter importantes aplicações, incluindo cheques, cédulas e passaportes, bem como novos pigmentos para recobrimentos de materiais e tintas (BORSALI, 2004). Como é apresentada na Figura 20, o comprimento de onda após a evaporação se torna colorido (SANTOS, 2012). Esta intensidade de reflectância e sua cor dependem da uniformidade da orientação da fase quiral, que pode ser obtida facilmente sujeitando a amostra a um campo magnético intenso. Neste caso, cada amostra ficou entre dois filtros polarizados, de maneira que a luz orientada do primeiro

filtro foi desviada pelo filme de NCW com alterações na cor refletida. É possível observar que NCW e NCW-co se organizam em membranas com variação na reflexão observada pela mudança de cor dos mesmos, de acordo com o ângulo de incidência da luz polarizada. NCW-sc não foi capaz de se auto-organizar em membranas permanecendo como partículas com baixo dicroísmo.

Figura 20 - Micrografias ópticas dos nanocristais de celulose

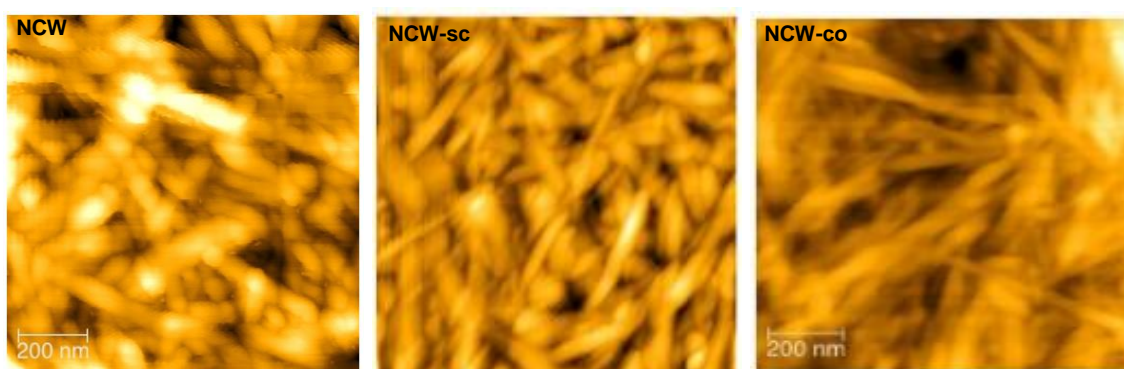


5.4.3 Microscopia de Força Atômica (MFA)

A morfologia dos nanocristais foi investigada por microscopia de força atômica, a micrografia é apresentada na Figura 21, a fim de visualizar os nanocristais com morfologia característica dos nanocristais, confirmando a formação deste nanomaterial (SANTOS, 2012; MORAES et al., 2016). Os nanocristais de celulose NCW, NCW-sc e NCW-co apresentam diâmetros e rugosidades diferentes. Diâmetros em torno de 37,4, 37,8 e 43,6 nm, respectivamente, e rugosidade em torno de 5,01 nm, 7,05 nm e 9,16 nm, respectivamente. Em comparação com NCW e NCW-sc, as fibras quase não se alteraram de tamanho, isto pode indicar que não houve variação na estrutura da celulose quando processada com ácido, já o NCW-co o apresentou um tamanho maior, isto é, devido à introdução do grupo amida no material. Com respeito a rugosidade, apresentaram mudanças entre os nanocristais de celulose, devido às alterações realizadas nos processos de succinilação e funcionalização apresentando polidispersividade de comprimento. Os nanocristais apresentaram

dimensões que foram consistentes com as dimensões já estabelecidas pelas normas Tappi para nanocristais. Estas amostras seguem o aspecto característico relatado na literatura (JEAN et al., 2008; SILVA et al., 2009; LAHIJI et al., 2010; ROSA et al., 2012; DUFRESNE; BELGACEM, 2013; BONADIO, 2014; SOUZA et al., 2015)

Figura 21 - Micrografias de contraste por microscopia de força atômica dos nanocristais de celulose

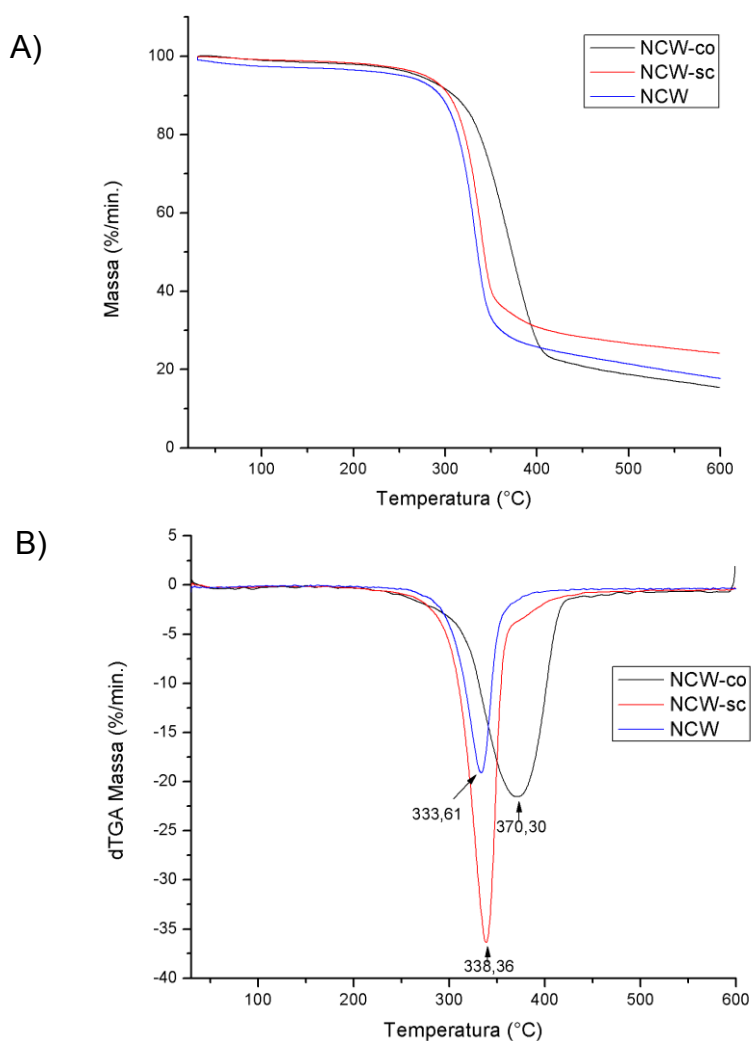


5.4.4 Análise Termogravimétrica (TGA/DTG)

A estabilidade térmica dos nanocristais de celulose, foi investigada por termogravimetria, os resultados estão apresentados nos gráficos da Figura 22a, e foram utilizadas para estimar a estabilidade térmica das amostras em termos de temperatura e degradação, as temperaturas de degradação máxima foram obtidas através da análise dos picos das curvas de termogravimetria derivada, como apresentada na Figura 22b. Dentre os principais processos de degradação pode ser destacado o começo da degradação, as análises mostraram uma degradação térmica de 10%, perto de 293,°C, 304,°C e 310,°C para NCW, NCW-sc e NCW-co respectivamente, também observou-se um único estágio de degradação com perda de massa em torno de 333,61°C, 338,36°C e 337,30°C para NCW, NCW-sc e NCW-co respectivamente, podendo ser estes corroborados nas curvas de DTG, isto é devido à decomposição dos nanocristais, através da despolimerização e decomposição das unidades glicosídicas. Comparando os

resultados obtidos pelos diferentes nanocristais, pode-se observar que a medida que o nanocristal foi modificado, apresentam maior resistência térmica. Resultados consistentes com os encontrados na literatura (SILVÉRIO et al., 2013; ORNAGHI JR. et al., 2014; BENINI, 2015; SILVA, 2015)

Figura 22 - Curvas termogravimétricas dos nanocristais de celulose.



5.5 ESTUDO POR QCM DO MONITORAMENTO DAS REAÇÕES DE SUCCINILAÇÃO DE NANOCRISTAIS DE CELULOSE (NCW-SC) E POSTERIOR FUNCIONALIZAÇÃO COM PROTEÍNA HIDROLISADA DO NANOWHISKER SUCCINILADO (NCW-CO)

Foram realizados ensaios preliminares para definir as condições ótimas para o monitoramento das reações de succinilação e funcionalização, estes

ensaios começaram a partir da escolha do material utilizado, os primeiros estudos envolveram a participação da membrana de CB nativa, foi colocado no disco de quartzo, membrana de CB com tempo de fermentação de 10 dias, deixado secar em estufa a 70 °C, ao utilizar este material foi observado que o equipamento do QMC não emitia resposta sobre variação de frequência nem resistência, isto deve-se possivelmente à espessura da membrana impedindo a análise das reações. Tentado diminuir a espessura da membrana foi utilizada membrana de CB com 7 dias de fermentação obtendo o mesmo resultado, o QMC não emiteu resposta sobre variação de frequência nem resistência, posteriormente a fermentação foi diminuída para 4 dias de fermentação, sem ter uma resposta diferente às fermentações de 10 e 7 dias. Mediante tais resultados foi decidido utilizar a CB em escala nanométrica através de hidrólises ácida. Uma vez produzido nanocristais de celulose (NCW), foram testadas várias concentrações desta para formação do filme no disco de quartzo, até obter a concentração ótima de 250 µg/mL, descrito anteriormente em materiais e métodos. Uma vez utilizado este material em nanoescala e definida sua concentração, foi conferida a detecção do equipamento para NCW, emitindo resposta sobre variação de frequência e resistência ao injetar as diferentes substâncias de análises (solução ativadora EDC-NHS e solução colágeno), permitindo observar em tempo real as reações de ativação do ácido succínico (NCW-sc) e funcionalização (NCW-co) dos respectivos materiais.

Outro ensaio preliminar foi a determinação do fluxo ótimo no QCM. É indispensável determinar um tempo adequado de interação entre o nanocristal e o ligante (processo de succinilação) e posteriormente o nanocristal succinilado e a proteína hidrolisada (processo de funcionalização), para obter em tempo real os sinais correspondentes às diferentes reações esperadas. Foi testado um fluxo de 1 mL/min, ao ser aplicado este fluxo, não foi possível observar resposta sobre variação de frequência nem resistência, posteriormente foi testado o fluxo de 0,05 mL/min, foi possível identificar uma leve variação de frequência e resistência, ao obter esta resposta foi decidido testar um terceiro fluxo de 0,02 mL/min para tentar aumentar esta resposta de variação e foi possível observar um aumento maior nas variações de resposta na frequência. Embora estes testes de fluxo estejam dentro da faixa recomendada nas especificações do QCM (0,02 – 5 mL/min) este sempre será determinado dependendo das

propriedades do material utilizado. Uma vez determinado o tipo de material e o fluxo ótimo, começaram os diferentes estudos da nanocelulose por QCM.

Para análise de QCM foi necessário padronizar a técnica no sentido de observar os seguintes parâmetros como:

- Formação do filme no disco com concentração ideal;
- Viscosidade e composição do meio que ajudou com a determinação de quantidade de massa depositada no disco;
- Estabilidade do filme no disco de quartzo (eluição de água - velocidade de fluxo aplicado).

5.5.1 Resposta do QCM a Variação da Viscosidade e Composição do Meio

Foi aferido o comportamento do cristal de quartzo em resposta a variações de concentração de glicerol 0%, 15%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85% e 90%, observado na Figura 23. Cada concentração foi deixada até estabilizar, evidenciando a variação da massa relativa e a viscosidade do meio. O comportamento foi como previsto na teoria, observado na Figura 24, para calibrar a técnica no QCM. O gráfico foi construído usando as respostas em resistência (R, ohms) gerada para cada concentração de glicerol.

Figura 23 - Resposta de resistência para o aumento da concentração de glicerol eluído a través do QCM para a calibração da técnica

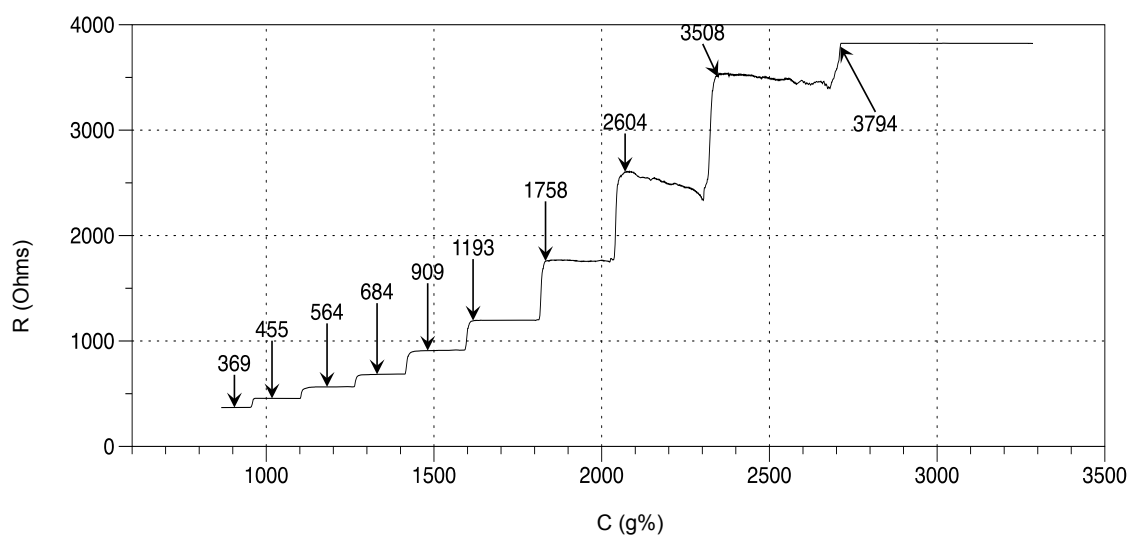
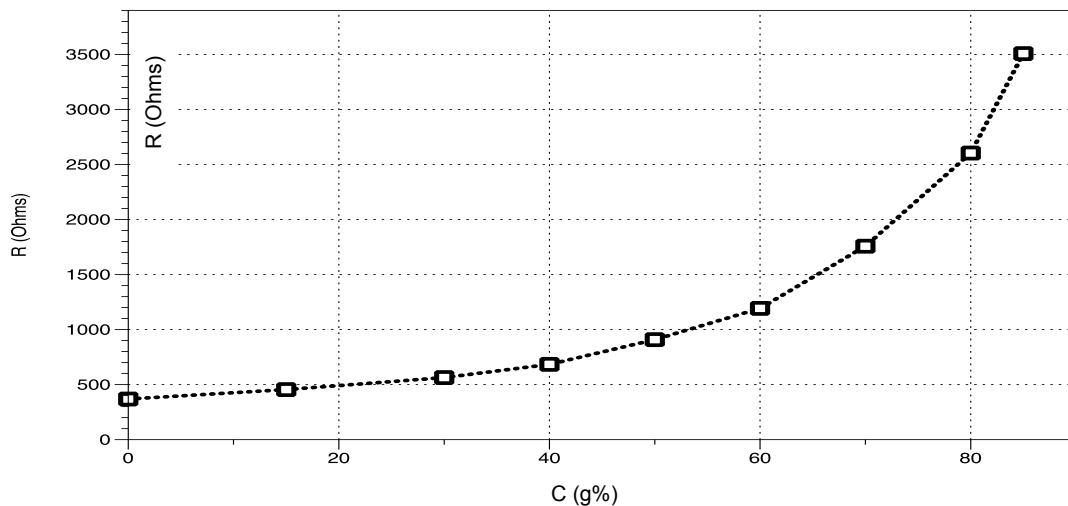


Figura 24 - Mudança de Frequência (Hz) e Desvio de Resistência (Ohms) em relação a percentagem do peso de glicerol (em água), como previsto na teoria, medida com QCM200 e 5 MHz do cristal polido

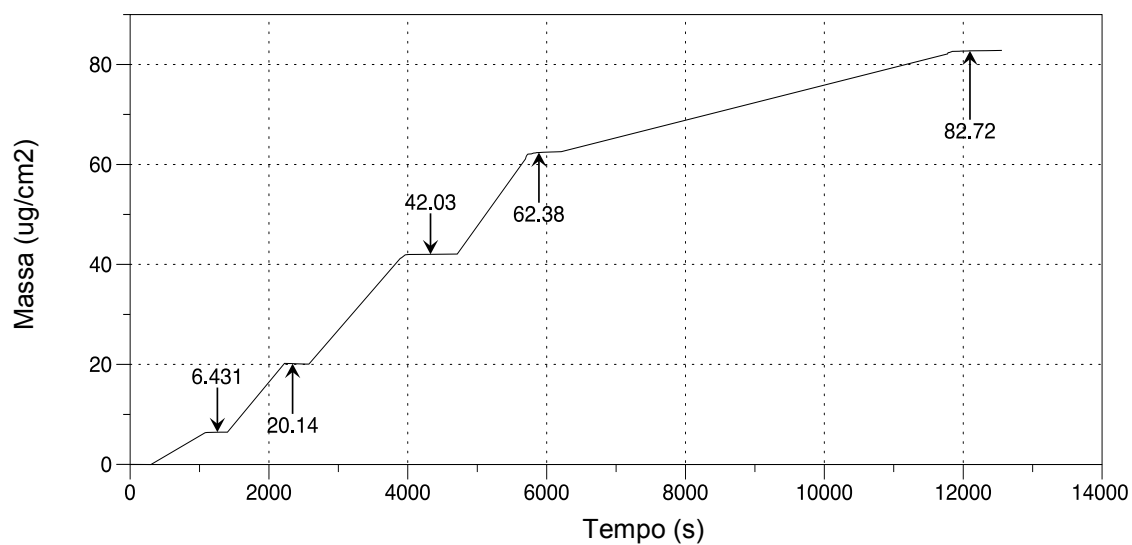


Ao adicionar as diferentes concentrações crescentes de glicerol (0%, 15%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85% e 90%), foi possível observar o aumento na resistência que é inversamente proporcional à diminuição da frequência, demonstrando a sensibilidade do QCM a detecções das variações de concentrações.

5.5.2 Resposta à Deposição de Nanocristais de Celulose sobre o Disco de Quartzo

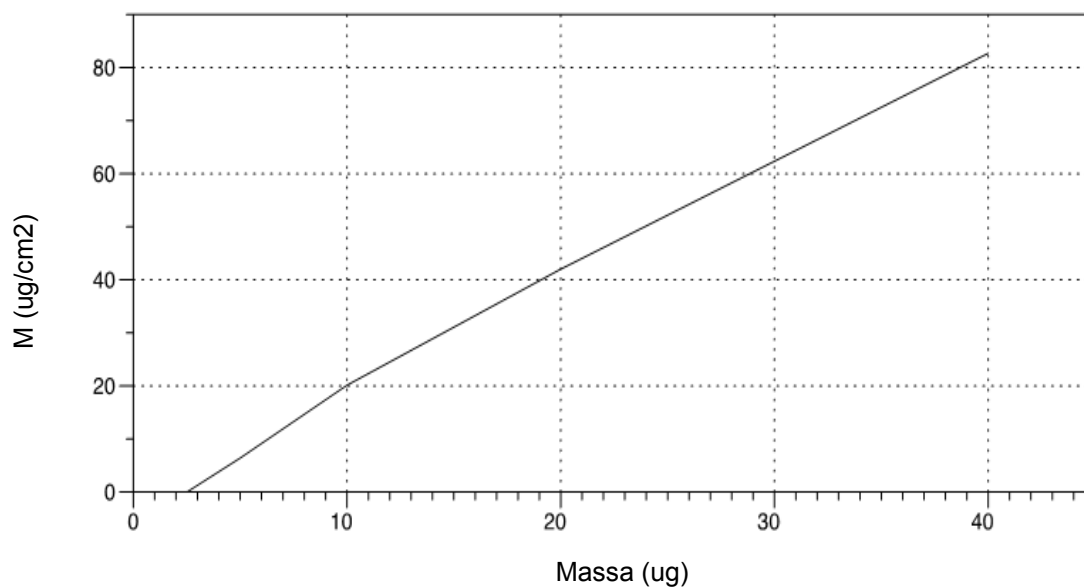
Foi medida a resposta do cristal de quartzo às concentrações crescentes de nanocristais de celulose, depositando suspensão de nanocelulose sobre o disco e secando-o, como apresentados na Figura 25. Observou-se que houve um aumento crescente de resposta a massa adicionada (5 ug/mL, 10 ug/mL, 20 ug/mL e 40 ug/mL) proporcional a quantidade, demonstrando a sensibilidade do QCM para evidenciar mudanças nas concentrações de massa nos materiais estudados.

Figura 25 - Aumento da massa por área ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) após a deposição sequencial de nanocristais de celulose



Aferir a faixa de linearidade a fim de estabelecer uma concentração ideal de resposta, como apresentada na Figura 26, depositada no disco as massas acima de $40 \mu\text{g}/\text{mL}$ demonstraram não ser lineares, podendo-se determinar a massa limite de sensibilidade.

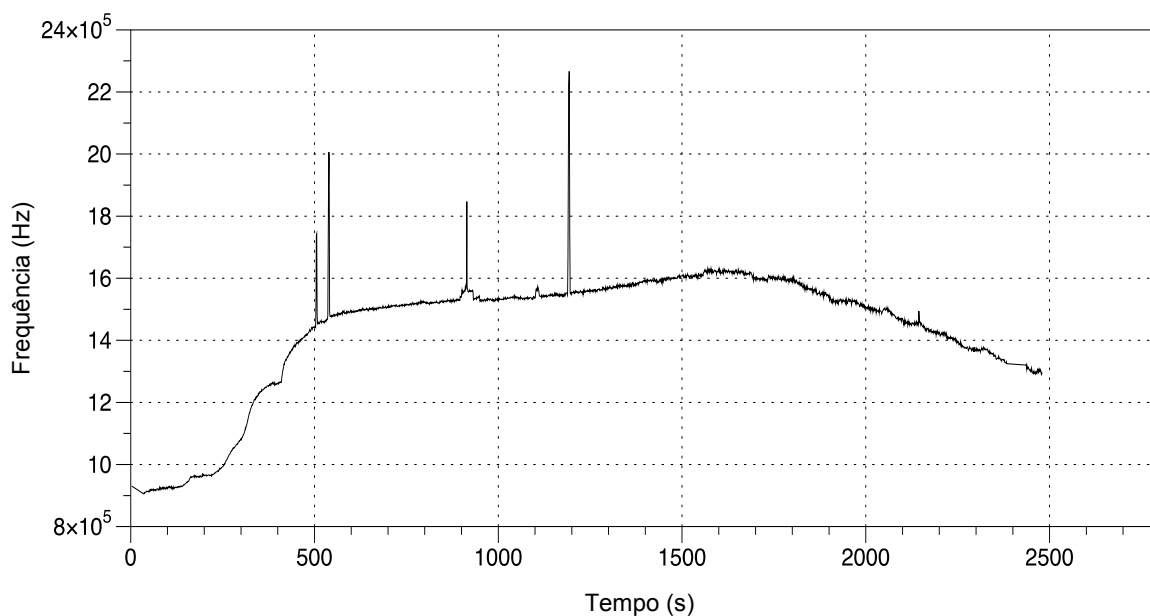
Figura 26 - Cruzamento de dados gráficos obtidos a partir de procedimento experimental que foi observado na Figura 25. Mostra a real massa depositados através do valor por centímetro quadrado.



5.5.3 Estabilidade do Filme de Nanocristais de Celulose Depositado sobre o Disco de Quartzo Frente a Eluição de Água

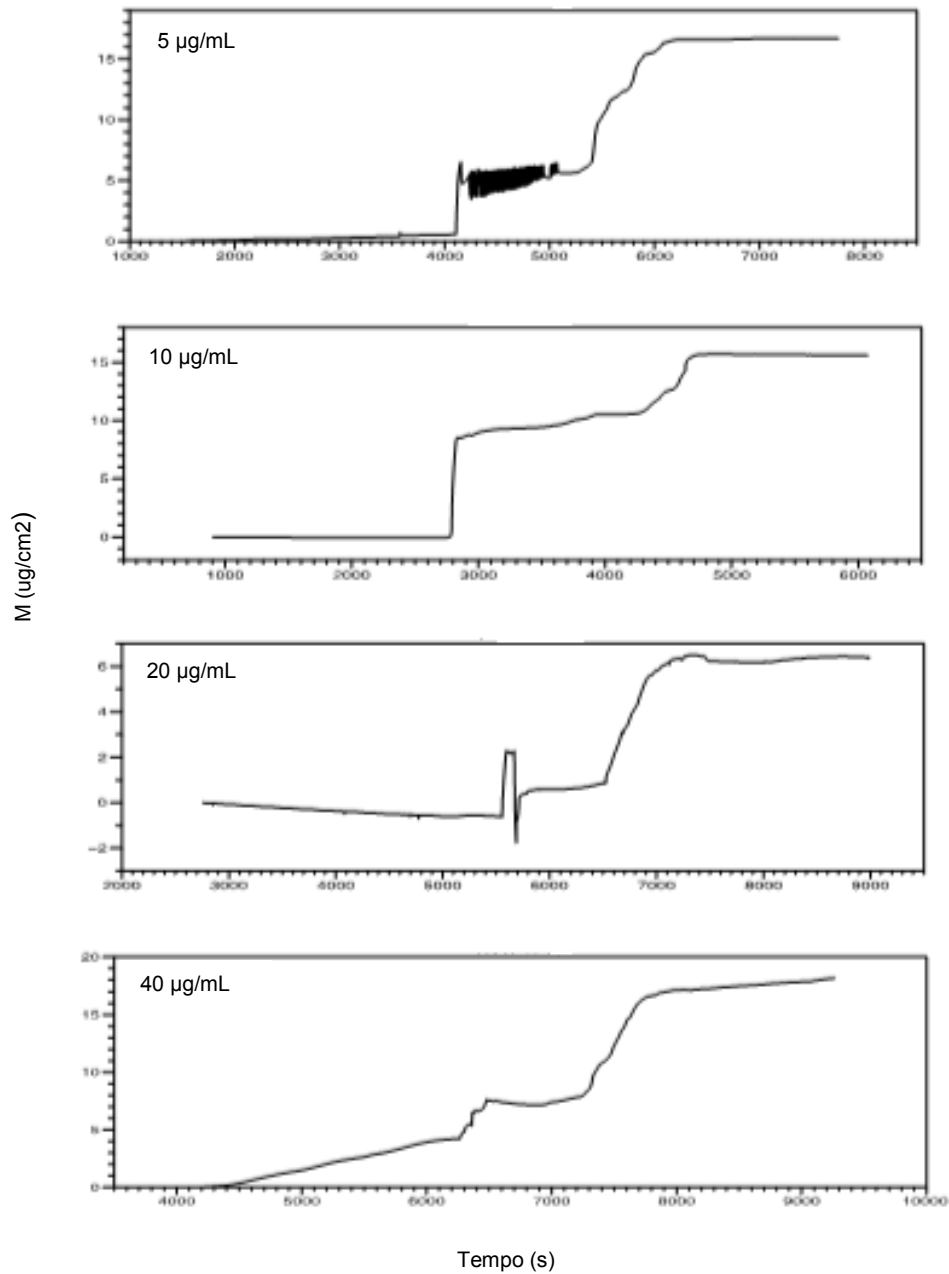
A avaliação da estabilidade do filme de nanocristal de celulose depositada no disco de quartzo frente a eluição de água em relação ao tempo é apresentada na Figura 27. A avaliação do nanocristal de celulose foi positiva, este permaneceu estável após a hidratação, sem perda do material estudado, no intervalo de 500 a 1500 segundos ($1000/60=16$ min).

Figura 27 - Estabilidade da nanocristal de celulose reconstituído com 50 ug de película



Os experimentos foram repetidos nas diferentes quantidades de massa utilizadas dos nanocristais de celulose ($5 \mu\text{g/mL}$, $10 \mu\text{g/mL}$, $20 \mu\text{g/mL}$ e $40 \mu\text{g/mL}$) como apresentado na Figura 28, podendo-se observar que para cada concentração, o filme hidrata-se ao longo do tempo sem perda do material, apresentando uma grande estabilidade, permitindo as análises dos materiais.

Figura 28 - Estabilidade dos nanocristais de celulose com massa limite para sensibilidade

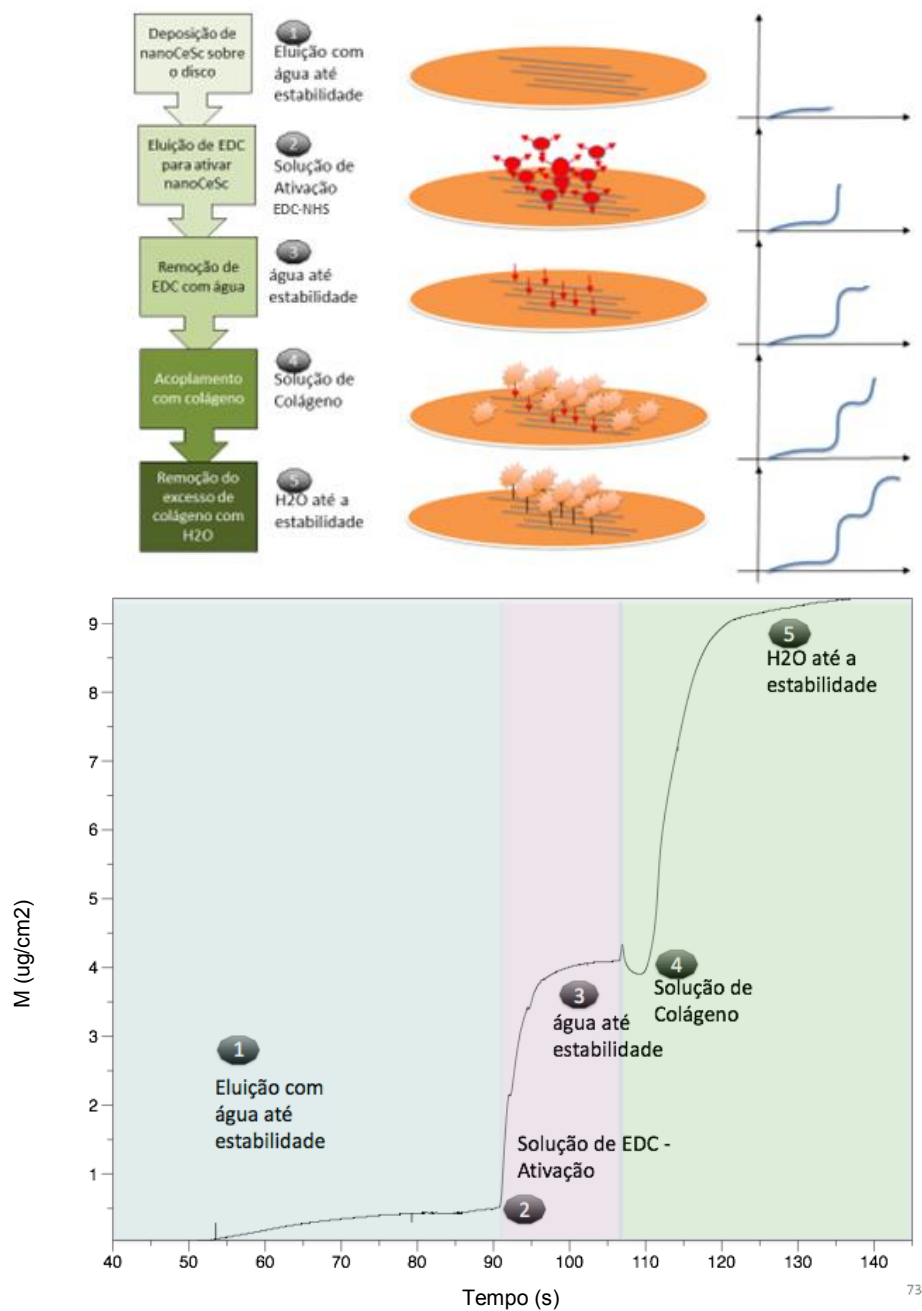


5.6 MONITORAMENTO EM TEMPO REAL DA FUNCIONALIZAÇÃO DE NCW-CO EM DISCO POR QCM

Para obtenção da medida piezoelétrica, foi depositado o filme de nanocristais de celulose (NCW-sc) na superfície de ouro do cristal de quartzo, e

subseqüentemente em fluxo foram ativação os sítios carboxílicos, com solução de EDC/NHS. Posteriormente o NCW-sc foi funcionalizado com colágeno hidrolisado. A avaliação da funcionalização do NCW-co foi procedida em fluxo de 0,02 mL/min. Na Figura 29, o monitoramento da funcionalização do NCW-sc com colágeno hidrolisado, começa com a eluição de água no filme até estabilizar (1), após a injeção da solução de ativação com EDC/NHS (2), observa-se que houve uma variação de frequência (Δf), posteriormente é passado água até estabilizar (3), apresentando também uma variação de frequência (Δf), após é injetado a solução com colágeno hidrolisado (4), observa-se que após esta injeção houve novamente variação de frequência (Δf), sugerindo a interação entre o colágeno e a monocamada de NCW-sc presente na superfície de ouro do cristal de quartzo. De acordo com a equação de Sauerbrey (Eq. 1), a frequência diminuiu devido a adsorção de massa sobre a superfície do cristal de quartzo. Finalmente foi feita a eluição de água (5) e o fluxo foi parado. Este mesmo protocolo foi adotado por Pesquero (2010), Hannes et al. (2012) Pedroso et al. (2012), Pei et al. (2012), Santos (2012) e Martins (2013), mostrando a eficiência do QCM no monitoramento em tempo real da funcionalização de partículas.

Figura 29 - Monitoramento em tempo real da funcionalização do nanocrystal de celulose (NCW-co)



Fonte: Propria do autor (2016)

Uma vez padronizada a técnica para medições no QCM, demonstrou-se que a vibração do cristal de quartzo depende não apenas das propriedades do quartzo e do material depositado, mas também das propriedades das soluções injetadas, para obter com sucesso as medidas piezoelétrica pretendidas.

CONCLUSÃO

No desenvolvimento deste trabalho, foi possível a produção de nanocristais de celulose a partir de celulose bacteriana, realizou-se com êxito a reação de succinilação que permitiu posteriormente a funcionalização com colágeno hidrolisado. Os nanocristais de celulose foram modificados com uma técnica ainda não descrita para materiais em nanoescala a partir de fonte microbianas. Os resultados que levaram a esta conclusão seguem:

1. A produção da celulose produzida pela bactéria *Gluconacetobacter xylinus* foi realizada em fermentação estática, obtendo-se um material apropriado, que serviu como base para produção de nanocristais de celulose.
2. A obtenção de nanocristais de celulose (NCW) não depende soamente da hidrólise, mas também, do processo de obtenção e é importante ressaltar que a fermentação estática permite obter uma celulose com alto índice de cristalinidade.
3. O sucesso da succinilação seguido da funcionalização da nanocelulose foram evidenciados principalmente pela técnica de FT-IR apresentando bandas em destaque, referentes ao ácido carboxílico em 1727 cm^{-1} e a proteínas 1655 cm^{-1} . Estes processos, vêm sendo aplicados visando o aumento das propriedades mecânicas, ampliando as aplicações industriais dos nanomateriais.
4. A padronização da técnica foi possível pela realização dos ensaios preliminares, em relação, formação do filme no disco com concentração ideal ($250\text{ }\mu\text{L/mL}$), a viscosidade e composição do meio que ajudaram com a determinação de quantidade de massa depositada no disco (5, 10, 20 e $40\text{ }\mu\text{L/mL}$) e estabilidade do filme no disco de quartzo (eluição de água - velocidade de fluxo aplicado de $0,02\text{ mL/minuto}$), permitindo o monitoramento em tempo real dos processos de succinilação e funcionalização por QCM.

REFERÊNCIAS

ABDUL KHALIL, H. P. S. et al. Production and modification of nanofibrillated cellulose using various mechanical processes: A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 99, p. 649– 665, 2014.

ABDUL KHALIL, H.P.S.; BHAT, A.H., IREEANA YUSRA, A.F. Green composites from sustainable cellulose nanofibrils: A review. **Carbohydrate Polymers**, v.87, p.963-979, 2012.

ALMEIDA, Denise Milleo; Gilvan WOSIACKI; Guataçara dos Santos Junior; Elisângela Serenato Madalozzo; Misaeli Maria Zanlorenzi .GROWTH OF *Acetobacter xylinum* (ATCC 23769) AND THE BACTERIA CELLULOSE PRODUCTION. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**. v. 02, n. 01: p. 95-103, 2008.

AL-TURAIF, H.A. Relationship between tensile properties and film formation kinetics of epoxy resin reinforced with nanofibrillated cellulose. **Progress in Organic Coatings**, v. 76, p. 477-481, 2013.

ARRIETA, M. P. et al. Multifunctional PLA – PHB/cellulose nanocrystal films: Processing, structural and thermal properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 107, p. 16–24, 2014.

ARRIETA, M. P. et al. PLA-PHB/cellulose based films: Mechanical, barrier and disintegration properties. **Polymer Degradation and Stability**, v. 107, p. 139–149, 2014.

ASHORI, A., Sheykhnazari, S., Tabarsa, T., Shakeri, A., & Golalipour, M. Bacterial cellulose/silica nanocomposites: Preparation and characterization. **Carbohydrate Polymers**, 90(1), 413–418. 2012.

AULIN, C.; AHOLA, S.; JOSEFSSON, P.; NISHINO, T.; HIROSE, Y.; OSTERBERG, M.; WÅGBERG, L. Nanoscale cellulose films with different crystallinities and mesostructures - their surface properties and interaction with water. **Langmuir**. v. 25, n. 13, p. 7675-7685, 2009.

BACKDAHL, H. HELENIUS, G. BODIN, A. NANNMARK, U. JOHANSSON, BR. RISBERG, B. GATENHOLM, P. Mechanical properties of bacterial cellulose and interactions with smooth muscle cells. **Biomaterials**, v. 27, n. 9, p. 2141-9, 2006.

BARBOSA, L. C. A. **Espectroscopia no infravermelho na caracterização de compostos orgânicos**. Viçosa: Ed. UFV, 2007.

BARUD, H. S.; ARAÚJO JUNIOR, A. M.; SANTOS, D. B.; ASSUNÇÃO, R. M. N.; MEIRELES, C. S.; CERQUEIRA, D. A.; RODRIGUES FILHO, G.; RIBEIRO,

C. A.; MESSADDEQ, Y.; RIBEIRO, S. J. L. **Thermal behavior of cellulose acetate produced from homogeneous acetylation of bacterial cellulose.** *Thermochim. Acta*, v. 471, n. 1/2, p. 61-69, May 2008.

BARUD, H. S.; RIBEIRO, C. A.; CRESPI, M. S.; MATRINES, M. A. U.; DEXPERTGHYS, J.; MARQUES, R. F. C.; MESSADDEQ, Y.; RIBEIRO, S. J. L. Thermal characterization of bacterial cellulose-phosphate composite membranes. *J. Therm. Anal. Calorim.*, v. 87, p. 815-818, 2007.

BARUFFALDI, R.; OLIVEIRA, M. N. **Fundamentos de Tecnologia de Alimentos.** São Paulo: Atheneu, v. 3. 1998.

BAWA, R. The future of nanomedicine. In: T. Mack (Ed.), **Hopes and visions for the 21st Century**, Bethesda, World Future Society, 2007, p. 427

BENINI, Kelly Cristina. **Compósitos de nanocelulose/phbv: manta microfibrilica por eletrofição.** 2015. 168 f. Teses (Doutor em Engenharia Mecânica na Área de Materiais) – Universidad Estadual Paulista, Guaratinguetá. 2015.

BELBEKHOUCHE, S. et al. Water sorption behavior and gas barrier properties of cellulose whiskers and microfibrils films. *Carbohydrate Polymers*, v. 83, p. 1740 - 1748, 2011.

BIEIRA, D. C. Produção de biofilme (membrana de biocelulose) por *Gluconacetobacter xylinus* em meio de resíduos frutas e folhas de chá verde. 2013. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade de São Paulo. 2013.

BLAKER, J. J., K. Y. Lee, X. X. Li, A. Menner, A. Bismarck, **Green Chem.** v. 11. p.1321. 2009.

BONADIO Raphael. Severino. **Perfil de metilação global de DNA em células mcf-7 e mcf-10a após exposição transiente de nanopartículas de maghemita funcionalizadas com citrato.** 2014. 86 f. Dissertação (Mestrado em Nanociência e Nanobiotecnologia) - Universidade de Brasília, Brasília. 2014.

BOUJEMAOUI, A. et al. Preparation and characterization of functionalized cellulose nanocrystals. *Carbohydrate Polymers*, v. 115, p. 457 - 464, 2015.

BRINCHI, L.; COTANA, F.; FORTUNATI, E.; KENNY, J.M. Production of nanocrystalline cellulose from lignocellulosic biomass: Technology and applications. *Carbohydrate Polymers*, v.94, p.154-169, 2013.

CALDEIRA, MARIANA DA SILVA. **Produção de nanocompósito utilizando diferentes fontes de celulose como reforço.** 2013. 66 f. Dissertação (mestre em agronomia) - Universidade Estadual Paulista, Botocatu. 2013.

CAMARGO, C. H. M. **Compósitos de Nanocristais e Nanofibrilas de Celulose: Preparação, Caracterização e Potenciais Aplicações em Processos de Restauração de Documentos e Obras de Arte sobre Papel.**

Diseertação de Mestrado (Mestrado em Química - Físico-Química.) – Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, 2016.

CAO, X., DING, B., YU, J., AL-DEYAB, S. S., Cellulose nanowhiskers extracted from TEMPO-oxidized jute fibers, **Carbohydrate Polymers**, 2010.

CASTRO, C.; ZULUAGA, R.; ALVAREZ, C.; PUTAUX, J.; CARO, G.; ROJAS, O. J. MONDRAGON, I.; GANAN, P. B bacterial cellulose produced by a new acid-res of *Gluconacetobacter* genus. **Carbohydrate Polymers**, v. 89, p, 1033-1037, 2012.

CHEN, F.; ZHANG, M.; WU, Z. Toward delivery of multiple growth factors in tissue engineering. **Biomaterials**. 2010; 31(24): 6279-308.

CERQUEIRA, D. A.; VALENTE, A. J. M.; RODRIGUES FILHO, R.; BURROWS, H. G.; Synthesis and properties of polyaniline–cellulose acetate blends: The use of sugarcane bagasse waste and the effect of the substitution degree.

Carbohydrate Polymers, v. 78, n. 3, p. 402-408, 2009.

CHAVEZ-PACHECO, J. L. MARTINEZ-YEE, S. ZENTELLA-CONTRERAS, M. ESCAMILLA-MARVÁN, E. Celulose bacteriana en *Gluconacetobacter xylinum*: biosíntesis y aplicaciones. **Revista Especializada em ciências Químico-Biológicas**, v. 7, p18-25, 2004.

CHENGDONG, W. et al. **Permeation study through bacterial cellulose membrane**. Acta Poloniae Pharmaceutica Drug Research, Vol. 71 No. 2. p. 297 - 300, 2014.

COSTA, C. A. R. RIPPEL, M. M. GALEMBECK, F. Heterogeneidade da capacidade dissipativa e do módulo de Young em superfícies poliméricas: contraste de fase em AFM com contato periódico. **Polímeros: Ciência e tecnologia**, v. 12, n. 3, p. 188-192, 2002.

CZAJA, W. KRZYSTYNOMICZ, A. BIELECKI, S. BROWN, JR. R.M. Microbial Cellulose – the natural power to heal wounds. **Biomaterials**, v. 27, p. 153-151, 2006.

CZAJA, W. K.; YOUNG, D. J.; KAWECKI, M.; BROWN, R. M. The future prospects of microbial cellulose in biomedical applications. **Biomacromolecules**, v. 8, n.1, p. 1-12. 2007.

CZAJA, Wojciech; Dwight Romanovicz and R. Malcolm Brown, Jr. Structural investigations of microbial cellulose produced in stationary and agitated culture. **Cellulose** 11: 403 411, 2004.

DAMMSTRÖM, S. SALMÉM, L. GATENHOLM, P. The effect of moisture on the dynamical mechanical properties of bacterial cellulose/ glucuronoxylan nanocomposites. **Polymer**, v.46, p. 10364-10371, 2005.

DAMASIO, R. A. Caracterização e aplicações de celuloses nanofibrilada (cnf) e nanocristalina (cnc). 2015. 102 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Florestal,) - Universidade Federal de Viçosa. Viçosa. 2015

DAMOS, F. S.; MENDES, R. K.; KUBOTA, L. T. Aplicações de QCM, EIS e SPR na investigação de superfícies e interfaces para o desenvolvimento de (bio)sensores. **Química Nova**, v. 27, n. 6, p. 970-979, 2004

DANIEL, M. C.; Astruc, D., Gold nanoparticles: assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology. **Chemistry Review**, 104 (1), 293-346, 2004.

DEDAVID, Berenice Anina, Carmem Isse GOMES, Giovanna MACHADO. **Microscopia Eletrônica de Varredura: aplicações e preparação de amostras : materiais poliméricos, metálicos e semicondutores** [recurso eletrônico] /. – Porto Alegre : EDIPUCRS, 2007. Disponível: <http://www.pucrs.br/edipucrs/online/microscopia.pdf> Acesso em: 15 novembro 2015.

DONG, X. M.; REVOL, J. F.; GRAY, D. G. Effect of microcrystallite preparation conditions on the formation of colloid crystals of cellulose. **Cellulose**, v. 5, n. 1, p.19-32, 1998.

DUFRESNE, A., BELGACEM, M. N., "Cellulose-reinforced composites: from micro-to nanoscale", **Polímeros**, v. 23, n. 3, pp. 277-286, 2013
LAHIJI, R. R., XU, X., REIFENBERGER, R., RAMAN, A., et al., "Atomic force microscopy characterization of cellulose nanocrystals", **Langmuir**, v. 26, n. 6, pp. 4480-4488, 2010.

DUJARDIN, E.; BLASEBY, M.; MANN, S. Synthesis of mesoporous silica by sol-gel mineralisation of cellulose nanorod nematic suspensions. **Journal of Material Chemistry**, v. 13, p. 696-699, 2003.

EHAQUI, H.; ALLAIS, M.; ZHOU, Q.; BERGLUND, L. A. Wood cellulose biocomposites with fibrous structures at micro- and nanoscale. **Composites Science and Technology**, nº 71, p. 382-387, 2011.

EICHHORN, S. J. et al. Review: current international research into cellulose nanofibres and nanocomposites. **Journal of Materials Science**, v. 45, n. 1, p. 1-33, 24 set. 2010.

EVELISE F. SANTOS, MAURO MORESCO, SIMONE M. L. ROSA, SÔNIA M. B. NACHTIGALL. Extrusão de Compósitos de PP com Fibras Curtas de Coco: Efeito da Temperatura e Agentes de Acoplamento. **Polímeros**, vol. 20, nº 3, p. 215-220, 2010.

FARIA-TISCHER, Paula C.S., TISCHER, Cesar A., HEUX, Laurent, Simon Le Denmat, Catherine Picart, Maria-R. Sierakowski, Jean-Luc Putaux. Preparation of cellulose II and III films by allomorphic conversion of bacterial cellulose I pellicles. **Materials Science and Engineering**, C 51, p. 167-173, 2015.

FENG, X.; Meng, X.; Zhao, J.; Miao, M.; Shi, L.; Zhang, S.; Fang, J. Extraction and preparation of cellulose nanocrystals from dealginated kelp residue: structures and morphological characterization. **Cellulose**, 22:1763–1772, 2015.

FINK, H. P. PURTZ, H. J. BOHN, A. KUNZE, J. Investigation of the supramolecular structure of never dried bacterial cellulose. **Macromolecular Symposia**, v.17, p 120- 207, 1997.

FU, L., ZHANG, J., & YANG, G. Present status and applications of bacterial cellulose-based materials for skin tissue repair. **Carbohydrate Polymers**, 92,1432–1442, 2013.

GAGNON, G. R.; RIGDAL, R.; SCHUAL-BERKE, J.; BILODEAU, M.; BOUSFIELD, D. W. **The effect of nano-fibrillated cellulose on the mechanical properties of polymer films**. 2010. Disponível em: Acesso em: 29 fev. 2016.

GAMA, M.; GATENHOLM, P.; KLEMM D. “**Bacterial Nanocellulose: A Sophisticated Multifunctional Material**”, CRC Press, Boca Raton, FL, Atlanta. TAPPI PRESS, 1993. 58 - 73 p, 2013.

GARCIA DE RODRIGUEZ, N. L.; THIELEMANS, W.; DUFRESNE, A. Sisal cellulose whiskers reinforced polyvinyl acetate nanocomposites. **Cellulose**, v. 13, n. 3, p. 261-270, doi: 10.1007/s10570'9039'7, 2006.

GAO, C. et al. Introduction of broad spectrum antibacterial properties to bacterial cellulose nanofibers via immobilising ϵ -polylysine nanocoatings. **Food Hydrocolloids**, v. 36, p. 204–211, 2014.

GIRI, J.; ADHIKARI, R. A Brief review on extraction of nanocellulose and its Application. **BIBECHANA**, v.9, p.81-87, 2013.

GOELZER, F. D. E. CASCA DE ARROZ PROCESSADA VIA ENZIMÓLISE COMO FONTE DE CARBONO PARA PRODUÇÃO DE CELULOSE POR *Acetobacter xylinum*. 2009, f, Dissertação (mestre em) - UNIVERSIDADE DO VALE DO ITAJAÍ. 2009.

GOELZER, F.D.E.; FARIA-TISCHER, P.C.S.; VITORINO, J.C.; SIERAKOWSKI, Maria -R.; TISCHER, C.A. Production and characterization of nanospheres of bacterial cellulose from *Acetobacter xylinum* from processed rice bark, **Materials Science and Engineering**. 29, p. 546–55, 2009.

GOMES, C. B. DUTRA, C. V. A. A fluorescência de raios X na Geologia. In: Formoso, M. L. L.; Trescases, J. J. Dutra, C. V. Gomes, C. B. (coord.) **Técnicas analíticas instrumentais aplicadas**. São Paulo, ed. Edgar Blücher, p. 85-120, 1984.

GOMES, F. P.; GOMES, Nuno H.C.S. Silva, Eliane Trovatti, Luísa S. Serafim, Maria F. Duarte, Armando J.D. Silvestre, Carlos Pascoal Neto, Carmen S.R. Freire. Production of bacterial cellulose by *Gluconacetobacter sacchari* using dry olive mill residue. **Biomass and bioenergy**. v 55. p 205 - 211. 2013.

GOMES, Fabio P., Nuno H.C.S. Silva, Eliane Trovatti, Luísa S. Serafim, Maria F. Duarte, Armando J.D. Silvestre, Carlos Pascoal Neto, Carmen S.R. Freire. Production of bacterial cellulose by *Gluconacetobacter sacchari* using dry olive mill residue. **Biomass and bioenergy**. v 55. p 205 e 211. 2013.

GU, J.; CATCHMARK, J. M. Impact hemicelluloses and pectin on esphere-like bacterial cellulose assembly. **Carbohydrate Polymers**, v.88, n. 2, p.547-557, 2012.

GURGEL, L. V. A. **Mercerização e modificação química de celulose e bagaço de cana-de-açúcar com anidrido succínico e trietilenotetramina: Preparação de novos materiais quelantes para adsorção de Pb (II), Cr (VI) e Cu (II)**. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Engenharia ambiental) – Instituto de Ciências Exatas e Biológicas, Universidad Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2007.

HABIBI, Y.; FOULON, L.; AGUIÉ-BÉGHIN, V.; MOLINARI, M.; DOUILLARD, R.; Langmuir–Blodgett. Films of cellulose nanocrystals: Preparation and characterization. **Journal of Colloid and Interface Science**, 316: p. 388-397, 2007.

HABIBI, Y.; LUCIA, L. A.; ROJAS, O. J. Cellulose nanocrystals: chemistry, selfassembly, and applications. **Chemical Reviews**, v. 110, n. 6, p. 3479-3500, 2010.

HANNES Orelma; Ilari Filpponen; Leena-Sisko Johansson; Monika Osterberg; Orlando J. Rojas; Janne Laine. Surface Functionalized Nanofibrillar Cellulose (NFC) Film as a Platform for Immunoassays and Diagnostics. Department of Forest Products Technology, **School of Chemical Technology**, Alto University, 00076 Espoo, Finland. *Biointerphases*, 7:61, 2012.

HASSAN, E. A.; HASSAN, M. L.; OKSMAN, K. Improving bagasse pulp paper sheet properties with microfibrillated cellulose isolated from xylanasetreated bagasse. **Wood and Fiber Science**, Madison, v. 43, n. 1, p. 76-82, 2011.

HENRIKSSON, M.; BERGLUND, L. A.; ISAKSSON, P.; LINDSTRÖM, T.; NISHINO, T. Cellulose nanopaper structures of high toughness. **Biomacromolecules**, v. 9, p. 1579–1585, 2008.

HIRAI, A.; Tsuji M, Yamamoto H. and Horii F. /n silll crystallization of bacterial cellulose. III. Influence of different polymeric additives on the formation of microfibrils as revealed by transmission electron microscopy. **Cellulose** 5: 201213. 1998.

HONG, L. WANG, Y. L. JIA, S. R. HUANG, Y. GAO, C. WAN, Y. Z. Hydroxyapatite/bacterial cellulose composites synthesized via a biomimetic route. **Materials Letters**, v. 60, p. 1710–1713, 2006.

HORIE, K.; BARÓN, M.; FOX, R. B.; HE, J.; HESS, M.; et al. Definitions of terms relating to reactions of polymers and to functional polymeric Materials.

IUPAC Recommendations, 2003. **Pure Appl. Chem.**, v. 76, n. 4, p. 889–906, 2004.

HORNUNG, M. LUDWIG, M. SCHMAUDER, H, P. GERRARD, A, M. Optimizing the Production of Bacterial Cellulose in Surface Culture: Evaluation of Substrate Mass Transfer Influences on the Bioreaction (Part 1). **Engineering in Life Science**, v. 6, n. 6, p. 537-545, 2006a.

HU, W., CHEN, S., YANG, J., LI, Z., & WANG, H. Functionalized bacterial cellulose derivatives and nanocomposites. **Carbohydrate Polymers**, 101, 1043–1060, 2014.

HUANG, I. ; LIN, C. ; WU, E. Effects of a glutaraldehyde cross-linking layer on a quartz crystal microbalance–based α -fetoprotein biosensor with cystamine self-assembly monolayer. **Journal of Micro/Nanolithography**, v. 9, n. 7, p. 023008/1-023008/7, 2010.

HUBBE, M. A.; ROJAS, O. J. Colloidal stability and aggregation of lignocellulosic materials in aqueous suspension: A review. **Bioresources, Raleigh**, v. 3, n. 4, p. 1419-1491, 2008.

ÍGOR A. N. Doninil; Denise T. B. De Salvil; Fabiana K. Fukumotol, III; Wilton R. Lustrill; Hernane S. Barudl; Reinaldo Marchettol; Younes Messaddeql; Sidney J. L. Ribeiro. BLOSSÍNTESE E RECENTES AVANÇOS NA PRODUÇÃO DE CELULOSE BACTERIANA. **Ecl. Quím.**, São Paulo, v. 35 , n. 4, p. 165 - 178, 2010.

IGUCHI M.; MITSUHASHI, S.; ICHIMURA, K.; Y. NISHI; M. URYU; S. YAMANAKA; K. WATANABE. Bacterial cellulose-containing molding material having high dynamic strength. **US patente** 4742164, 1988.

IGUCHI M.; YAMANAKA, S.; BUDHIONO, A. Bacterial cellulose – A masterpiece of nature's arts, **J. Mater. Sci.**, v. 35, p. 261–270, 2000.

IOELOVICH, M. Structure and properties nanoparticles used in paper compositions. TECNICELPA CONFERENCE AND EXHIBITIO. 21. CIADICYO. 7., 2010. **Anais...** Lisbon: Tecnicelpa, 2010.

ISHIZU. A. Chemical modification of cellulose. In: HON, D. **Wood and cellulosic chemistry**. Tokyo: Marcel Dekker, v. 1, p. 525, 1991.

ISHIHARA, M. YAMANAKA, S. Modified bacterial cellulose. **US Patent** RE38,792 E, 2005.

IWAMOTO, S.; NAKAGAITO, A. N.; YANO, H. Nano-fibrillation of pulp fibers for the processing of transparent nanocomposites. **Applied Physics A**, v. 89, p. 461–466, 2007

JANDT, K. D. Developments and perspectives of scanning probe microscopy (SPM) on organic materials. **Materials Science and Engineering R.: Reports**, Lausanne, v. 21, p. 221-295, 1998.

JEAN, B.; DUBREUIL, F.; HEUX, L.; COUSIN, F. Structural details of cellulose nanocrystals/polyelectrolytes multilayers probed by neutron reflectivity and AFM. **Langmuir**, v. 24, n. 7, p. 3452-3458, 2008.

JEAN, B.; HEUX, L.; DUBREUIL, F.; CHAMBAT, G.; COUSIN, F. Non-Electrostatic Building of Biomimetic Cellulose Xyloglucan Multilayers, **Langmuir**, v. 25, n. 7, p. 3920-3923, 2009.

JEON, J. H.; OH, I.K.; KEE, C. D.; KIN, S. J. Bacterial cellulose actuator with electrolytically driven bending deformation in hydrated condition. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 146, n. 1, p. 3017-313, 2010.

JONAS, R.; FARAH, L. F. Production and application of microbial cellulose. **Polymer Degradation and Stability**, v. 59, p. 101-106, 1998.

JOHN, M. J.; THOMAS, S. Biofibres and biocomposites. **Carbohydrate Polymer**, v. 71, p. 343-364, 2008.

JUNG, H.I.; Lee OM, Jeong JH, Jeon YD, Park KH, Kim HS, et al. Production and characterization of cellulose by acetobacter sp V6 using a cost-effective molasses-corn steep liquor medium. **Appl Biochem Biotechnol**.162 (2) 486 - 97. 2010.

KARGARZADEH, H. et al. Cellulose nanocrystal: A promising toughening agent for unsaturated polyester nanocomposite. **Polymer**, v. 56, p. 346-357, 2015.

KIM, D.-Y., NISHIYAMA, Y., & KUGA, S. Surface acetylation of bacterial cellulose. **Cellulose**, 9, 361-367, 2002.

KLEMM, D. et al. Nanocelluloses: a new family of nature-based materials. **Angewandte Chemie (International ed. in English)**, v. 50, n. 24, p. 5438-66, 2011.

KLEMM, D. HEUBLEIN, B. FINK, H-P. BOHN, A. Cellulose: Fascinating Biopolymer and Sustainable Raw Material. **Angewandte Chemie**, v.44, p. 3358-3393, 2013.

KLEMM, D.; Schumann D, Udhardt U, Marsch S. Bacterial synthesized cellulose e artificial blood vessels for microsurgery. **Prog Polym Sci**; 26(9): 1561- 603. 2001.

KLEMM, D.; SCHUMANN, D.; KRAMER, F.; HEBLER, N.; HORNING, M.; SCHMAUDER, H-S.; MARSCH, S. Nanocelluloses as innovative polymers in research and application. **Advances in Polymer Science**, v. 205, p. 49-96, 2006.

KOCH, C. Structural nanocrystalline materials: an overview. **Journal of Materials Science**, v. 42, p. 1403-1414, 2007.

KOON-YANG Lee; BULDUM ,Gizem; MANTALARIS, Athanasios; BISMARCK, Alexander. More Than Meets the Eye in Bacterial Cellulose: Biosynthesis,

Bioprocessing, and Applications in Advanced Fiber Composites. **Macromol. Biosci.** v. 14, p.10–32, 2014.

KONTTURI, E.; TAMMELIN, T.; OSTERBERG, M. Cellulose—model films and the fundamental approach. **Chemical Society Reviews**, v. 35, p. 1287-1304, 2006.

KOYAMA, M. HELBERT, W. IMAI, T. SUGIYAMA, J. HENRISSAT, B. Parallel-up structure evidences the molecular directionality during biosynthesis of bacterial cellulose. Proceedings of the National. **Academy of Sciences.** v. 94, p. 9091–9095, 1997.

KRYSTYNOWICZ, A., W. Czaja, A. Wiktorowska-Jeziarska, M. Goncalves-Miskiewicz, M. Turkiewicz, and S. Bielecki, Factors affecting the yield and properties of bacterial cellulose. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, 29(4): p. 189-195, 2002.

KRYSTYNOWICZ, A.; KOZIOŁKIEWICZ, M. WIKTOROWSKA-JEZIERSKA, A. BIELECKI, S. KLEMENSKA, E. MASNY, A. PŁUCIENNICZAK, A. **Molecular basis of cellulose biosynthesis disappearance in submerged culture of Acetobacter xylinum.** Acta Biochimica Polonica, v. 52, n. 3, p. 691-698, 2005.

KVIEN, I.; TANEM, B. S.; OKSMAN, K. Characterization of cellulose whiskers and their nanocomposites by atomic force and electron microscopy. **Biomacromolecules**, v. 6, n. 6, p. 3160 - 3165, 2005.

KUROSUMI, A.; SASAKI, C.; YAMASHITA, Y.; NAKAMURA, Y. Utilization of various fruit juices as carbon source for production of bacterial cellulose by *Acetobacter xylinum* NBRC 13693. **Carbohydrate Pol.** v. 76, n 2, p. 333-335, 2009.

LAHIJI, R. R. et al. Atomic force microscopy characterization of cellulose nanocrystals. **Langmuir: the ACS, Journal of Surfaces and Colloids**, v.26, n. 6, p. 4480-4488, doi:10.1021/la903111j, 2010.

LANDIN, M. MARTINEZ-PACHECO, R. GOMEZ-AMOZA, JL. SOUTO, C. CONCHEIRO, A. ROWE, R. C. Effect of country of origin on the properties of microcrystalline cellulose. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 91, p. 123-131, 1993.

LENGOWSKI, E. C.; Bolzon de Muniz, G. I.; Nisgoski, S.; Wasghington, L. E. M. Avaliação de métodos de obtenção de celulose com diferentes graus de cristalinidade. **Sci. For., Piracicaba**, v. 41, n. 98, p. 185-194, jun. 2013.

LEE K. Y., L. L. C. Wong, J. J. Blaker, J. M. Hodgkinson, A. Bismarck, **Green Chem.** v. 13. p 3117. 2011.

LESTARI, Puji; Nitariyani Elfrida; Ani Suryani; Yadi Suryadi. Study on the Production of Bacterial Cellulose from *Acetobacter xylinum* using Agro-Waste. **Jordan Journal of Biological Sciences.** All rights reserved, v. 7, n. 1, 2014.

LEY J., M. Gillis, J. Swings, "Family VI. Acetobacteraceae." in: KRIEG, N. R., J. G. Hold **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, Eds., Williams & Wilkins, Baltimore, MD 1984, p. 267.

LIANG, H. et al. Highly conductive and stretchable conductors fabricated from bacterial cellulose. **Cellulose**, v. 4, n. 6, p. e19–6, 2012.

LIMA BORSALI Rodlike Cellulose Microcrystals: Structure, Properties, and Applications **Macromol. Rapid Commun.** 2004, 25, 771–78.

LIMA, H. L. **Alvaliação do potencial do líquido se sisal e do suco de caju para produção de cellulose bacteriana**. Dissertação (mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2014.

LIMA, Lais R.; SANTOS, DANIELE B.; SANTOS, Molíria V.; BARUD, Hernane S.; HENRIQUE, Mariana A.; PASQUINI, Daniel; PECORARO, Edison; SIDNEY J. L. Nanocristais de celulose a partir de celulose bacteriana. **Quim. Nova**, v. 38, n. 9, p. 1140-1147, 2015.

LI, R. et al. Cellulose whiskers extracted from mulberry: A novel biomass production. **Carbohydrate PolymerS**, 76, p. 94–99, 2009.

LI, Y. Wood-Polymer Composites. In: TESINOVA, P. **Advances in Composite Materials - Analysis of Natural and Man-Made Materials**. [S.l.]: InTech, p. 572, 2011.

LOPEZ, Carlos G. Sarah E. Rogers, Ralph H. Colby, Peter Graham, João T. Cabral. structure of sodium carboxymethyl cellulose aqueous solutions: A SANS and rheology study, **J. Polym. Sci.**, v. 53, p. 492–501, 2014

LU, Q.; TANG, L.; WANG, S.; HUANG, B.; CHEN, Y.; CHEN, X. An investigation on the characteristics of cellulose nanocrystals from Pennisetum sínese. **Biomass and Bioenergy**, v. 70, p. 267-272, 2014.

NABE, Koichi et. al. Conversion of glycerol to dihydroxyacetone by immobilized whole cells of *Acetobacter xylinum*. **Applied and environmental microbiology**, Yodogawa-ku, v. 38, n. 6, p. 1056-1060, dez.1979.

NAGATANI, T.; SAITO S.; SATO, M.; YAMADA, M. Development of an ultra high resolution scanning electron microscope by means of a field emission source and in-lens system. **Scanning Microscopy**. v.11, 901-909, 1987.

NARITOMI, T., T. Kouda, H. Yano, F. Yoshinaga. Inhibitory effect of carbon dioxide on bacterial cellulose production by *Acetobacter* in agitated culture. *J Ferment Bioeng* **J. Ferment Bioeng**. V. 85, p. 89–95, 1998.

NISHI, Y. URYU, M. YAMANAKA, S. WATANABE, K. KITAMURA, N. IGUCHI M. The structure and mechanical properties of sheets prepared from bacterial cellulose. Part 2: improvement of the mechanical properties of sheets and their applicability to diaphragms of electroacoustic transducers. **Journal of Materials Science.**, v. 25, p. 2997–3001, 1990.

NOGI, M.; K. ABE; K. HANDA; F. NAKATSUBO; S. IFUKU; H. YANO. Surface modification of bacterial cellulose nanofibers for property enhancement of optically transparent composites: dependence on acetyl-group DS. **Biomacromolecules**. Lett. 2007, 89, 233123.

NORHAYATI, Pa'e, Khairul A. Zahan and Ida I. Muhamad. Production of Biopolymer from *Acetobacter xylinum* Using Different Fermentation Methods. **International Journal of Engineering & Technology IJET-IJENS** Vol: 11 No: 05, 2011.

MALISKA, A. M. **Microscopia Eletrônica de Varredura**. Disponível em: http://www.materiais.ufsc.br/lcm/web-MEV/MEV_index.htm Acesso em: 12 dezembro 2015.

MARTINS, D. C. **Determinação da constante de afinidade e cinética da interação lectina ArtinM-célula leucêmica (NB4) por meio de técnicas piezoelétrica e eletroquímica**. 2013. 76 f. Dissertação (meste em biotecnologia) Universidade Federal de São Carlos, Araraquara. 2013.

MARTÍNEZ-SANZ, M. et al. Characterization of polyhydroxyalkanoates synthesized from microbial mixed cultures and of their nanobiocomposites with bacterial cellulose nanowhiskers. **New Biotechnology**, v.00, p. 1-13, 2013.

MARTÍNEZ-SANZ, M.; Lopez-Rubio, A.; Lagaron, J. M.; **Carbohydr. Polym**, 85, 228, 2011.

MESQUITA, J. P. **Nanocristais de celulose para preparação de bionanocompósitos com quitosana e carbonos nanoestruturados para aplicações tecnológicas e ambientais**. 2012. 165f. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2012.

MIMMS, A. Kraft pulping, a compilation of notes. Chemistry and process, 2ed. Atlanta. TAPPI PRESS, 1993. 58 - 73 p.

MOHITE, B. V.; PATIL, S. V. A novel biomaterial: Bacterial cellulose and its new era applications. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 61, n. 2, p. 101–110, 2014

MONDRAGON, G. et al. Bionanocomposites based on gelatin matrix and nanocellulose. **European Polymer Journal**, v. 62, p.1-9, 2015.

MOON, R. J. et al. Cellulose nanomaterials review: structure properties and nanocomposites. **Chemical Society review**, v. 40, n. 7, p. 3941-3994, doi: 10.1039/c0cs00108b, 2011.

MORAES, A. S.; GOES, T. S.; HAUSEN, M.; MORAIS, J. P. S.; ROSA, M. F.; DE MENEZES, A. J.; MATTOSO, L. H. C.; LEITE, F. L. **revista Matéria**, v.21, n.2, pp. 532 – 540, 2016.

MORAIS, J.P.S.; ROSA, M.F., FILHO; M.S.M.S., NASCIMENTO; L.D., NASCIMENTO, D.M.; CASSALES, A.R. Extraction and characterization of

nanocellulose structures from raw cotton linter. **Carbohydrate Polymers**, v.91, p.229– 235, 2013.

MOURA, Adriana. Silva. **Estudo Comparativo das Propriedades Mecânicas e Térmicas entre os Compósitos de PHB (polihidroxibutirato) Reforçados com Casca de Arroz ou Fibra de Coco**. 2014. 90 f. Dissertação (Mestrado em Integridade de Materiais da Engenharia) - Universidade de Brasília, Brasília, 2014.

MÜHLETHALE, K. The structure of bacterial cellulose, **Biochim. Biophys. Acta**, 3. p 527–535. 1949.

OUGIYA, H.; K. WATANABE; Y. MORINAGA; F. YOSHINAGA. **Biosci. Biotechnol. Biochem.** v. 61, p.1541. 1997.

OKSMAN, Kristina; MATHEW, Aji; BONDESO, Daniel; KVIEN, Ingvild. Manufacturing process of cellulose whiskers/polylactic acid nanocomposites. **Composites Science and Technology**, v.66, p. 2776-2784, 2006.

OLIVEIRA, R. L. **Preparação e caracterização de derivados celulósicos obtidos a partir da celulose bacteriana e obtenção de filmes para aplicações óticas**. Tese de Doutorado (Doutorado em Química) – Universidade Federal de Paulista, Araraquara, 2013.

OLSSON, L.; SOERENDEN, H. R.; DAM, B. P.; CHRISTENSEN, H.; KROGH, K. M.; MEYER, A. S. Separate and simultaneous enzymatic hydrolysis and fermentation of wheat hemicellulose with recombinant xylose utilizing *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 129, n. 1-3, p.117-129, p. 117-129, 2006.

OSHIMA, T., KONDO, K., OHTO, K., INOUE, K., & BABA, Y.. Preparation of phosphorylated bacterial cellulose as an adsorbent for metal ions. **Reactive and Functional Polymers**, 68, 376–383, 2008

PAKZAD, A.; YASSAR, R.S. **Mechanics of cellulose nanocrystals and their polymer composites**, **Advanced Structured Materials**, Disponível em: <<http://www.springerlink.com/content/?k=Mechanics+of+cellulose>>. Acesso em: 30 nov. 2015.

PAAKKO, M. et al. Enzymatic Hydrolysis Combined with Mechanical Shearing and High-Pressure Homogenization for Nanoscale Cellulose Fibrils and Strong Gels. **Biomacromolecules**, v.8, p.1934- 1941, 2007.

PANTZE, Anna. Studies of Ester Formation on a Cellulose Matrix. v. 18. p. 1402-1757. 2006.

PAKZAD, A.; YASSAR, R.S. **Mechanics of cellulose nanocrystals and their polymer composites**, **Advanced Structured Materials**. 2010. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/content/?k=Mechanics+of+cellulose>>. Acesso em: 30 nov. 2015.

PATENTS, E. Extract from the Register of European Patents About this file : **EP0025467**. p. 1–2, 2015.

PAULA, M. P. et al. Hidrólise ácida de celulose de sisal: estudos visando obtenção de nanofibras e de bioetanol. In: **10º CONGRESSO BRASILEIRO DE POLÍMEROS - CBPol**, Foz do Iguaçu, 2009.

PECORARO, É.; MANZANI, D.; MESSADDEQ, Y.; RIBEIRO, S. J. L. Bacterial cellulose from *gluconactobacter xylinus*: **Preparation, Properties and Applications. Monomers, Polymers and Composites from Renewable Resources**, p. 372, 2008.

PEDROSO, M. M. et al. Jacalin interaction with human immunoglobulin A1 and bovine immunoglobulin G1: affinity constant determined by piezoelectric biosensing. **Glycobiology**, v. 22, n. 3, p. 326-331, 2012.

PEI, Z. et al. Real-time analysis of the carbohydrates on cell surfaces using a QCM biosensor: a lectin-based approach. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 35, p. 200-205, 2012.

PENG, B. L. et al. Chemistry and applications of nanocrystalline cellulose and its derivatives: A nanotechnology perspective. Canadian. **Journal of chemical of chemical engineering**. v. 89, n. 5, p. 1191-1206, 6 out. 2011.

PEREIRA, Fabiano Vargas; EVERTON Luiz de Paula; MESQUITA João Paulo; LUCAS, Alessandra; MANO, Valdir. bionanocompósitos preparados por incorporação de nanocristais de celulose em polímeros biodegradáveis por meio de evaporação de solvente, automontagem ou eletrofiação. **Quim. Nova**, Vol. 37, No. 7, 1209-1219, 2014.

PERIN de Melo, J. **Síntese e caracterização de derivados da celulose modificada com anidridos orgânicos – adsorção e termodinâmica de interação com cátions metálicos**. 2007. Universidade Estadual de Campinas. 2007.

PESQUERO, N. C. **Estudo da equivalência entre a lectina ArtinM obtida a partir da semente da jaca e a sua forma recombinante na afinidade por glicanas**. 2010. 90 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2010.

PESQUERO, C. et al. Real time monitoring and kinetic parameter estimation of the affinity interaction of jArtinM and rArtinM with peroxidase glycoprotein by the electrogravimetric technique. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 26, n. 1, p. 36-42, 2010.

PICHOT, C. “**Surface-functionalized latexes for biotechnological applications**.” Current Opinion in COLLOID and INTERFACE SCIENCE. 9, 2004; Pg 213-221.

PODSIADLO, P.; CHOI, S.Y.; SHIM, B.; LEE, J.; CUDDIHY, M.; KOTOV, N.A. Molecularly engineered nanocomposites: layer-by-layer assembly of cellulose nanocrystals. **Biomacromolecules**, v. 6, n. 6, 2914-2918, 2005.

POLETTI, M.; PISTOR, V.; ZATTERA, A. J. Structural characteristics and thermal properties of native cellulose. In: van de VEN, T.; GODBOUT, L. **Cellulose: fundamental aspects** (Ed.). Rijeka: InTech, 2013. Chap. 2, p. 45-68.

PRASHANT R. CHAWLA, ISHWAR B. BAJAJ, SHRIKANT, A. SURVASE AND REKHA S. SINGHAL. Microbial Cellulose: Fermentative Production and Applications. **Food Technol. Biotechnol.** v.47 (2), p. 107–124, 2009.

QUA, E. H. et al. Preparation and characterization of cellulose nanofibres. **Journal of Materials Sciences**, v. 46, p.6029-6045, 2011.

REIMER, L.; **Transmission Electron Microscopy**, W.T. Rhodes (Ed.), Springer, Berlin, 1989.

RAJWADE, J. M.; PAKNIKAR, K. M.; KUMBHAR, J. V. Applications of bacterial cellulose and its composites in biomedicine. **Applied Microbiology and Biotechnology**, p. ASAP, 2015.

RIBEIRO-VIANA, Renato M., Paula C.S. Faria-Tischer, Cesar A. Tischer
Renato M. Ribeiro-Viana, Paula C.S. Faria-Tischer, Cesar A. Tischer.
Preparation of succinylated cellulose membranes for functionalization purposes. **Carbohydrate Polymers** 148 (2016) 21–28.

RICHMOND, T. Higher plant cellulose synthases. **Genome Biology**, v. 1, n. 4, p. 3001.1–3001.6, 2000.

RING, DF; NASHED, W; DOW, T. Liquid loaded pat for medical applications. **US Patents 4,588,400** .13 de may 1986.

RONDEAU-MOUR, C., Bizot ,H., Bertrand ,D. Chemometric analyses of the ¹H–¹³C cross-polarization build-up of celluloses NMR spectra: A novel approach for characterizing the cellulose crystallites. **Carbohydrate Polymers**, v. 84, p. 539–549, 2011.

ROSA, M. F.; MEDEIROS, E. S.; MALMONGE, J. A.; GREGORSKI, K. S.; WOOD, D. F.; MATTOSO, L.H.C.; GLENN, G.; ORTS, W.J.; IMAM, S.H. Cellulose nanowhiskers from coconut husk fibers: Effect of preparation conditions on their thermal and morphological behavior. **Carbohydrate Polymers**. v.81, p. 83–92, 2010.

ROSA, S.M.L. REHMAN, N. MIRANDA, M. I. G. NACHTIGALL, S. M. B. BICA, C. I. D. CHORINE-FREE. Extraction of cellulose from rice husk and whisker isolation. **Carbohydrate Polymers**. v. 87, p. 1131-1138, 2012.

ROSS, P. MAYER, R. BENZIMAN, M. Cellulose Biosynthesis and Function in Bacteria. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 55, p. 35-58, 1991.

ROSS P., R. Mayer, H. WEINHOUSE, D. Amikam, Y. Huggirat, M. Benziman, E. Devroom, A. Fidder, P. Depaus, L. Sliedregt, G. A. Vandermarel, J. H. Vanboom, J. **Biol. Chem.** 265, 18933. 1990.

SAITO, T. et al. Individualization of nano-sized plant cellulose fibrils by direct surface carboxylation using TEMPO catalyst under neutral conditions.

Biomcromolecules, v.10, n. 7, p. 1992-1996, doi: 10.1021/bm900414t, 2009

SANTOS, A. **Estudo da afinidade das proteínas Rtgmic1 e Rtgmic4 da Toxoplasma gondii com glicoproteínas utilizando técnica piezométrica.**

2012. 113 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2012.

SANTOS, Daniele Bueno. **Propriedades ópticas de suspensões coloidais e filmes à base de nanocelulose.** 2012. 82 f. Dissertação (Mestrado em

Química) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química, Araraquara 2012.

SANTOS, S. M.; CARBAJO, J. M.; QUINTANA, E.; IBARRA, D.; GOMEZ, N.; LADERO, M.; EUGENIO, M. E.; VILLAR, J. C. Characterization of purified bacterial cellulose focused on its use on paper restoration. **Carbohydr. Polym.**, v. 116, p. 173-181, Feb. 2015.

SANZ, M. M.; RUBIO, A. L.; LAGARON, J. L.; optimization of de nanofabrication by acid hydrolysis of bacterial cellulose nanowhisker.

Carbohydrate Polymers, v. 85, n. 1, p. 228-236, 2011.

SAMIR, M. A. S. A.; ALOIN, F.; DUFRESNE, A. Review of Recent Research into Cellulosic Whiskers, Their Properties and Their Application in Nanocomposite Field. **Biomacromolecules**, v. 6, p. 612-626, 2005

SAXENA , I.M., K. Kudlicka, K. Okuda, R.M. Brown Jr., Characterization of genes in the cellulose-synthesizing operon (acs operon) of Acetobacter xylinum: Implications for cellulose crystallization, **J. Bacteriol.** V. 176. p. 5735–5752. 1994.

SEGAL, L.; CREELY, J.; MARTIN, A.; CONRAD, C. An empirical method for estimating the degree of crystallinity of native cellulose using the X-ray diffractometer. **Text. Res. J.**, v. 29, p. 786-794, 1959.

SHEYKHNAZARI, S.; TABARSA, T.; ASHORI, A.; SHAKERI, A.; GOLALIPOUR, M. Bacterial synthesized cellulose nanofibers: Effects of growth times and culture mediums on the structural characteristics. **Carbohydrate Polymers**, v. 86, n. 3, p. 1187-1191, 2011.

SETYAWATI, M. I. CHIEN, L. J. LEE, C.K. Expressing Vitreoscilla hemoglobin in statically cultured Acetobacter xylinum with reduced O2 tension maximizes bacterial cellulose pellicle production. **Journal of Biotechnology**, v. 123, p. 38-43, 2007.

SILVA, D.J.; D'Almeida, M. L. Nanocristais de celulose - Cellulose whiskers. O PAPEL vol. 70, num. 07, p. 34 - 52, JUL 2009.

SILVA, D. J.; D'Almeida, M. L. O.; Koga, M.T. **Isolamento De Nanocristais A Partir De Pasta Celulósica Kraft Branqueada De Eucalipto.** Disponível em:

http://www.celsofoelkel.com.br/artigos/outros/02_Nanocristais%20de%20polpa%20eucalipto. Acesso em nov. 2015.

SILVA, D.J. e ALMEIDA, M. L. O. Cellulose whiskers. **IPT Peer-Reviewed Article**, 2009.) (SIQUEIRA, G.; BRAS, J.; DUFRESNE, A. Cellulos Bionanocomposites: A Review of Preparation, Properties e Applications. *Polymers*, V. 2, n. 4, p. 728-765, doi: 10.3390/polym2040728, 2010.

SILVA, J. B. A.; SANTOS, A. V.; VARGAS, F. P.; DRUZIAN, J. I. Preparação e caracterização de filmes de fécula de mandioca e *nanowhiskers* de celulose. **Anais** do 11º Congresso Brasileiro de Polímeros, Campos do Jordão, SP, Brasil, 2011.

SILVA, I.S.V. **Nanocompósitos de pectin reforçados com nanocristais de celuose para utilização como revestimento pra morangos**. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia MG, 2015.

SILVERIO, H. A. et al. Extraction and characterization of cellulose nanocrystals from corncob for application as reinforcing agent in nanocomposites. **Industrial Crops and Products**, v. 44, p. 427–436, 2013.

SIRÓ, I.; PLACKETT, D. Microfibrillated cellulose and new nanocomposite materials: A review. **Cellulose**, v.17, p.459-494, 2010.

SHAH, J. BROWN JR. R. M. Towards electronic displays made from microbial cellulose. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 66, n. 4, p. 352–5, 2005.

SHEN, W., CHEN, S., SHI, S., LI, X., ZHANG, X., HU, W., ET AL. Adsorption of Cu(II) and Pb(II) onto diethylenetriamine-bacterial cellulose. **Carbohydrate Polymers**, 75, 110–114, 2009.

SHODA, M., Y. Sugano. Recent advances in bacterial cellulose production. **Biotechnol. Bioprocess Eng**, v. 10, p. 1-8. 2005.

SIRÓ, I.; PLACKETT, D. Microfibrillated cellulose and new nanocomposite materials: A review. **Cellulose**, v.17, p.459-494, 2010.

SONIA, A.; PRIYA DASAN, K. Celluloses microfibrils (CMF)/poly (ethylene-co-vinyl acetate) (EVA) composites for food packaging applications: A study based on barrier and biodegradation behavior. **Journal of Food Engineering**, v. 118, n. 1, p. 78–89, 2013.

SOKOLNICKI, A. M. FISHER, R. J. HARRAH, T. P. KAPLAN, D. L. Permeability of bacterial cellulose membranes. **Journal of Membrane Science**, v. 272, p. 15–27, 2006.

SOUZA, Nágila Freitas. **Processos de obtenção de nanocelulose a partir das fibras da prensagem do mesocarpo do dendê**. 2014. 104 f. Tese

(Doutorado em Engenharia Química) - Universidade Federal do Ceará, Ceará, 2014.

SOUZA, N. F., PINHEIRO, J. A., SILVA, P., et al., "Development of chlorine-free pulping method to extract cellulose nanocrystals from pressed oil palm mesocarp fibers", **Journal Materials Bioenergy**, v. 9, pp. 372-379, 2015.

TAN, L. et al. In vitro study on the individual and synergistic cytotoxicity of adriamycin and selenium nanoparticles against Bel7402 cells with a quartz crystal microbalance. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 24, n. 5, p. 2268-2272, 2009.

TAHARA, N., M. Tabuchi, K. Watanabe, H. Yano, Y. Morinaga, F. Yoshinaga, **Biosci. Biotechnol. Biochem.** 61, 1862–1865, 1997.

TIAN, H.; TANG, Z.; ZHUANG, X.; CHEN, X.; JING, X. "Biodegradable synthetic polymers: Preparation, functionalization and biomedical application". **Progress in Polymer Science**. 2011. doi: 10.1016/j.progpolymsci.2011.06.004.

TROVATTI, E.; Serafim L, Freire CSR, Silvestre AJD, Neto CP. *Gluconacetobacter sacchari*: an efficient bacterial cellulose cellfactory. **Carbohydr Polym**; 86(3):1417 – 20. 2011.

VANDAMME, E. J.; BAETS S.; VANBAELEN, A.; JORIS, K.; WULF, P. Production of Bacterial Cellulose with Well Oriented Fibril on PDMS Substrate **Polym. Degrad. Stabil**, 59, 93, 1998.

VIETOR, R. MAZEAU, K. LAKIN, M. PÉRZ, S. A Priori Crystal Structure Prediction Of Native Celluloses. **Biopolymers**, v. 54, p. 342-354, 2000.

VISAKH, P.M.; THOMAS, S.; OKSMAN, K.; MATHEW, A.P. Cellulose Nanofibres and Cellulose Nanowhiskers Based Natural Rubber Composites: Diffusion, Sorption, and Permeation of Aromatic Organic Solvents. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 124, p. 1614-1623, 2012

WAN, Y. Z.; HONG, L.; JIA, S. R.; HUANG, Y.; ZHU, Y.; WANG, Y. L.; JIANG, H. J. Synthesis and characterization of hydroxyapatite–bacterial cellulose nanocomposites. **Composites Science and Technology**, v. 66, p. 1825- 1832, 2006.

WANG, S.; CHENG, Q.; RIALS, T. G.; LEE, S. H. Cellulose Microfibril/Nanofibril and its Nanocomposites. PACIFIC RIM BIO-BASED COMPOSITES SYMPOSIUM, 8., 2006, Tenesse. **Anais...Tennessee: University Tennessee**, 2006

WANG, Y., Y. L. JIANG, H. J. Synthesis and characterization of hydroxyapatite–bacterial cellulose nanocomposites. **Composites Science and Technology**, v. 66, p. 1825- 1832, 2006.

WANICHAPICHART, P. KAEWNOPPARAT, S. BUAKING, K. PUTHAI, W. Characterization of cellulose membranes produced by *Acetobacter xylinum*. Songklanakarin **Journal Science Technology**, v. 24, p. 855-862, 2002.

WEN-CHUN, Lin.; Chun-Chieh Lien, Hsiu-Jen Yeh, Chao-Ming Yu, Shan-hui Hsu. Bacterial cellulose and bacterial cellulose–chitosan membranes for wound dressing applications. **Carbohydrate Polymers**. v 94. p 603 – 611. 2013.

WESTLAND, J.A., G.S. Penny, R.S. Stephens, A.R. Winslow, Method of supporting fractures in geologic formations and hydraulic fluid composition for same. **US patent** 5350528, 1994.

YAMAMOTO, H.; HORII, R.; HIRAI, A. In situ crystallization of bacterial cellulose. II. Influences of different polymeric additives on the formation of celluloses I, and I, at the early stage of incubation. **Cellulose** 3: 229242. 1996

YANG, H. YAN, R. CHEN, H. LEE, D. H. ZHENG, C. Characteristics of hemicellulose, **Cellulose and Lignin Pyrolysis**. Fuel, v. 86, p.1781–1788, 2007.

YANO, H; NAKAGAITO, A. N. The effect of morphological changes from pulp fiber towards nano-scale fibrillated cellulose on the mechanical properties of high-strength plant fiber based composites. **Applied Physics A- -Materials Science & Processing**, n.78, n. 4, p. 547–552, 2004 .

YING Li, Shuang Qing, Jianhai Zhoua, Guang Yang. Evaluation of bacterial cellulose/hyaluronan nanocomposite biomaterials. **Carbohydrate Polymers**. v 103. p 496– 501. 2014.

YONG-HU, Wang; ZHAO Jun-fen; Wu YU-YING; Zhang XUE-MING. College of Materials Science and Technology, Beijing Forestry University. Ministry of Education Key Laboratory of Wood Materials Science and Application;; Preparation of Nano-cellulose and Its Enhancements on Paper. **J. Paper Science & Technology**, 2015.

YU, H-Y.; QIN, Z-Y. Surface grafting of cellulose nanocrystals with poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate). **Carbohydrate Polymers**, v. 101, p. 471– 478, 2014.

YU, X.; Atalla, R.H., Production of cellulose II by *Acetobacter xylinum* in the presence of 2,6-dichlorobenzonitrile, **Int. J. Biol. Macromol.** v.19. P 145–146. 1996.

ZANG S, ZHUO Q, CHANG X, QIU G, WU Z, YANG G. Study of osteogenic differentiation of human adipose-derived stem cells (HASCs) on bacterial cellulose. **Carbohydr Polym.** 2014; 104(15): 158–65.

ZARBIN, A. J. G., Química de (nano)materiais. **Química Nova**, v. 30, p.1469-1479, 2007.

ZHIMING, Liu, Xie Cheng (Key Laboratory of Bio-based Material Science and Technology of Ministry of Education, College of Material Science and Engineering, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China); Copper Chloride Catalyzing Preparation and Characterization of Nanocrystalline Cellulose J. **Guangdong Chemical Industry**, 2012

ZHONG, Cheng et al. Metabolic flux analysis of *Gluconacetobacter xylinus* for bacterial cellulose production. **Applied microbiology and biotechnology**, p. 1-11, 2013.

ZHU, J. Y.; ZHU, W.; BRYAN, O. P.; DIEN, B. S.; TIAN, S.; GLEISNER, R.; PAN, X. J. Ethanol production from sporl-pretreated lodgepole pine: preliminary evaluation of mass balance and process energy efficiency. **Applied microbiology and biotechnology**, v.86, n. 5, p. 1355-1365, 2010.