



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

GABRIEL JONATHAN SOUSA ANDRADE

**PRODUÇÃO E FUNCIONALIZAÇÃO DE NANOCELULOSES  
COM ARGININA COMO SUPORTE PARA  
NANOPARTÍCULAS DE PRATA**

---

Londrina  
2020

GABRIEL JONATHAN SOUSA ANDRADE

**PRODUÇÃO E FUNCIONALIZAÇÃO DE NANOCELULOSES  
COM ARGININA COMO SUPORTE PARA  
NANOPARTÍCULAS DE PRATA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Cesar Augusto Tischer

Londrina  
2020

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

A553p Sousa Andrade, Gabriel Jonathan Sousa Andrade.  
PRODUÇÃO E FUNCIONALIZAÇÃO DE NANOCELULOSES COM ARGININA COMO SUPORTE PARA NANOPARTÍCULAS DE PRATA / Gabriel Jonathan Sousa Andrade Sousa Andrade. - Londrina, 2019.  
66 f.

Orientador: Cesar Augusto Tischer .  
Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2019.  
Inclui bibliografia.

1. Nanocelulose Whisker - Tese. 2. Bactericida - Tese. 3. Nanopartícula de prata - Tese. 4. Arginina - Tese. I. Tischer , Cesar Augusto . II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. III. Título.

CDU 66

GABRIEL JONATHAN SOUSA ANDRADE

**PRODUÇÃO E FUNCIONALIZAÇÃO DE NANOCELULOSES  
COM ARGININA COMO SUPORTE PARA  
NANOPARTÍCULAS DE PRATA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

**BANCA EXAMINADORA**

---

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

---

Profa. Dra. Gizilene Maria de Carvalho  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Prof. Dr. Doumit Camilios Neto  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 29 de junho de 2020.

## RESUMO

Sousa Andrade, Gabriel. J. **Produção e funcionalização de nanoceluloses com arginina como suporte para nanopartículas de prata**. 2020. 60 f. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2020.

O polímero mais disponível na natureza conhecido como celulose é produzido essencialmente por árvores, plantas e algumas algas, e está presente nas paredes celulares desempenhando função de suporte estrutural, conferindo-lhes resistência, apresentando apenas ligações glicosídicas do tipo  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4). Há também microrganismos capazes de sintetizá-la originando um produto quimicamente idêntico à celulose vegetal (CV), como é o caso da bactéria gram-negativa *Komagataeibacter xylinus*, livre de hemiceluloses e lignina. A celulose, independente da origem, permite a modificação química conferindo-lhe novas propriedades. A hidrólise ácida parcial da cadeia de celulose nas regiões amorfas do polímero leva a formação de nanoestruturas fibrilares com características de cristal líquido, a nanocelulose (*whisker*). Neste trabalho o aminoácido arginina foi inserido por ligação covalente na estrutura das nanoceluloses vegetais e bacterianas, e posteriormente operou como agente redutor do sal de prata AgNO<sub>3</sub> produzindo nanopartículas de prata (npAg) inseridas nos *whiskers* de origem vegetal e bacteriana. Os produtos, a cada passo da estratégia de síntese, de produção de nanocelulose, derivatização com espaçador de ácido succínico, conjugação com arginina e redução da prata foram caracterizados por técnicas espectroscópicas (UV-Vis, FT-IR, DRX), térmicas (DSC) e de análise morfológica (MEV). Os *whiskers* produzidos de celulose vegetal (NCW-CV) e bacteriana (NCW-CB) foram capazes de formar suspensões estáveis que quando secas se organizam como filmes finos. Os filmes regenerados de NCW-CV e NCW-CB modificados com nanopartículas de prata foram comparados com solução de antibiótico a fim de avaliar sua atividade antimicrobiana através de antibiograma. As análises se mostraram coerentes com as modificações químicas ocorridas e o produto apresentou boa ação bactericida quando comparado ao antibiótico no teste de antibiograma, com uma razão de halo de inibição/diâmetro do disco de filme regenerado igual a 1,647 (filme de NCW contendo antibiótico); 2,695 (filme de NCW vegetal funcionalizado com arginina e npAg), 2,183 (filme de NCW bacteriana funcionalizado com arginina e npAg).

**Palavras-chave:** nanocelulose *whisker*; bactericida; nanopartícula de prata; arginina.

## ABSTRACT

Sousa Andrade, Gabriel. J. **Production and functionalization of nanocellulose with arginine as support for silver nanoparticles**. 2020. 60 p. Dissertação (Master on Biotechnology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2020.

The most available polymer in nature known as cellulose is produced essentially by trees, plants and some algae, and is present in the cell walls performing a structural support function, giving them resistance, presenting only  $\beta$ - (1  $\rightarrow$  4) glycosidic bonds . There are also microorganisms capable of synthesizing it, originating a product chemically identical to vegetable cellulose (CV), as is the case of the gram-negative bacteria *Komagataeibacter xylinus*, free of hemicelluloses and lignin. Cellulose, regardless of origin, allows chemical modification, giving it new properties. The partial acid hydrolysis of the cellulose chain in the amorphous regions of the polymer leads to the formation of fibrillar nanostructures with liquid crystal characteristics, the nanocellulose (whisker). In this work, the amino acid arginine was inserted by covalent bond into the structure of plant and bacterial nanocelluloses, and subsequently operated as a reducing agent for the silver salt AgNO<sub>3</sub>, producing silver nanoparticles (npAg) inserted in whiskers of plant and bacterial origin. The products, at each step of the synthesis strategy, of nanocellulose production, derivatization with succinic acid spacer, conjugation with arginine and silver reduction were characterized by thermal spectroscopic techniques (UV-Vis, FT-IR, DRX) (DSC ) and morphological analysis (SEM). Whiskers produced from vegetable cellulose (NCW-CV) and bacterial cellulose (NCW-CB) were able to form stable suspensions which, when dry, organize themselves into thin films. The regenerated NCW-CV and NCW-CB films modified with silver nanoparticles were compared with an antibiotic solution in order to evaluate their antimicrobial activity through antibiogram. The analyzes were consistent with the chemical changes that occurred and the product showed good bactericidal action when compared to the antibiotic in the antibiogram test, with an inhibition halo ratio / diameter of the regenerated film disc equal to 1.647 (NCW filler containing antibiotic; 2,695 (vegetable NCW film functionalized with arginine and npAg), 2,183 (bacterial NCW film functionalized with arginine and npAg).

**Keywords:** nanocellulose whisker; bactericidal; silver nanoparticle; arginine.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.	Interação de unidades de celulose a partir de ligações de hidrogênios intermoleculares e intramoleculares. ....	16
FIGURA 2.	Surgimento da película de celulose durante a produção de vinagre, em (A/C) com acidez total em torno de 3,0%, (B) acidez total em torno de 8,1% e (D) acidez total em torno de 8,7%. ....	18
FIGURA 3.	Imagem de Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM) da <i>Komagataeibacter</i> formando nanofibras e fitas de celulose, as setas indicam as nanofibras formadas. .... Fonte: (KLEMM et al., 2011) .....	19
FIGURA 4.	Representação da CeSA (a) extrudando a cadeia de celulose por biossíntese em cada subunidade, que se agrega como uma microfibrila; isto varia em altura e largura, e entre colchetes os valores para celulose de plantas. (b) Arranjo cristalino hexagonal que constitui o domínio organizado. (c) Microfibrila de cellulose onde estão representadas as regiões cristalinas, ordenadas e as cadeias desorganizadas, portanto amorfas. ....	20
FIGURA 5.	Figura esquemática da hidrólise ácida das unidades de anidrocetobioses. ....	22
FIGURA 6.	Imagem obtida por AFM, <i>whiskers</i> : unidades semelhantes a agulhas, com espessura em torno de 15 nm e comprimento de 400 nm. ....	23
FIGURA 7.	Imagem de <i>whiskers</i> em microscopia de transmissão eletrônica. ....	23
FIGURA 8.	Difração de raio-X de <i>whiskers</i> de nanocelulose produzidos em diferentes tempos de hidrólise ácida. ....	24
FIGURA 9.	Esquema das fases de cristais líquidos. Com o aumento da energia, por temperatura por exemplo, a ordem das estruturas diminui. ....	25
FIGURA 10.	Correlação da morfologia em camadas de nanocelulose gerando padrão de cor estrutural que varia de acordo com a	

orientação destas nanopartículas, à direita RCP, ou à esquerda LCP. A cor gerada depende da direção da luz.....	26
FIGURA 11. Fotografias de luz polarizada de membranas de nanoceluloses produzidas em diferentes condições gerando orientação à direita (RCP) ou à esquerda (LCP) o que leva a um comprimento de onda gerado por interação física, e às percepções de cor.....	26
FIGURA 12. a), Imagem em cores de azul iridescente da asa da borboleta <i>Morpho rhetenor</i> . (b), imagens de Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM) mostrando cortes transversais nas asas de <i>M. rhetenor</i> . (c), imagem de TEM de corte transversal de asa da espécie <i>M. didius</i> revela multicamadas com pouca interação. (d), luz incidente refletida entre as camadas de um material e mesma angulação entre planos de difração, ou (e), material de índice de refração diferente. ....	27
Fonte: NISE- Nanoscale Informal Science Education).....	27
FIGURA 13. Típica reação de esterificação da celulose .....	29
FONTE: (FARIA-TISCHER; RIBEIRO-VIANA; TISCHER, 2019) .....	29
FIGURA 14. Espectro de RMN-C <sup>13</sup> , celulose nativa na imagem superior e celulose modificada com agrupamento éster na imagem inferior .....	30
FIGURA 15. Variação de cor de acordo com o tamanho da nanopartícula de prata.....	32
Fonte: (BASTÚS et al., 2014).....	32
FIGURA 16. Estruturas dos complexos de prata com os ligantes Arg, Lys, His, Glu, Trp.....	34
FIGURA 17. Celulose bacteriana de origem industrial sem tratamento prévio para hidrólise ácida, visão lateral do aglomerado de CB (imagem a esquerda) e visão superior da CB (a direita).....	41
FIGURA 18. Proposta de mecanismo para a reação de succinilação.....	42
Fonte: Próprio autor .....	43
FIGURA 19. Proposta de mecanismo de funcionalização de celulose com a arginina, utilizando EDC e NHS em meio aquoso.....	44
FIGURA 20. Proposta de interação e complexação da nanocelulose funcionalizada com aminoácido ligada à prata.....	45

FIGURA 21. Imagem do filme regenerado de NCW-CB, evidenciando o surgimento de cor estrutural, semelhante ao ocorrido em asas de borboletas, por exemplo, dependendo do ângulo de visão pode se tornar transparente ou metalizado.....	46
FIGURA 22. MEV do filme regenerado NCW de origem bacteriana.....	47
FIGURA 23. MEV de criofatura do NCW CB (A) ampliado 800 x, (B) ampliado 1200 x, e (C) ampliado 24 mil vezes.....	47
FIGURA 24. MEV do NCW-CV ampliado 200x (A), 3000x (B) e 24 mil vezes (C) .....	48
FIGURA 25. Imagem do filme regenerado de NCW-CV.....	48
FIGURA 26. MEV da amostra de NCW-S-Arg-npAg-CB em (A) ampliada 200x, (B) ampliada 3000x e (C) ampliada 24 mil vezes. ....	49
FIGURA 27. Espectro de Ft-Ir da nanocelulose prístina CB.....	50
FIGURA 28. Espectro de Ft-Ir da NCW succinilada, em preto celulose vegetal e em vermelho celulose bacteriana .....	50
FIGURA 29. Espectro de Ft-Ir das NCW com grupo succínico e a Argina .....	51
FIGURA 30. Espectro de Ft-Ir dos materiais antes e após inserção de nanopartículas de prata.....	52
FIGURA 31. Espectro de FT-IR após a inserção das npAg.....	53
FIGURA 32. Solução de npAg obtida pelo método de redução por boro Hidreto.....	54
FIGURA 33. Espectro de Uv-vis da suspensão de (a) nanopartículas de prata, (b) NCW-S-Arg-npAg de origem bacteriana, (c) NCW-S-Arg-npAg de origem vegetal.....	55
FIGURA 34. Curva de DSC do NCW de origem laboratorial (em preto) e comercial (em vermelho).....	56
FIGURA 35. Curva de DSC do NCW succinilado, de origem bacteriana em preto, e origem vegetal em vermelho .....	57
FIGURA 36. Análise exploratória diferencial do NCW-S-Arg de origem laboratorial (em preto) e comercial (em vermelho).....	58
FIGURA 37. Análise exploratória diferencial do NCW-S-Arg-npAg de origem bacteriana (em preto) e vegetal (em vermelho).....	59
FIGURA 38. Difrátograma Comparativo entre amostras NCW-CV, NCW-CB, NCW-S-Arg-npAg-CB e NCW-S-Arg-npAg-CV.....	60

FIGURA 39. Difratoograma de npAg sintetizadas em membranas de celulose bacteriana a partir da imersão em Reativo de Tollen com diferentes concentrações molares, em preto CB nativa, vermelho CB imersa em Reativo de Tollen (0,01 M); em azul 0,03 M; e violeta 0,05 M. ....	60
FIGURA 40. Antibiograma, foi utilizado no disco de celulose bacteriana (BC+A) antibiótico como referência de inibição, (BC) disco controle, (C) filme regenerado de NCW-S-Arg-npAg de origem vegetal (D) filme regenerado de NCW-S-Arg-npAg de origem bacteriana. ....	63

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Correlação entre tamanho de nanopartícula e onda eletromagnética promovendo ressonância plasmônica.....	32
TABELA 2. Energia livres nos complexos de aminoácidos com Ag <sup>+</sup> . ....	33
TABELA 3. Frequências de estiramento do CO observadas nos espectros de Ft-Ir de algumas carbonilas binárias. ....	53
TABELA 4. Tabela dos picos (°2θ) .....	61
TABELA 5. Quantificação da fase cristalina (peso %) e tamanhos dos cristalitos (nm) dos produtos após inserção de prata. ....	62
TABELA 6. Dados de inibição das respectivas amostras de celulose bacteriana e vegetal .....	63

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CB:	Celulose Bacteriana.
CV:	Celulose Vegetal.
NCW-CV:	<i>whisker</i> de celulose vegetal.
NCW-CB:	<i>whisker</i> de celulose bacteriana.
npAg:	Nanopartícula de prata.
FT-IR:	Espectrometria do infravermelho com transformada de Fourier.
Uv-vis:	Espectroscopia no ultravioleta e visível.
DSC:	Calorimetria Exploratória Diferencial.
DRX:	Difração de raios X.
MEV:	Microscopia Eletrônica de Varredura.
NCW-Succi:	<i>Whisker</i> de celulose com grupo espaçador ácido succínico.
NCW-S-CV:	<i>Whisker</i> de celulose vegetal com grupo espaçador ácido succínico.
NCW-S-CB:	<i>Whisker</i> de celulose bacteriana com grupo espaçador ácido succínico.
NCW-S-Arg:	<i>Whisker</i> de celulose com grupo espaçador ácido succínico, e funcionalizado com arginina.
NCW-S-Arg-CV:	<i>Whisker</i> de celulose vegetal com grupo espaçador ácido succínico, e funcionalizado com arginina.
NCW-S-Arg-CB:	<i>Whisker</i> de celulose bacteriana com grupo espaçador ácido succínico, e funcionalizado com arginina.
NCW-S-Arg-npAg:	<i>Whisker</i> de celulose com grupo espaçador ácido succínico, e funcionalizado com arginina ligada à nanopartículas de prata.
NCW-S-Arg-npAg-CV:	<i>Whisker</i> de celulose vegetal com grupo espaçador ácido succínico, e funcionalizado com arginina ligada à nanopartículas de prata.
NCW-S-Arg-npAg-CB:	<i>Whisker</i> de celulose bacteriana com grupo espaçador ácido succínico, e funcionalizado com arginina ligada à nanopartículas de prata.

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	13
<b>2.</b>	<b>OBJETIVOS GERAIS</b>	15
<b>3.</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	16
3.1.	CELULOSE BACTERIANA	16
3.2.	CELULOSE, SUBPRODUTO NA PRODUÇÃO DO VINAGRE.	17
3.3.	WHISKER DE CELULOSE	21
3.3.1.	Produção e Caracterização de Nanocelulose Whisker.	21
3.4.	FENÔMENO DE IRIDESCÊNCIA NA NCW	24
3.5.	REAÇÕES COVALENTES À CELULOSE.	27
3.5.1.	Reações de Oxidação	28
3.5.2.	Reações de Esterificação:	28
3.5.3.	Identificação.	29
3.6.	NANOPARTÍCULAS DE PRATA: USO, SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO	30
3.6.1.	Técnica de síntese	31
3.6.2.	Caracterização	31
3.7.	ARGININA (ARG) COMO LIGANTE À PRATA: ALTERNATIVA DE SÍNTESE	33
<b>4.</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	35
4.1.	MATERIAIS UTILIZADOS E INFRAESTRUTURA	35
4.2.	MÉTODOS QUÍMICOS	35
4.2.1.	Obtenção da Nanocelulose por Hidrólise Ácida	35
4.2.2.	Succinilação da Nanocelulose (NCW-S).	35
4.2.1.	Funcionalização da Celulose com Arginina (NCW-S-Arg)	36
4.2.2.	Incorporação das Nanopartículas de Prata à Celulose com Aminas (NCW-S-Arg-npAg).	36
4.2.3.	Produção de Nanopartículas de Prata Pelo Método do Boro Hidreto (npAg).	37
4.3.	CARACTERIZAÇÃO DAS NANOCELULOSES PRÍSTINA E MODIFICADAS.	37
4.3.1.	Espectroscopia Infravermelha com Transformada de Fourier (FT-IR).	37

4.3.2.	Espectroscopia Uv-Vis. ....	37
4.3.1.	Análise Calorimétrica Exploratória Diferencial (DSC).....	37
4.3.1.	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	38
4.3.2.	Difração de Raio-X (DRX) .....	38
4.4.	ANTIBIOGRAMA DOS MATERIAIS FUNCIONALIZADOS.....	39
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> .....	<b>40</b>
5.1.	FORMAÇÃO DE NANOCELULOSES .....	40
5.2.	ADIÇÃO DO LINKER DE ANIDRIDO SUCCÍNICO: SUCCINILAÇÃO .....	42
5.3.	CONJUGAÇÃO DE NANOCELULOSES SUCCINILADAS COM AMINOÁCIDO ARGININA .....	43
5.4.	FORMAÇÃO DE NANOPARTÍCULA DE PRATA SOBRE A NANOCELULOSE.....	45
5.5.	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV).....	46
5.6.	ESPECTROSCOPIA INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FT-IR).....	49
5.7.	ANÁLISE DE UV-VIS DA SOLUÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA E DA SUSPENSÃO DO PRODUTO DE CELULOSE LIGADA ÀS NANOPARTÍCULAS DE PRATA.....	53
5.8.	CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC).....	55
5.9.	DIFRAÇÃO DE RAIOS-X.....	59
5.10.	ANTIBIOGRAMA .....	62
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>64</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Na área biotecnológica há grande interesse em desenvolver materiais e produtos que auxiliem na regeneração de tecidos humanos danificados. Atualmente a celulose é um material que pode ser aplicado para tal função. A celulose é uma macromolécula presente nas paredes celulares, conferindo-lhes resistência, portanto um polímero estrutural (SCHNEPP, 2013), pode ser encontrado em árvores, plantas e algumas algas, além de ser biossintetizado extracelularmente por algumas bactérias (MOON et al., 2011). A celulose bacteriana sintetizada pela bactéria gram-negativa *Gluconoacetobacter xylinus* apresenta uma estrutura linear e quimicamente idêntica a celulose vegetal, com ligações glicosídicas  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4), e sua presença é um empecilho na indústria do vinagre, já que as bactérias do ácido acético (BAA) compreendem os gêneros (*Acetobacter*, *Gluconobacter* e *Gluconoacetobacter*) e o biofilme quando gerado pela *Gluconoacetobacter* deteriora o vinagre originando depósitos e turbidez no produto final. Sua estrutura apresenta um arranjo cristalino bem organizado de 70 a 80%, elevada pureza em relação a vegetal pois é livre de hemiceluloses e lignina (KLEMM et al., 2005, 2006).

A cicatrização, mais especificamente nas células epiteliais é acelerada quando umedecida como demonstrou o estudo de (WINTER, 1962). A celulose bacteriana (CB) tem se mostrado adequada para tal função como já haviam demonstrado Jonas e Farah em 1998 (JONAS; FARAH, 1998) que trabalharam na eficácia da BC como um biofilme substituto temporário da pele. O material se mostrou eficaz na diminuição no desconforto pós-cirúrgico, acelerou a cicatrização, reduziu a taxa de infecções, alívio imediato da dor, e conseqüentemente menor tempo de tratamento diminuindo os custos. (CZAJA et al., 2007; FU et al., 2012).

Dentre os materiais mais estudados derivados da celulose se têm as nanoceluloses, que são nanofibras de celulose formadas de cristais de celulose, com espessuras entre 5-70 nm e com comprimento de até 100 nm. Estas nanofibras fibras, também conhecidas como *celulose whisker*, podem ser geradas a partir da hidrólise ácida de celuloses. Quando em escala nanométrica, a celulose apresenta hidrofiliabilidade, suscetibilidade à modificação química, biocompatibilidade e grande área de superfície característica de um nanomaterial. Outra característica relevante da nanocelulose é o fato de regenerar filmes nanoestruturados quando seca a partir de uma suspensão aquosa, recobrando a área de contato da suspensão com uma película, e sua espessura varia com a concentração inicial da suspensão.

Adjunto ao tratamento e recuperação de tecidos há o combate à infecção bacteriana. Até a década de 1860 a grande causa de óbitos pós-cirúrgica era a infecção por microrganismos, em 1865 o médico e pesquisador

Joseph Lister demonstrou que o fenol era um efetivo agente antisséptico o que reduziu as mortes por infecções. Um agente bem conhecido como bactericida são as partículas de prata, que desde 1000 a.C. já eram utilizadas como vasos para guardar água potável (SCHREURS; ROSENER, 1982). No entanto o tratamento por prata contínuo e prolongado causa obstrução das membranas celulares e conseqüentemente leva ao quadro de *Argyria*, uma doença irreversível caracterizada pelo escurecimento da pele. No entanto quando se usa nanopartículas de prata, não há danos aos organismos superiores, pois as nanopartículas podem se locomover entre as membranas sem causar danos aos organismos (LUAN et al., 2012). As nanopartículas de prata exibem atividade contra bactérias Gram-positivas e negativas, entre elas se encontram as gram-positivas *Staphylococcus Aureus*, *Enterococcus faecium*, a bactéria álcool-ácido resistente *Mycobacterium Tuberculosis*, e a gram-negativa *Streptococcus Pneumoniae*.

No presente trabalho celuloses de origem bacteriana do resíduo da indústria do vinagre, e nanocelulose comercial produzida a partir de celulose vegetal foram modificadas sequencialmente com anidrido succínico e arginina para incorporar nanopartículas de prata. Buscou-se com este trabalho obter uma suspensão capaz de formar um filme sobre a área de aplicação após secagem. Foi feito um comparativo entre as atividades bactericidas entre os produtos funcionalizados com arginina e npAg tanto de origem vegetal e bacteriana, visando agregação de valor ao resíduo da indústria do vinagre, e potencial aplicação em escala industrial

## 2. OBJETIVOS GERAIS

Produzir suspensões antibióticas incorporando nanopartículas de prata à nanoceluloses de origem bacteriana e vegetal funcionalizadas com o aminoácido arginina como agente redutor.

### Objetivos específicos

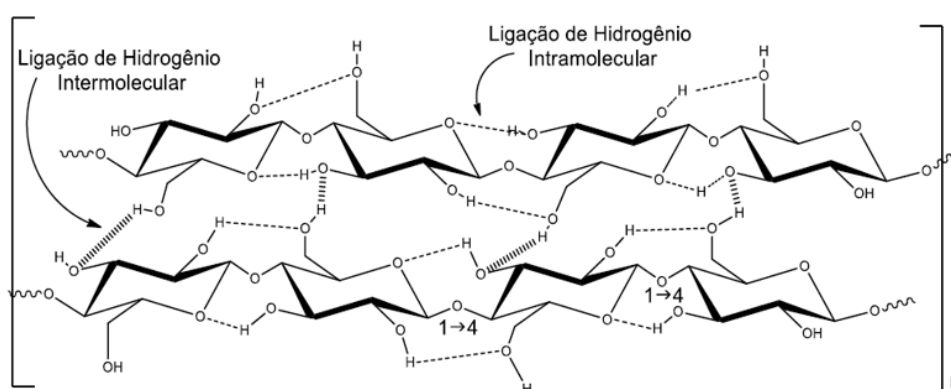
- Produzir e purificar a nanocelulose em escala laboratorial a partir de celulose bacteriana fornecida por indústria de produção de vinagre.
- Caracterizar a nanocelulose em relação à identidade estrutural e estabilidade térmica.
- Modificar as nanoceluloses de origem bacteriana e de planta com anidrido succínico.
- Funcionalizar a nanoceluloses succiniladas tanto de origem bacteriana como de planta com arginina.
- Formar nanopartículas de prata no arranjo estrutural das nanoceluloses modificadas e funcionalizadas.
- Caracterizar as nanoceluloses/nanopartícula de prata em relação à identidade estrutural e estabilidade térmica.
- Caracterizar a presença de npAg incorporadas no arranjo estrutural dos *whiskers*.
- Realizar antibiograma dos *whiskers* com nanopartículas de prata.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1. Celulose Bacteriana

A membrana de celulose originada por bactérias como a gram-negativa *Komagataeibacter xylinum*, anteriormente denominada *Gluconacetobacter xylinum*, apresenta uma estrutura linear e quimicamente idêntica a celulose vegetal, além da vantagem de ter alta qualidade em resistência mecânica, retenção de água, cristalinidade, biodegradabilidade, biocompatibilidade e ser quimicamente pura, livre de lignina, hemicelulose, pectina, assim como componentes que estão associados a polpa vegetal e componentes de origem animal (FU; ZHANG; YANG, 2013). As unidades de anidroglicose e as várias fibras constituintes da membrana de celulose bacteriana (CB) interagem entre si formando uma estrutura cristalina através de ligações de hidrogênio intramolecular e intermolecular, (FIGURA 1), resultando em uma alta compactação das fibras tornando-as insolúveis em água, no entanto passíveis de hidratação estabelecendo sua característica de alta capacidade de retenção de água (JOZALA et al., 2016).

FIGURA 1. Interação de unidades de celulose a partir de ligações de hidrogênios intermoleculares e intramoleculares.



Fonte: (OLIVEIRA et al., 2017)

A formação da CB é descrita pela formação da membrana na interface líquido/ar do meio de cultivo pelo complexo proteico celulose sintase, localizada no citoplasma da célula associada aos poros na superfície da mesma. Este

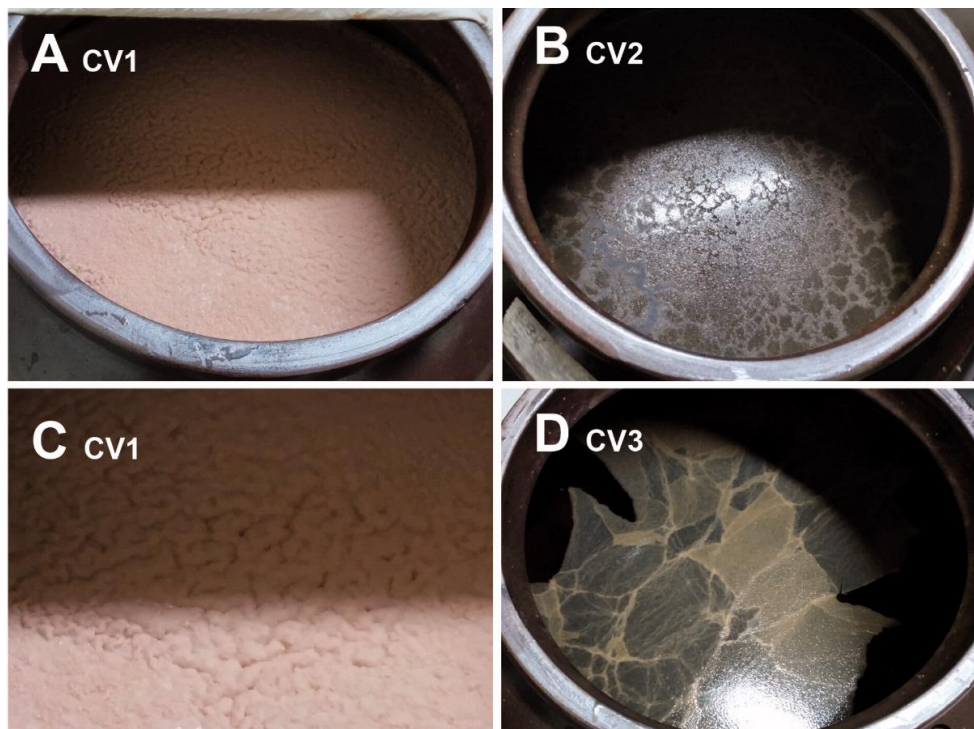
complexo extruda as cadeias nascentes que se agregam para formar fibrilas torcidas e depois cristalizam em configuração molecular de fita, conferindo à celulose bacteriana maior cristalinidade e menor grau de polimerização em relação à celulose vegetal. Sendo que este complexo enzimático é considerado o mais importante durante a síntese da membrana celulósica. Na literatura, os estudos da produção da CB são realizados a partir da análise das enzimas envolvidas no metabolismo da celulose e pela marcação isotópica de glicose delineando as relações de produto-precursor (CANNON; ANDERSON, 1991). As enzimas encontradas nos extratos brutos purificados são a glucoquinase, fosfoglucomutase, e a UDP-G pirofosforilase, possivelmente envolvidas na via que leva a síntese de celulose a partir da conversão de glicose em glicose-6-fosfato por intermédio da glucoquinase. Posteriormente por ação da fosfoglucomutase gerar glicose-1-fosfato que será convertida em UDP-Glucose pelo auxílio da UDP-glicose pirofosforilase, e na etapa final a UDP-glicose sendo convertida em celulose por meio da celulose sintase.

### **3.2. Celulose, subproduto na produção do vinagre.**

O vinagre é produzido por bactérias do gênero *Acetobacter*, mas contaminações com as bactérias do gênero *Komagataeibacter*, acabam sintetizando celulose. Esta condição consome a glicose do meio como fonte de carbono, formando dessa maneira uma película na superfície do vinagre, comumente conhecida como a “mãe do vinagre”, referindo-se ao método patenteado por Louis Pasteur em Dezembro de 1861 em que inoculava a película contendo as bactérias do ácido acético, no inglês AAB, também conhecido como inóculo do Método Orleans (BOURGEOIS; BARJA, 2009). A presença da *K. xylinus* nas cepas utilizadas na produção de vinagre altera o produto de interesse tornando-o turvo e superoxidado justamente pela presença da película de celulose (FIGURA 2), que tem papel importante na sobrevivência da *K. xylinus* ao proporcionar melhor adesão de oxigênio. No entanto eleva as concentrações de oxigênio do meio fermentativo, promovendo o estado de superoxidação do vinagre, formando dióxido de carbono e água. Outras funções da película de celulose para a *K. xylinus* é a proteção à luz Uv e desidratação (estes por último elevam a turbidez do vinagre). A frequência de contaminação no vinagre depende do método fermentativo empregado, podendo ser fermentação submersa ou superficial. No primeiro caso as contaminações são menos frequentes, pois no líquido fermentativo é injetado o oxigênio necessário para haver a formação do ácido acético por meio da oxidação do álcool, criando um sistema mais bem isolado do ambiente, além de ser mais eficiente com relação ao tempo de fermentação. No segundo método, mais difundido por ser mais barato, e por preservar os compostos voláteis, a oxidação ocorre na superfície do caldo fermentativo, onde as AABs consomem o oxigênio disponível na interface líquido/Ar, produzindo um vinagre

com seus compostos voláteis mais preservados. No entanto favorece a contaminação e surgimento da película de celulose. Na figura abaixo se pode observar um exemplo de contaminação durante a produção de vinagre em fermentação estática.

FIGURA 2. Surgimento da película de celulose durante a produção de vinagre, em (A/C) com acidez total em torno de 3,0%, (B) acidez total em torno de 8,1% e (D) acidez total em torno de 8,7%.



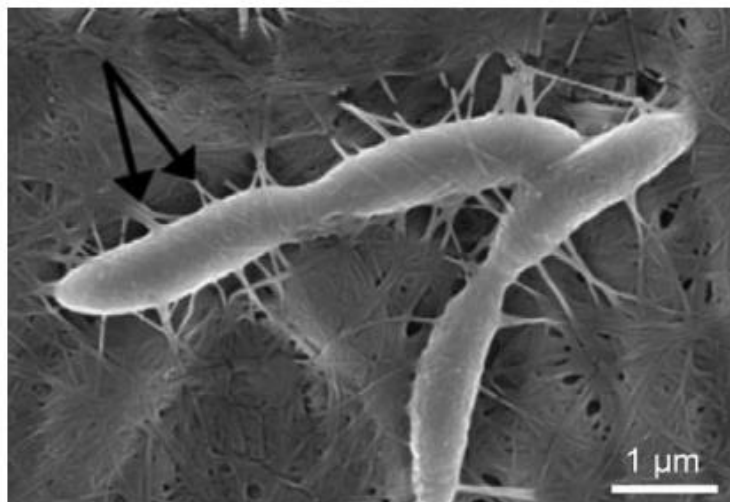
Fonte: (YUN; KIM; LEE, 2019)

A celulose produzida por bactérias (FIGURA 3) apresenta características únicas como alta cristalinidade, retenção de líquido, molhabilidade, biocompatibilidade e biodegradação, logo é de interesse sua produção em larga escala a custos menos elevados. Na literatura há pesquisas na produção de CB a partir de resíduos industriais de laticínios (CARREIRA et al., 2011; JOZALA et al., 2015), resíduos da fermentação de vinho de arroz (WU; LIU, 2013), melaço (ÇAKAR et al., 2014)

Em um estudo recente (REVIN et al., 2018) obteve um rendimento três vezes maior que o meio de cultivo padrão de Hestrin e Schramm utilizando a bactéria gram-negativa de *Gluconacetobacter sucrofermentans* B-11267, alcançando a marca de 6,19 g/L de CB a partir de vinhaça de trigo, um subproduto da indústria de etanol, com este estudo se pode observar uma relação de dependência do crescimento da *G. sucrofermentans* com o pH inicial variando diretamente com o substrato adicionado ao meio de cultivo. No

estudo de Revin, o meio de cultivo foi enriquecido com soro do leite (whey), um subproduto da indústria de laticínios, onde o pH aumenta com o crescimento da bactéria. Com esses resultados há uma promissora produção de baixo custo de CB a partir de resíduos da indústria fermentativa alcoólica e o resíduo da manufatura de queijos e requeijões (whey)

FIGURA 3. Imagem de Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM) da *Komagataeibacter* formando nanofibras e fitas de celulose, as setas indicam as nanofibras formadas.



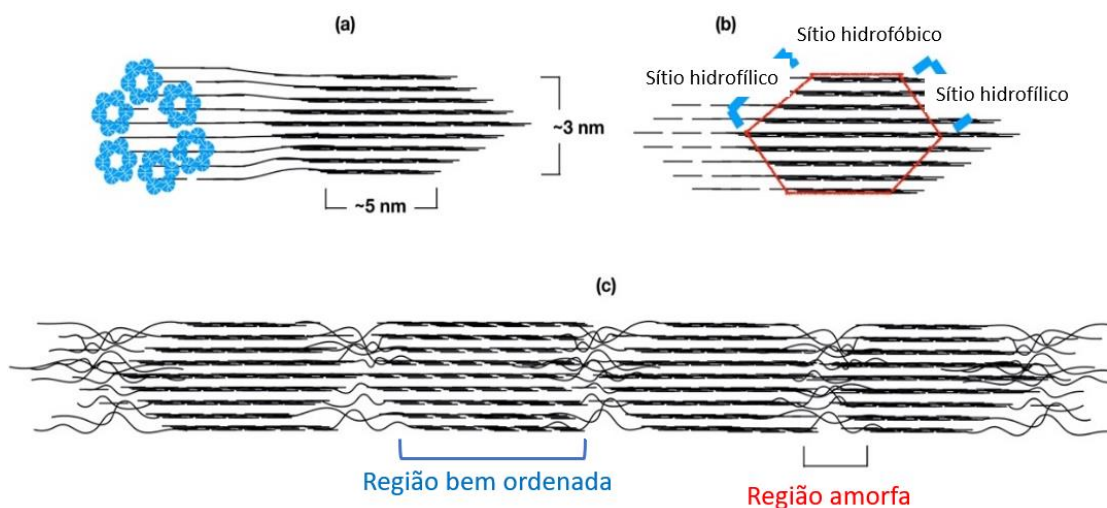
Fonte: (KLEMM et al., 2011)

Podem ocorrer alterações durante a fase de cristalização da celulose, a qual é produzida na CeSA (Cellulose Synthases), principal enzima bacteriana responsável pela síntese de celulose, que durante a síntese confere a BC regiões amorfas e regiões cristalinas. Na FIGURA 4 se pode notar as regiões bem ordenadas dos cristais de celulose impedindo que nela ocorra ataques químicos, no entanto em sua parte amorfa não apresenta tal resistência, permitindo que enzimas e ácidos possam romper esse retículo e produzir um material com maior proporção cristalina

A celulose produzida pela bactéria *K. xylinus* apresenta dois alomorfos, a celulose I e II, no entanto outros seis polimorfismos já foram caracterizados: I, II, III<sub>1</sub>, III<sub>11</sub>, IV<sub>1</sub>, IV<sub>11</sub> (Marchessault and Sarko, 1967; Walton and Blackwell, 1973; Marchessault and Sundararajan, 1983). A celulose I é a forma mais encontrada na natureza, apresentando duas formas diferentes: I $\alpha$  (triclínica) e I $\beta$  (monoclínica), a celulose tipo I exibe um padrão de cadeias paralelas, sendo a origem de cada uma o fator determinante da predominância entre as duas formas cristalinas (I $\alpha$  e I $\beta$ ), na celulose bacteriana há maior arranjos do tipo I $\alpha$ , em celulose vegetais a I $\beta$  estará mais presente (PERSSON; CHANZY; SUGIYAMA, 1991) e a partir da análise por difração de raio-X se pode verificar

os panos cristalográficos característicos de celulose tipo I $\alpha$ : (1 1 0), (0 1 0), e (1 0 0), sua cristalinidade pode ser verificada por meio do método de Segal, onde é calculada a razão entre halo amorfo presente em torno de 18,05° no difratograma e pico de maior cristalinidade. A celulose II apresenta microfibrilas que se orientam de forma antiparalela e pode ser obtida a partir da celulose I de duas maneiras distintas: a) regeneração, que é a solubilização da celulose I em um solvente seguida da precipitação por diluição em água gerando a celulose II e b) mercerização, impregnando as fibras nativas com hidróxido de sódio concentrado formando celulose II ao remover o hidróxido de sódio. Celulose III<sub>1</sub> e III<sub>11</sub> são formadas por um processo reversível a partir das celulosas I e II, respectivamente, ao tratá-las com amônia, e posteriormente removendo o excesso de amônia. Celulose IV<sub>1</sub> e IV<sub>11</sub> podem ser obtidas pelo aquecimento das celulosas III<sub>1</sub> e III<sub>11</sub> a 206°C(O'SULLIVAN, 1997).

FIGURA 4. Representação da CeSA (a) extrudando a cadeia de celulose por biossíntese em cada subunidade, que se agrega como uma microfibrila; isto varia em altura e largura, e entre colchetes os valores para celulose de plantas. (b) Arranjo cristalino hexagonal que constitui o domínio organizado. (c) Microfibrila de celulose onde estão representadas as regiões cristalinas, ordenadas e as cadeias desorganizadas, portanto amorfas.



Fonte: (GONÇALVES et al., 2020)

### 3.3. Whisker de Celulose

Quando a celulose nativa é tratada por ácidos dá origem ao material nanoparticulado conhecido na literatura como *whisker*, tendo morfologias e cristalinidades diferentes dependendo das condições do meio, apresentando novas características físicas de rigidez, espessura e de comprimento, graças aos seus domínios cristalinos de fibras celulósicas isoladas. Seu alto grau de ordenação, quando comparada em relação a celulose nativa, confere alta resistência mecânica, mudanças ópticas, magnéticas, ferromagnéticas, dielétrica, condutividade e maior superfície de contato, possibilitando novas reações químicas, assim melhorando processos de funcionalização do material (MOON et al., 2011).

#### 3.3.1. Produção e caracterização de Nanocelulose Whisker

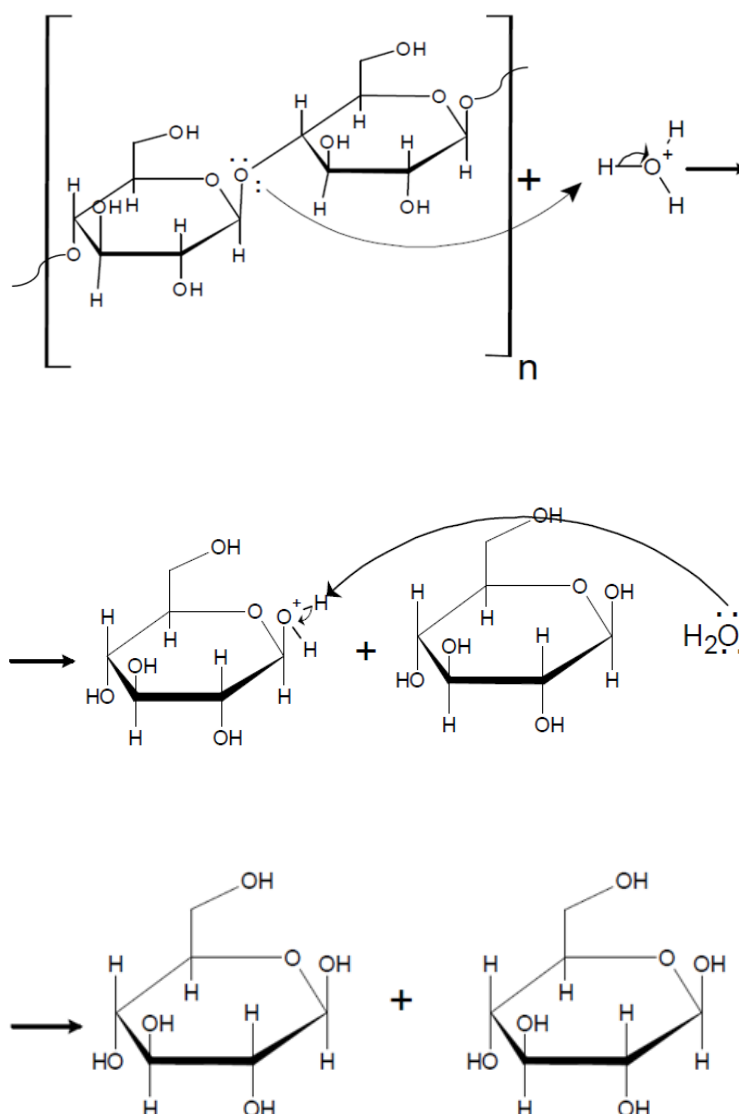
As celuloses de origem bacteriana apresentam em sua estrutura domínios cristalinos e amorfos, em comparação as CV a proporção de domínios cristalinos é mais elevada, ao serem tratadas com o método de hidrólise ácida, que consiste na submersão da celulose em H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 60% a 45°C durante 30 min (procedimento mais difundido) (MORÁN et al., 2008).

Os cátions hidroxônios adentram a estrutura polimérica a partir dos sítios amorfos realizando o rompimento de cadeia nesses sítios, conseqüentemente a estrutura celulósica é reduzida à pequenas sequências residuais cristalinas da estrutura polimérica dando origem aos *whiskers* de celulose bacteriana (FIGURA 5), sem a necessidade de outras etapas de tratamento como cloração, extração alcalina e branqueamento para a remoção de impurezas como lignina e hemiceluloses presentes na CV.

Uma outra alternativa química de obtenção de *whiskers* de celulose é a hidrólise enzimática, que assim como descrito a cima, atua nas porções amorfas para a cisão da cadeia polimérica, no estudo de (JANARDHAN; SAIN, 2006) foi possível isolar as microfibrilas de celulose com diâmetros entre 100 nm e 250 nm a partir de 4 dias de tratamento enzimático.

Além dos métodos citados acima, também é empregado o tratamento com solventes capaz de adentrar a estrutura celulósica, por exemplo N,N-dimetilacetamida (DMAc) com cloreto de lítio (LiCl) que facilita a separação das regiões cristalinas quando aliado à agitação da solução e conseqüente dispersão das fibras por meio de extrusão. Formam-se as nanopartículas (OKSMAN et al., 2006), no entanto a formação por meio de extrusão aliada ao solvente incorporado na estrutura, modifica o padrão das unidades cristalinas e conseqüentemente suas macro-propriedades.

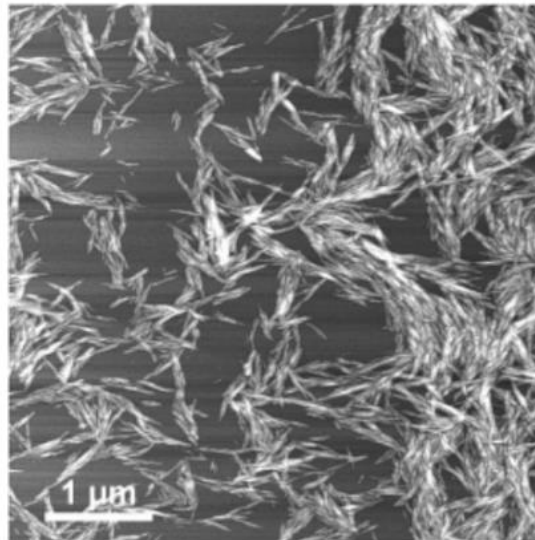
FIGURA 5. Figura esquemática da hidrólise ácida das unidades de anidrocetobioses.



Fonte: Próprio autor.

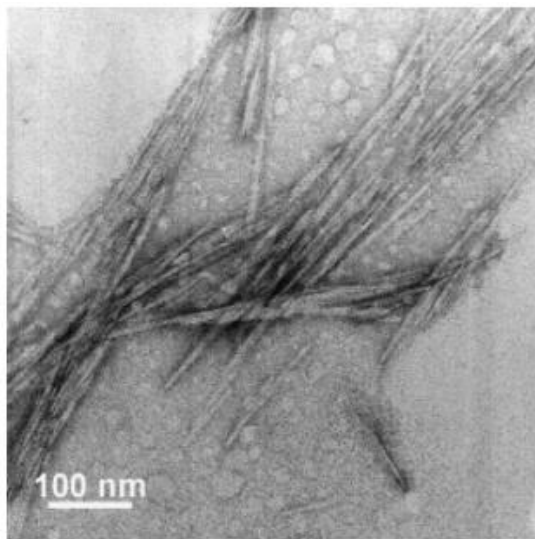
Para caracterizar morfologicamente os *whiskers* são utilizadas técnicas de espalhamento de luz e microscopia (FIGURA 6) e (FIGURA 7). Para avaliar o parâmetro de cristalinidade a técnica de Difração de Raios-X (FIGURA 8) é a mais utilizada.

FIGURA 6. Imagem obtida por AFM, *whiskers*: unidades semelhantes a agulhas, com espessura em torno de 15 nm e comprimento de 400 nm.



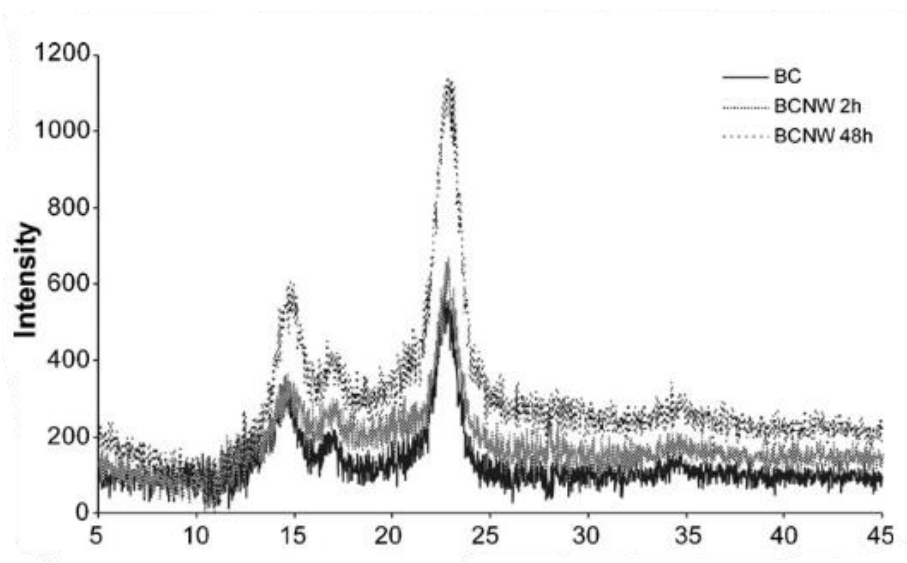
Fonte: (KVIEN; TANEM; OKSMAN, 2005)

FIGURA 7. Imagem de whiskers em microscopia de transmissão eletrônica.



Fonte: (KVIEN; TANEM; OKSMAN, 2005)

FIGURA 8. Difração de raio-X de whiskers de nanocelulose produzidos em diferentes tempos de hidrólise ácida.



Fonte: (MARTÍNEZ-SANZ; LOPEZ-RUBIO; LAGARON, 2011)

O interesse sobre esse material se deve as melhorias proporcionadas por ele como um material de reforço, no entanto sua biocompatibilidade e a possibilidade da formação de filmes é um atrativo para aplicações medicinais (HUBBE et al., 2008). Levando em consideração a atual aplicação da BC como um revestimento para feridas e melhorias no processo de cicatrização de queimaduras e lesões por pressão, o material *whisker* também pode ser empregado na medicina. Além de ser funcionalizado mais facilmente pelo fato de apresentar maior superfície de contato e grupos terminais redutores. Os quais podem ser preferencialmente explorados para a construção de novos nanocompósitos e dessa forma aumentar as propriedades intrínsecas da celulose bacteriana e adicionar novas propriedades como efeitos bactericidas.

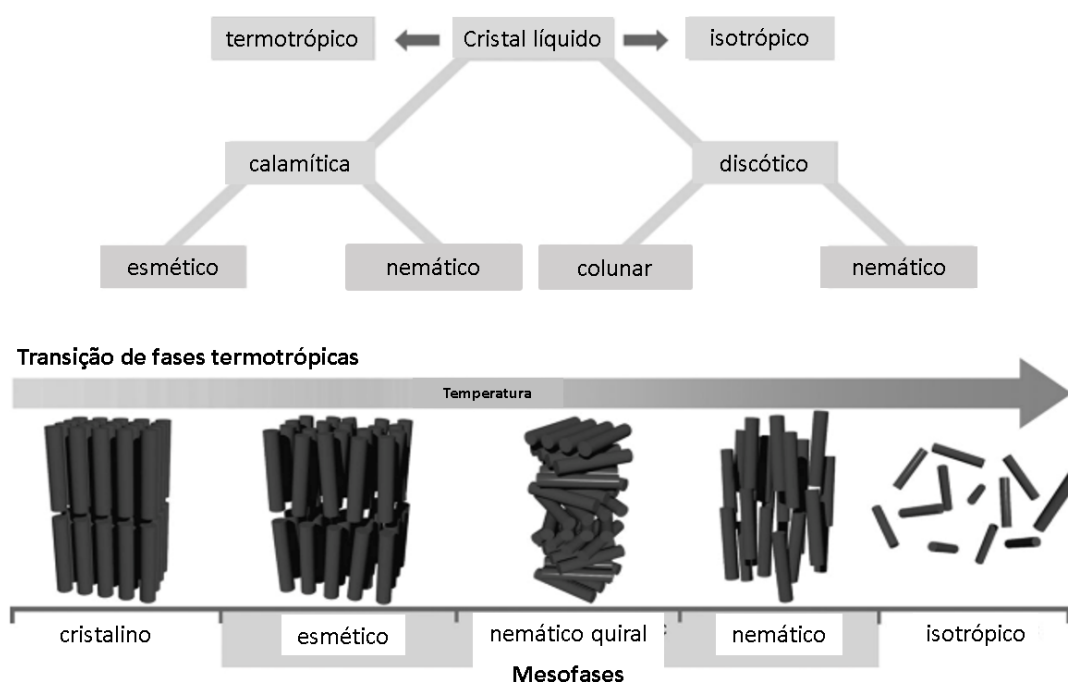
### 3.4. Fenômeno de iridescência na NCW

Além das cores geradas por pigmentação é sabido da existência de cores estruturais que são geradas por efeitos físicos a partir da interação da luz com a organização nanométrica de determinada estrutura, resultando na interferência construtiva da difração sobre a ordenação de tal estrutura. Diferente da cor química que é produto de absorção de fótons em comprimentos de onda específicos, a cor estrutural é gerada somente pelos efeitos ópticos superficiais. Escamas nas asas de borboletas, por exemplo, unidades de microfibras caracterizando uma estrutura em calhas ou lamelas,

geram sucessivas reflexões resultando em um efeito visual perceptível como cor.

As nanoceluloses são descritas como formadoras de cores estruturais (GUIDETTI et al., 2016; LAGERWALL et al., 2014), em que as camadas do cristal líquido nemático formado pelas nanopartículas podem refletir de forma seletiva certos comprimentos de onda. É definido como cristal líquido um fluido que seja um intermediário da ordenação das três dimensões correspondente ao sólido cristalino e a desordem da fase líquida. O cristal líquido é conhecido como *mesofase* e seus componentes moleculares são chamados de *mesógenos*, e se é observado uma ordenação dos eixos moleculares em direção a um vetor  $n$  diz-se que existe uma fase nemática formada pelos *mesógenos*. Definindo dessa maneira como um cristal líquido nemático (FIGURA 9).

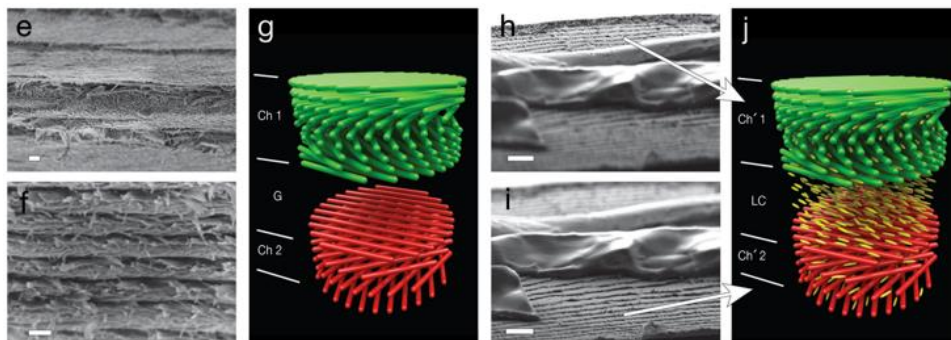
FIGURA 9. Esquema das fases de cristais líquidos. Com o aumento da energia, por temperatura por exemplo, a ordem das estruturas diminui.



Fonte: (GIESE et al., 2015) com alterações.

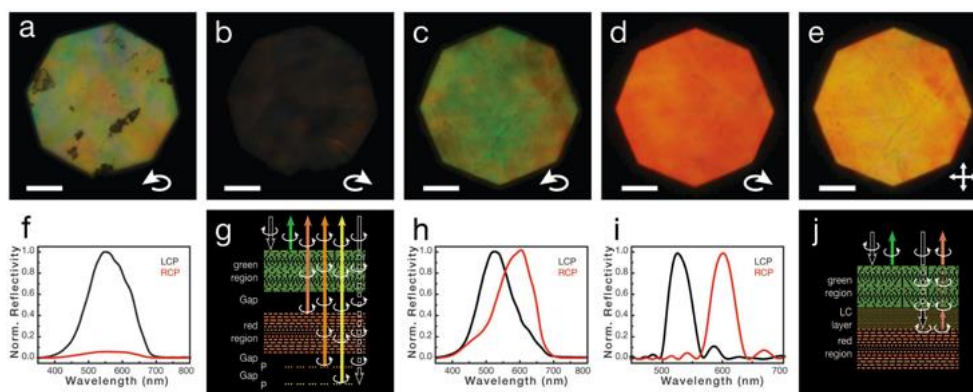
Quando há quiralidade nessas formas nemáticas o arranjo gerado tende a se ordenar de forma helicoidal (FIGURA 10), e a interação de ondas eletromagnéticas (FIGURA 11) com esse arranjo pode gerar tanto espalhamento quanto reflexão delas, estando diretamente relacionada com a distância de uma revolução de  $360^\circ$ , conhecido como passo da hélice.

FIGURA 10. Correlação da morfologia em camadas de nanocelulose gerando padrão de cor estrutural que varia de acordo com a orientação destas nanopartículas, à direita RCP, ou à esquerda LCP. A cor gerada depende da direção da luz.



Fonte: (FERNANDES et al., 2017)

FIGURA 11. Fotografias de luz polarizada de membranas de nanoceluloses produzidas em diferentes condições gerando orientação à direita (RCP) ou à esquerda (LCP) o que leva a um comprimento de onda gerado por interação física, e às percepções de cor.



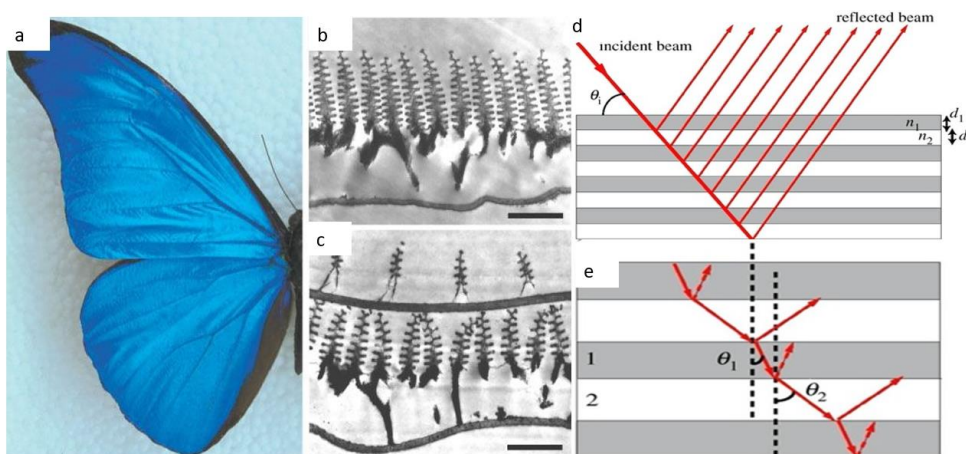
Fonte: (FERNANDES et al., 2017)

Este feito também é observado nas cores geradas nas asas de uma borboleta, o espaçamento entre as escamas que constituem as asas proporciona diferentes colorações, por exemplo na espécie *Blue Morpho*, o espaçamento próximo de  $0,5 \mu\text{m}$  confere uma coloração de azul intensa (FIGURA 12).

Em recentes pesquisas os passos de hélices são controlados a fim de permitir alternância entre reflexões de luz polarizada tanto para a esquerda

LCP e direita RCP ao inferir temperatura específica e campo magnético para alterar o arranjo dos *mesógenos* (FERNANDES et al., 2017), se tornando um importante material tecnológico na aplicação de displays em computadores portáteis, telefones celulares, câmeras fotográficas e televisores (ELY et al., 2007).

FIGURA 12. a), Imagem em cores de azul iridescente da asa da borboleta *Morpho rhetenor*. (b), imagens de Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM) mostrando cortes transversais nas asas de *M. rhetenor*. (c), imagem de TEM de corte transversal de asa da espécie *M. didius* revela multicamadas com pouca interação. (d), luz incidente refletida entre as camadas de um material e mesma angulação entre planos de difração, ou (e), material de índice de refração diferente.



Fonte: NISE- Nanoscale Informal Science Education).

### 3.5. Reações covalentes à celulose

Na celulose há grupos hidroxilas que permitem a inserção de novos compostos, agregando-a novas propriedades. Portanto, muitos grupos de pesquisadores fizeram esforços para conjugar diferentes moléculas em celulose bacteriana, a fim de alterar seus atributos (FARIA-TISCHER; RIBEIRO-VIANA; TISCHER, 2019) (KIM; NISHIYAMA; KUGA, 2002) (WU et al., 2014) (KHAN et al., 2015) (OLIVEIRA et al., 2017) (BRISOLA JULIANO, 2018). Quimicamente, existem três fatores que dificultam a modificação covalente da celulose: sua solubilidade em qualquer solvente comum, a extensa rede de ligações de hidrogênio e a baixa reatividade do hidroxil como nucleófilo (GARDNER et al., 2008; PINKERT et al., 2009). As duas primeiras desvantagens mencionadas anteriormente estão correlacionadas: a grande

extensão da ligação de hidrogênio na estrutura da celulose torna menos suscetível a realizar outras interações com moléculas de solvente, mesmo as polares, como a água ou o DMSO.

Após selecionar a abordagem apropriada para funcionalizar a celulose, em fase homogênea ou heterogênea, um grupo espaçador adequado deve ser selecionado. Realizar uma ligação covalente entre qualquer aminoácido, proteína nativa - ou outro composto passível de esterificação, por exemplo - diretamente à celulose é praticamente impossível pela incompatibilidade dos grupos funcionais de ambos. Assim, a seleção do grupo espaçador é o primeiro passo para imobilizar quase qualquer molécula de interesse biomédico na estrutura da celulose. Muitas estratégias foram descritas até agora, como carbamatação (LIU et al., 2014), substituição nucleofílica, eterificação, sililação, clivagem oxidativa, entre outras

Contudo, entre as que apresentam maior relação efetividade/complexidade pode-se destacar:

- - Oxidação;
- - Esterificação.

### 3.5.1. Reações de Oxidação

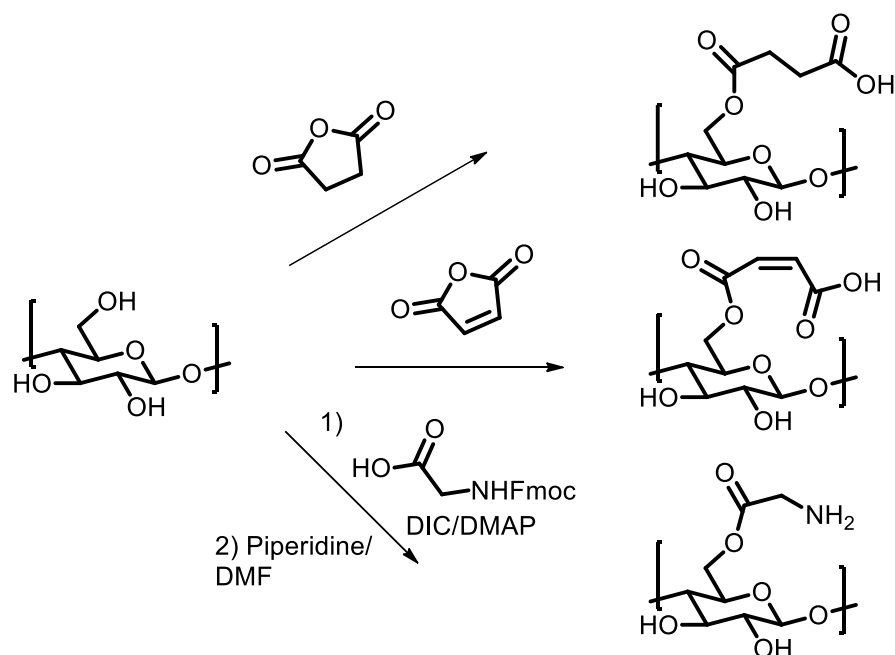
A Oxidação promove mudança na estrutura da celulose com grupos químicos que permitam uma futura conjugação na carboxila gerada (DAVIS; FLITSCH, 1993). O reagente de TEMPO por exemplo (radical 2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-oxil) é um reativo capaz de oxidar regioseletivamente a hidroxila primária (OH-6), transformando-a em ácido carboxílico (Davis & Flitsch, 1993). Nooy et al foram os primeiros a demonstrar a versatilidade do TEMPO na geração de ácidos carboxílicos a partir de hidroxilas primárias de polissacarídeos de maneira branda e em meio aquoso (de Nooy et al, 1995). O sistema reativo mais comum consiste em TEMPO / NaBr / NaClO em meio alcalino. Basicamente, o mecanismo consiste em usar o TEMPO como agente oxidante final, em quantidade catalítica, e NaBr e NaClO responsáveis por manter o TEMPO em sua forma ativa, reciclando-o, ao oxidar sua forma reduzida.

### 3.5.2. Reações de Esterificação:

O método de esterificação (FIGURA 13) é o mais empregado para modificar ou inserir grupos espaçadores na estrutura da celulose, ligando ácidos carboxílicos ao grupo hidroxila do carbono-6 presente na celulose. Após esterificação a cadeia de celulose torna-se suscetível à incorporação de agrupamentos aminas, do bem como é possível adicionar moléculas maiores

de proteínas e enzimas, como o colágeno e lipase. No trabalho de Ribeiro (2016) foi utilizado celulose succinilada devido a presença do grupo carboxila inserido no biopolímero (RIBEIRO-VIANA; FARIA-TISCHER; TISCHER, 2016a)

FIGURA 13. Típica reação de esterificação da celulose



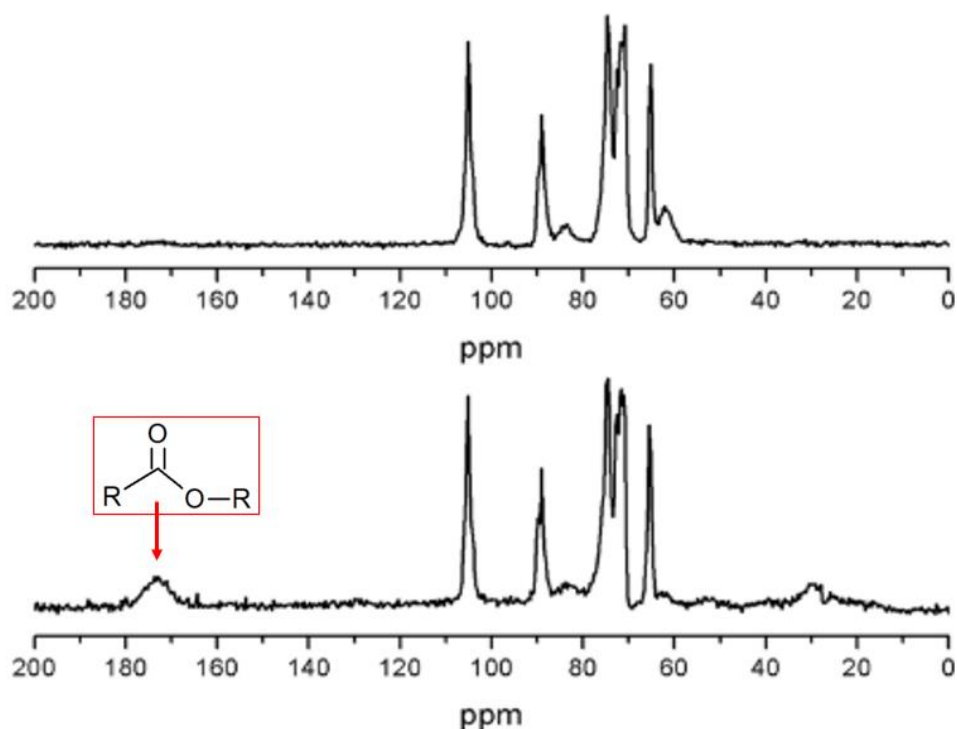
FONTE: (FARIA-TISCHER; RIBEIRO-VIANA; TISCHER, 2019)

Entre os grupos que podem ser conjugados à celulose modificada, destacam-se moléculas de proteínas e aminoácidos, por apresentarem relevância na área médica e possuírem grupos funcionais que podem ser usados na conjugação, como por exemplo aminas, ácidos carboxílicos, tióis e sua conjugação geralmente utiliza das aminas presentes nas moléculas. Uma maior quantidade de agrupamentos aminas em uma molécula, leva à um bom rendimento na conjugação. Entre os aminoácidos se destacam a arginina, lisina, asparagina e histidina, por apresentarem mais que um agrupamento R<sub>2</sub>-N-H (R=C ou H) ligada a cadeia carbônica.

### 3.5.3. Identificação.

O produto éster formado pode ser identificado por meio espectroscopia de infravermelho (Ft-Ir) e ressonância magnética nuclear (RMN) FIGURA 14, os grupos ésteres formados são identificados na Ft-Ir pela forte banda entre 1710 e 1750 cm<sup>-1</sup> e em <sup>13</sup>C RMN-pelo pico característico de carbonila de éster próximo de 170 e 180 ppm (FIGURA 14).

FIGURA 14. Espectro de RMN- $C^{13}$ , celulose nativa na imagem superior e celulose modificada com agrupamento éster na imagem inferior



### 3.6. Nanopartículas de Prata: uso, síntese e caracterização

A prata em sua forma coloidal (partículas apresentando dimensões de 10 nm a 100 nm) exibe alta superfície de contato, no entanto não apresenta efeito colateral nos organismos superiores quando comparada as doses mínimas necessárias para atividade bactericida. Isso se deve ao fato de que as nanopartículas de prata estão tão finamente dispersas e com baixa concentração circulando livremente pelas membranas dos organismos superiores. Sua concentração efetiva contra microrganismos é de  $75 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  (MORONES et al., 2005) e a concentração tóxica de prata em organismos superiores é de 125 mg/Kg causando danos ao fígado, como evidenciado pelo estudo de (KIM et al., 2010). As nanopartículas de prata exibem atividade contra bactérias Gram-positivas e negativas, entre elas se encontram as *Staphylococcus Aureus*, *Enterococcus Fuecim*, *Mycobacterium Tuberculosis* e *Streptococcus Pneumoniae*. Dentre os metais que apresentam propriedades bactericidas a prata se destaca frente ao mercúrio, cobre e cádmio por exibir grande atividade bactericida, no entanto com menor toxicidade quando comparada a estes. (RATYAKSHI; CHAUHAN, 2009). Sua atividade antimicrobiana depende diretamente do tamanho das nanopartículas de prata (npAg) sintetizadas, forma e carga da superfície, tais parâmetros estão associados aos métodos de preparação. Há uma variedade de métodos para a síntese da npAg tais como redução química, métodos físicos como a produção

das npAg por ablação a laser, aquecimento dielétrico por micro-ondas, irradiação ultrassônica e radiólise.

### 3.6.1. Técnica de síntese

A síntese de npAg é mais comumente realizada pelo método de redução química, que consiste em reagir o nitrato de prata com uma solução fortemente redutora, como borohidreto de sódio ou um redutor orgânico como o citrato de sódio. No primeiro método há pouca agregação das partículas, suas dimensões de nanopartículas formadas se encontram em torno de 5 a 20 nm de diâmetro no entanto elas são menos estáveis em meio contendo eletrólitos. Porém pelo método de redução por citrato de sódio, as partículas apresentam maior agregação, as nanopartículas geradas apresentam diâmetro de 50 a 100 nm, no entanto são mais estáveis na presença de eletrólitos (GARCIA, 2011a). A metodologia química aplicada nesses processos geralmente apresenta reagentes que exigem etapas de purificação e levam a passivos ambientais, visto isso, novos processos de síntese vêm sendo pesquisados para promover uma produção de nanopartículas mais amigáveis com relação ao meio ambiente (SHANKAR; RHIM, 2016).

### 3.6.2. Caracterização

A caracterização das npAg é feita comumente por análise do espectro de Uv-Vis, esse método é baseado no fenômeno de ressonância da banda plasmônica, geralmente observado em nanopartículas metálicas. Uma onda eletromagnética incidida sobre as partículas promove ressonância, oscilando as nuvens eletrônicas, transformando as ondas eletromagnéticas em energia térmica (NOGUEZ, 2007). Diferentes estruturas levam à modos vibracionais específicos, resultando em diferentes espectros de absorção, nas partículas entre 1-30 nm surgem efeitos como excitação coletiva dos elétrons livres, transição entre e inter bandas e dispersão da superfície, tais efeitos são relevantes no modo vibracional resultante pela energia absorvida a partir de uma onda eletromagnética específica.

Diferentes tamanhos de npAg exibem diferentes comprimentos de onda absorvidos, como pode ser observado pela tabela a seguir.

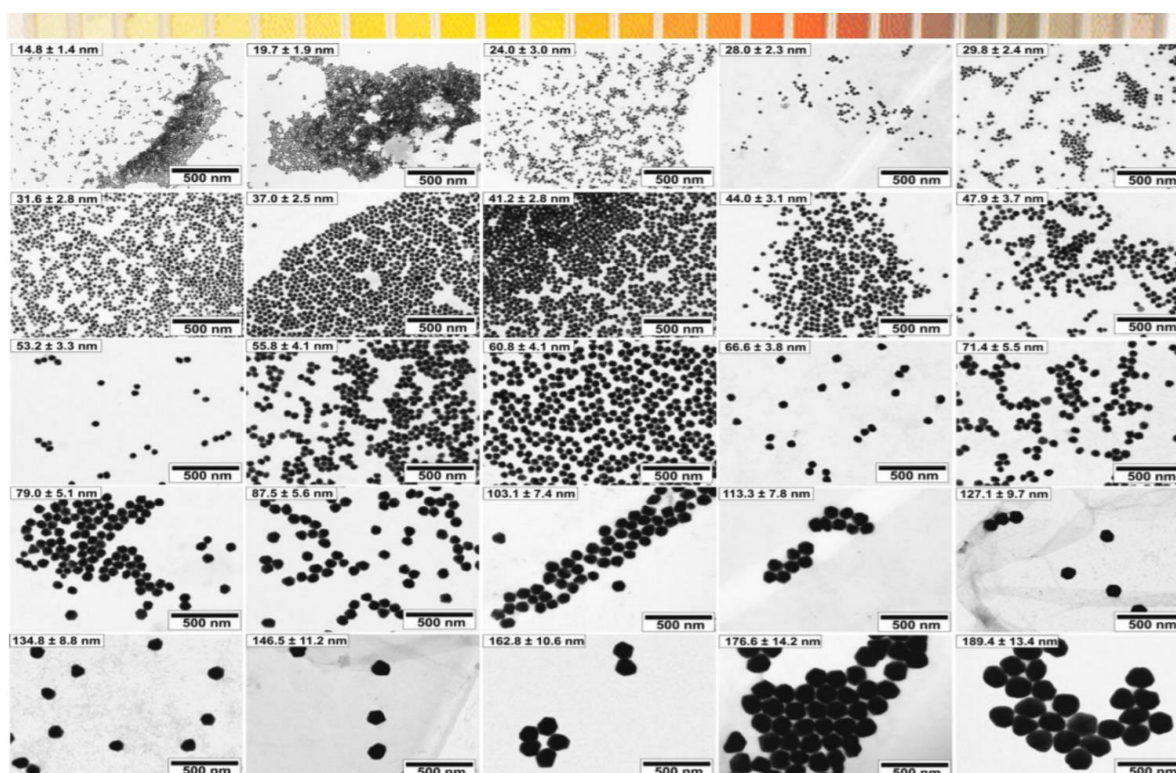
TABELA 1. Correlação entre tamanho de nanopartícula e onda eletromagnética promovendo ressonância plasmônica.

Tamanho de partícula (nm)	Comprimento de onda (nm)
5 – 10	380-390
10 - 14	395 - 405
35 – 50	420 – 435
60 – 80	438 - 450

Fonte:(SOLOMON et al., 2007)

De maneira mais evidente este fenômeno da variação do comprimento de onda absorvido pode ser visto pelas radiações refletidas. Bastús et al (2014) sintetizaram nanopartículas de prata por redução com citrato de sódio em diferentes condições, levando a um gradiente de cores que está diretamente relacionado com o tamanho da partícula (FIGURA 15) (BASTÚS et al., 2014).

FIGURA 15. Variação de cor de acordo com o tamanho da nanopartícula de prata.



Fonte: (BASTÚS et al., 2014)

### 3.7. Arginina (Arg) como ligante à prata: alternativa de síntese

O uso de substâncias ativas biologicamente é uma alternativa para uma química verde. O uso de aminoácidos como agentes redutores e por fim produção de npAg foi evidenciado por (SHANKAR; RHIM, 2016). A utilização de triptofano e tirosina no processo de síntese de npAg e posterior aplicação em ágar, promoveu a atividade bactericida do mesmo. O tamanho de nanopartículas de prata alcançado para os dois aminoácidos foi diferente com diâmetros de 15 e 20 nm para tirosina e triptofano respectivamente.

Além dos fatores fisiológicos, a Arg apresenta uma interação inorgânica com metais, atuando como uma base de Lewis por apresentar pares de elétrons disponíveis em seus agrupamentos amins e carboxila, tal característica permite a ligação com orbitais não ocupados de metais de transição, produzindo um complexo metálico. Em sistemas biológicos, complexos metálicos de peptídeos e proteínas desempenham importantes processos no metabolismo. O cobre (I) por exemplo, apresenta interação coordenada com diversos aminoácidos e pequenos peptídeos (SHOEIB et al., 2001). E assim como o cobre a prata (I) apresenta a mesma configuração eletrônica ( $d^{10}$ ). Estudos demonstram a interação de diversos aminoácidos que interagem com íons metálicos como a prata (SHOEIB et al., 2001; SHOEIB; SIU; HOPKINSON, 2002).

Dentre os complexos formados e estudados entre aminoácidos e a prata, Arg apresenta a maior afinidade, com uma entalpia de ligação em sua forma neutra de  $-80,5 \text{ kcal.mol}^{-1}$  a 298 K e energia livre de  $-70,3 \text{ kcal.mol}^{-1}$ , e sua forma de zwitteríon é semelhante, exibindo valores de  $\Delta H = -80,4 \text{ kcal.mol}^{-1}$  e  $\Delta G = -73,0 \text{ kcal.mol}^{-1}$ , o aminoácido é seguido em ordem de afinidade por Lys, His, e Glu, como pode ser observado na tabela abaixo.

TABELA 2. Energia livres nos complexos de aminoácidos com  $\text{Ag}^+$ .

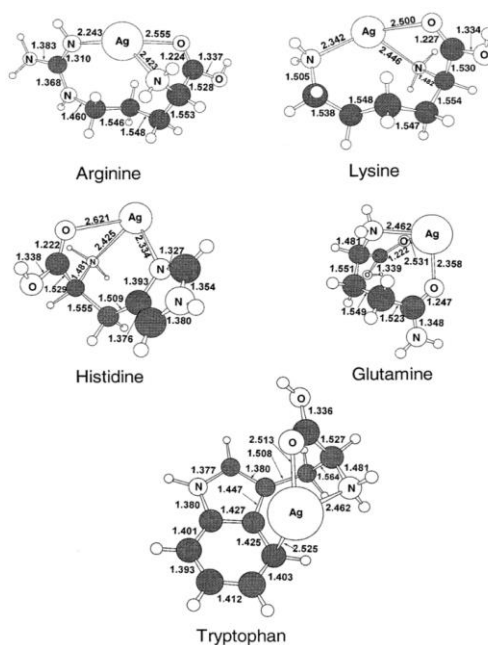
Amino ácido	$-\Delta G (298)$
<b>GLICINA</b>	40.7
<b>ALANINA</b>	42.3
<b>VALINA</b>	43.3
<b>LEUCINA</b>	44.4
<b>ISOLEUCINA</b>	45.2
<b>SERINA</b>	45.5
<b>CISTEÍNA</b>	46.5
<b>ASPARTICO</b>	47.6
<b>TREONINA</b>	47.8
<b>PROLINA</b>	47.8
<b>FENILALANINA</b>	47.5
<b>GLUTÂMICO</b>	48.6

<b>TIROSINA</b>	48.4
<b>ASPARAGINA</b>	52.0
<b>TRIPTOFANO</b>	53.0
<b>METIONINA</b>	52.6
<b>GLUTAMINA</b>	54.0
<b>HISTIDINA</b>	59.6
<b>LISINA</b>	62.4
<b>ARGININA- R(NEUTRA)</b>	70.3
<b>ARGININA- R(ZWITTERION)</b>	73.0

Fonte: (SHOEIB; SIU; HOPKINSON, 2002)

A Arg apresenta uma estrutura tricoordenada quando complexada com o íon monovalente de prata (Ag), uma ligação é formada pela interação do nitrogênio terminal, uma do oxigênio da carboxila, e por fim uma com o nitrogênio da amida, como é possível observar na figura a baixo (FIGURA 16), nela também é exemplificada as estruturas possíveis para complexos de prata formados pelos aminoácidos de lisina (Lys), histidina (His), glutamina (Glu) e triptofano (Trp).

FIGURA 16. Estruturas dos complexos de prata com os ligantes Arg, Lys, His, Glu, Trp.



Fonte (SHOEIB; SIU; HOPKINSON, 2002)

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Materiais utilizados e infraestrutura

A celulose bacteriana foi obtida do resíduo de indústria de vinagre doado pela empresa Don Spinosa Ltda., material este nunca seco, mas com a umidade padronizada por centrifugação da membrana em tubos cônicos com filtro durante 20 min a 5600 rpm, descartando o excesso de água das membranas, então foram pesadas em balança analítica.

Os experimentos foram realizados no laboratório 341 no departamento de bioquímica e biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina.

Os reagentes EDC (Cloridrato de N- (3-dimetilaminopropil) -N'-etilcarbodiimida) e NHS (N-Hidroxissuccinimida) são de origem da Sigma-Aldrich, enquanto os reagentes restantes utilizados nos métodos químicos abaixo descritos foram providenciados pelo departamento de bioquímica e biotecnologia da UEL, todos de natureza analítica.

### 4.2. Métodos químicos

#### 4.2.1. Obtenção da nanocelulose por Hidrólise Ácida

Para obtenção da nanocelulose whisker, chamada a partir de agora de nanocelulose, foi utilizado o método de hidrólise ácida, no qual a celulose contaminante da indústria do vinagre foi submersa em uma solução de ácido sulfúrico, 100 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 40%, num balão de 500 mL fundo chato em seguida adicionado 20 g de celulose umedecida padronizada, nunca seca. A reação de hidrólise ocorreu a temperatura de 50°C durante 48h. A solução resultante foi centrifugada e lavada três vezes com água destilada para reduzir a acidez, posteriormente neutralizada com NaOH (1,00M), gota a gota cuidadosamente até atingir pH 7. O produto neutralizado foi levado para diálise, onde permaneceu durante uma semana, sempre renovando a água destilada dia após dia, posteriormente o material foi concentrado e seco em estufa durante 3 h a 70°C, como descrito por Martínez-Sanz e colaboradores (MARTÍNEZ-SANZ; LOPEZ-RUBIO; LAGARON, 2011).

#### 4.2.2. Succinilação da nanocelulose (NCW-S).

O processo de succinilação teve celulose vegetal e bacteriana como substrato, logo todo procedimento descrito foi realizado separadamente para as duas origens de celulose, os produtos dessa reação são NCW-S-CV (a partir de celulose vegetal) e NCW-S-CB (a partir de celulose bacteriana).

Em um balão de fundo redondo foi adicionado 0,107 g (3,70 mmol) de celulose hidrolisada, 20 mL de diclorometano, 0,334 g (18,5 mmol) de anidrido succínico, e por último 0,2 mL de piridina, a reação ocorreu sob agitação magnética em uma temperatura de 70°C. O produto foi lavado duas vezes com diclorometano e uma vez com etanol (RIBEIRO-VIANA; FARIA-TISCHER; TISCHER, 2016b).

#### 4.2.1. Funcionalização da celulose com Arginina (NCW-S-Arg)

Em um béquer de 150 mL foram adicionados previamente 0,2550 g de NCW-succi e 60 mL de água, então foram agitados magneticamente e aquecidos a 45°C até completa dissolução, em seguida foi adicionado 0,3728 g de EDC (Cloridrato de N- (3-dimetilaminopropil) -N'-etilcarbodiimida), 0,2238 g de NHS (N-Hidroxissuccinimida) a agitação e aquecimento foram mantidos durante 1 h, depois o material foi lavado duas vezes com água, posteriormente adicionados 30 mL de água destilada e 0,3387 g de Arg. A reação ocorreu durante 24 h a 45°C com agitação magnética, o produto foi recolhido e lavado com água destilada três vezes. Os produtos dessa reação foram nomeados como NCW-S-Arg-CV (a partir de celulose vegetal) e NCW-S-Arg-CB (a partir de celulose bacteriana).

#### 4.2.2. Incorporação das nanopartículas de prata à celulose com aminas (NCW-S-Arg-npAg).

A síntese seguiu com algumas modificações dos procedimentos padronizados por (Garcia, 2011) e (SHANKAR; RHIM, 2016). A produção de npAg foi realizada com 0,200 g do produto obtido da adição de amina (NCW-Arg) dispersos em 20 mL de água destilada em um erlenmeyer de 100 mL, em seguida adicionados 0,1091 g de KOH. O sistema foi colocado em resfriamento e agitação magnética constante. A solução de AgNO<sub>3</sub> preparada pela dissolução de 0,2064 g do sal em 25 mL de água, resultando em uma concentração de 0,04862 mol/L, foi gotejada no erlenmeyer contendo NCW-Arg com o auxílio de injetor automático a uma taxa de 10 mL/h. A reação continuou sob resfriamento em banho de gelo e agitação magnética até atingir 4,6 mL de sal adicionados, onde se pôde notar intensa mudança na coloração da solução contendo NCW-Arg/ KOH/ AgNO<sub>3</sub>, o produto foi retirado e caracterizado por FT-IR, DSC e MEV. Os produtos dessa reação foram nomeados como NCW-S-Arg-npAg-CV (a partir de celulose vegetal) e NCW-S-Arg-npAg-CB (a partir de celulose bacteriana).

#### 4.2.3. Produção de nanopartículas de prata pelo método do boro hidreto (npAg).

A fim de adquirir uma referência prática no laboratório das nanopartículas de prata, 4,5 mL de uma solução de nitrato de prata 1mM foi e gotejada sobre uma solução de 30 mL de borohidreto 2mM em uma vazão de 1 gota por segundo a uma temperatura de 4 graus celsius sob agitação magnética de 200 rpm. Foi adicionado 4,5 mL de volume de  $\text{AgNO}_3$ . As soluções foram preparadas como segue: Foi pesado 0,0425 g de  $\text{AgNO}_3$  e dissolvido em 50 mL de água utilizando balão volumétrico apropriado, obtendo dessa forma uma concentração de  $\text{AgNO}_3$  de 5mM. Em seguida foi retirado 20 mL dessa solução e diluída em balão volumétrico de 100 mL e obtendo uma solução de 1mM. posteriormente foi realizada leitura em Uv-Vis.

### 4.3. Caracterização das nanoceluloses prístina e modificadas

#### 4.3.1. Espectroscopia infravermelha com transformada de Fourier (FT-IR)

Ao fim de cada etapa de modificação, tanto a celulose prístina (*prístina*: sin. original) como os produtos formados nos processos químicos foram suspensos em 2,5 mL de água destilada, numa razão de 5 mg de celulose por 1 mL de água, a fim da formação de filme, a suspensão foi seca a 80°C durante 1 h, o filme formado foi levado para análise em FTIR no aparelho Shimadzu FT-IR PRESTIGE-21 na faixa de 4000-400 $\text{cm}^{-1}$  com resolução de 1  $\text{cm}^{-1}$ , no laboratório da central multiusuária de pesquisa da UEL . Ao incorporar as nanopartículas de prata na celulose ligada ao aminoácido, foi realizada leitura da suspensão em Uv-Vis no aparelho Shimadzu UV-2600 na faixa de 200-600 nm.

#### 4.3.2. Espectroscopia Uv-Vis.

Ao incorporar as nanopartículas de prata na celulose ligada ao aminoácido, o produto foi suspenso em 2,5 mL de água destilada, numa razão de 5 mg de celulose por 1 mL de água e foi realizada leitura da suspensão em Uv-Vis no aparelho Shimadzu UV-2600 na faixa de 200-600 nm, .

#### 4.3.1. Análise calorimétrica exploratória diferencial (DSC)

Todas as amostras utilizadas estavam em fase sólida, secas, e a análise calorimétrica exploratória diferencial foram realizadas no equipamento Shimadzu modelo DSC-60, dentro da faixa de temperatura de 20 a 420°C, com programação de aquecimento de 10°C/min, em atmosfera de nitrogênio.

#### 4.3.1. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A morfologia da nanocelulose foi analisada usando microscópio eletrônico FEI Quanta 200 (Holanda). Fragmentos de NXN foram montados em suporte de alumínio com fita de carbono dupla face, pulverizadas com um filme de ouro (40 – 50 nm) (BALTEC SDC 050, Alemanha) e observadas em microscópio eletrônico de varredura. As eletromicrografias foram elevadas em modo topográficos (elétrons secundários) a 20 kV. As análises foram realizadas no Laboratório de Microscopia Eletrônica e Microanálise (LMEM) na Universidade Estadual de Londrina (UEL).

#### 4.3.2. Difração de Raio-X (DRX)

As amostras dos filmes de nanocelulose funcionalizada com arginina-prata foram analisadas por difratometria de raios X  $\theta - 2\theta$  utilizando o Difratômetro Panalytical X'Pert PRO com  $\text{CuK}\alpha$ . O feixe monocromático incidente de Cu (K2) foi excitado a 40 kV e 30 mA, sendo registrado a partir de 5 a 80° ( $2\theta$ ) com uma taxa de varredura de 0,002°/s. Pseudo Voigt foi usado como função de formação de picos. Os cartões de informação cristalográficos utilizados para o refinamento de Rietveld foram 44387-ICSD para Ag (*Cubic Fm-3m*) e 792796-ICSD para  $\alpha$ -Celulose (*Triclinic P1*). O refinamento de Rietveld (PANalytical X'Pert HighScore Plus versão 2.2d) foi utilizado para quantificar as fases cristalinas e parâmetros estruturais (parâmetros de rede, tamanho do cristalito). O silício policristalino foi definido como referência para padronização instrumental no cálculo do tamanho do cristalito de acordo com a equação 1. Nesta equação, W e U são os parâmetros Cagliotti da função FWHM (Largura a meia altura) descritos na equação 2, como no estudo de (ELAZZOUI-HAFRAOUI et al., 2008) e (FARIA-TISCHER et al., 2015) .

$$D = \left(\frac{180}{\pi}\right) \frac{\lambda}{(W - W_{std})^{\frac{1}{2}}} \quad (1)$$

$$FWHM = (U \text{tg}^2 \theta + V \text{tg} \theta + W)^{\frac{1}{2}} \quad (2)$$

O índice de cristalinidade foi determinado pelo método de Segal (TERINTE; IBBETT; SCHUSTER, 2011) (Equação 3), onde  $I_{am}$  é a intensidade do halo amorfo em 18.05° ( $2\theta$ ) e  $I_{001}$  é a intensidade do pico de difração 001 da celulose.

$$I_c = 1 - I_{am}/I_{001} \times 100 \quad \text{Equação 3}$$

#### **4.4. Antibiograma dos materiais funcionalizados.**

O crescimento da bactéria *Pseudomonas aeruginosa* foi realizado em meio Muller Hinton ágar, com temperatura de incubação 35°C. O efeito antibacteriano dos filmes de nanocelulose, funcionalizadas com arginina e prata, formados a partir de uma suspensão aquosa 10 mg/mL foi avaliado em comparação ao antibiótico Penicilina/Estreptomicina. Para isso foram dispostos no meio de crescimento os discos do filme regenerado da solução de NCW-S-Arg-npAg-CB autoclavado, controle (somente disco de NCW), antibiótico/NCW e NCW-S-Arg-npAg-CV (também autoclavado). A avaliação de atividade bactericida ocorreu durante 24 h.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Nesta sessão optou-se por descrever inicialmente as características dos materiais de partida (celulose bacteriana e celulose vegetal) e dos processos de modificação; em seguida a caracterização tanto dos materiais originais como dos modificados buscando as evidências dos produtos propostos, quer seja a formação dos intermediários, mas principalmente da nanopartícula de prata. Os experimentos calorimétricos mostraram além de mudança estrutural, aspectos sobre a estabilidade destes materiais como filmes. Por fim, os dados de antibiograma demonstrando a efetividade na produção, incorporação e da atividade da nanopartícula de prata nos filmes de nanoceluloses modificada.

### 5.1. Formação de nanoceluloses

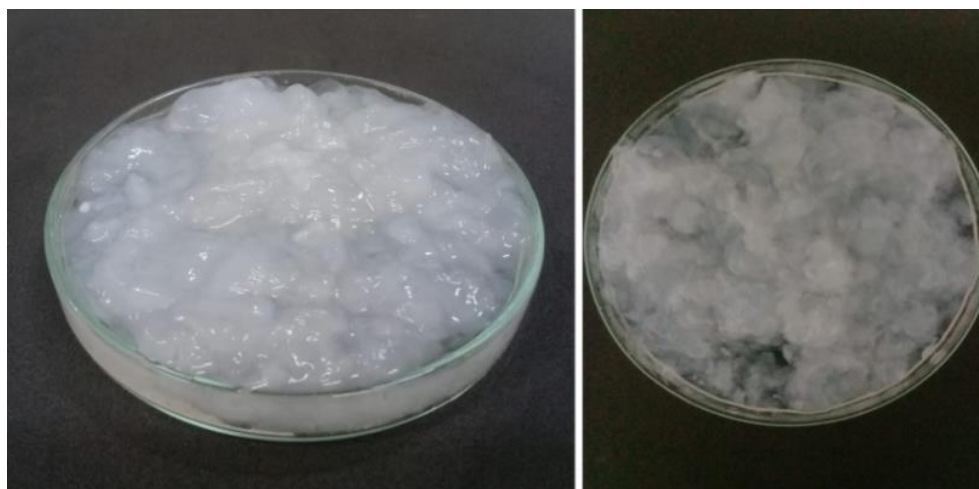
A celulose bacteriana é um material que tem recebido bastante atenção pelas suas propriedades, contudo, sua aplicação em escala mais significativa implica em aumento do rendimento de produção, e, considerando as nanoceluloses como produto de hidrólise há um contrassenso entrópico em constituir uma biomolécula cristalina e em seguida degradá-la por hidrólise ácida forte, comumente em  $H_2SO_4$  (60%).

Ao encontrar a celulose bacteriana produzida como contaminante da indústria biotecnológica do vinagre, vislumbra-se uma possibilidade de estabelecer uma alternativa viável para este material, que apresenta características de formação de filme por auto-organização diferenciada em relação a de plantas.

Neste trabalho buscamos comparar nanoceluloses de origem vegetal e bacteriana quanto as suas características espectroscópicas, e atividade bactericida quando incorporadas nanopartículas de prata por meio da redução utilizando arginina.

A celulose bacteriana de origem industrial vem em aglomerados (FIGURA 17), uma vez que se desenvolvem nas paredes das dornas de fermentação, sendo raspadas e colocadas em tanque para descarte. Para uso como fonte de nanocelulose estas foram inicialmente descelularizadas com hidróxido de sódio e lavadas com água até neutralidade de pH.

FIGURA 17. Celulose bacteriana de origem industrial sem tratamento prévio para hidrólise ácida, visão lateral do aglomerado de CB (imagem a esquerda) e visão superior da CB (a direita).



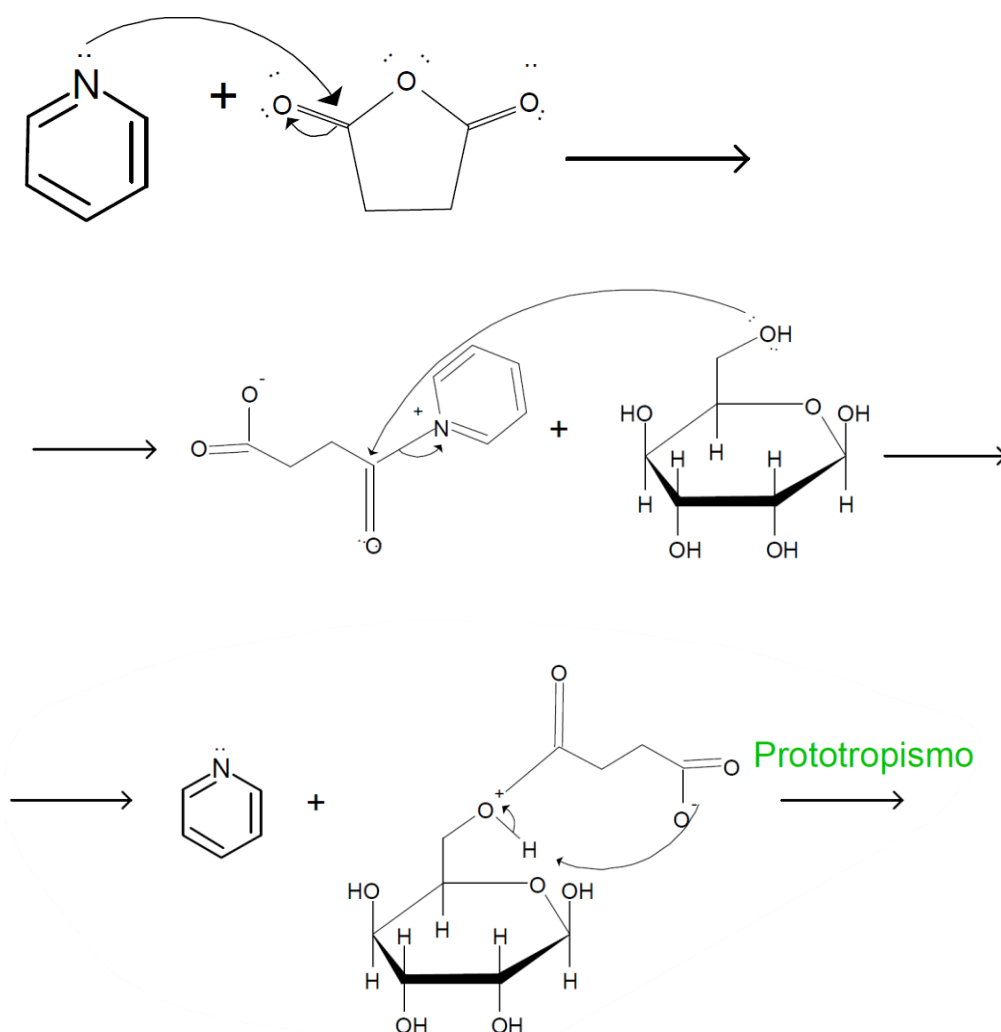
A hidrólise ácida foi realizada aumentando-se o tempo de reação com uma concentração de  $H_2SO_4$  menor do que os experimentos clássicos preconizam para celulose de origem vegetal (ELAZZOUZI-HAFRAOUI et al., 2008; REVOL et al., 1992). Os experimentos preliminares levaram a formação de produto de hidrólise de cor rosa a violeta, indicando uma provável oxidação com formação de furfural. O protocolo apresentado por Martínez-Sanz e colaboradores veio como alternativa (MARTÍNEZ-SANZ; LOPEZ-RUBIO; LAGARON, 2011), um processo mais brando para uma cadeia em uma microfibrila menos espessa como a da celulose bacteriana (TISCHER et al., 2010).

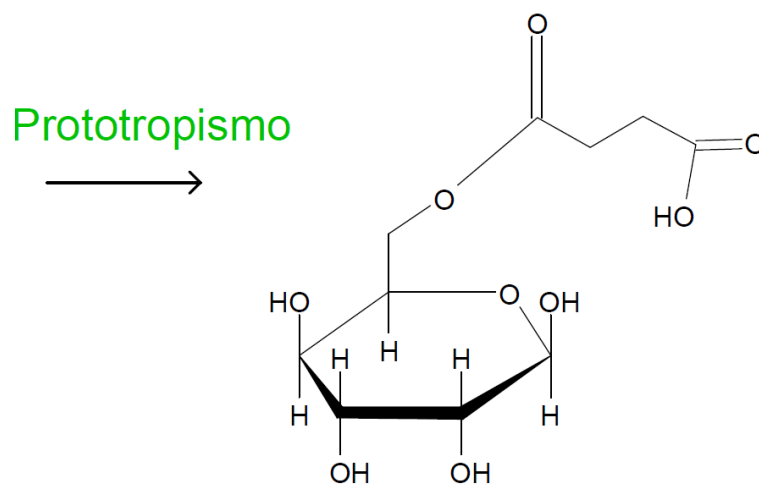
Ao secar após 3h em estufa a  $70^\circ C$  as soluções de nanocelulose produzida em laboratório, de origem bacteriana, observa-se um filme fino com variação de cor e transparência, que vão de um tom amarelo dourado não transparente à transparência quase total. Isto está de acordo com o descrito para materiais com cor estrutural, resultado de múltiplas reflexões internas associadas a fenômenos de interferência óptica (ASSIS, 2013). E também reportado em outras pesquisas da NCW (FERNANDES et al., 2017) como um cristal líquido nemático capaz de espalhar ou refletir a luz através das sucessivas difrações ocorridas da passagem de luz visível pelas camadas auto-organizadas de nanofibras de celulose formadoras do filme regenerado (GIESE et al., 2015). Nos resultados de MEV obtidos da amostra foi possível observar as camadas de fibras sobrepostas e orientadas.

## 5.2. Adição do *linker* de anidrido succínico: Succinilação

A adição do anidrido succínico como apresentado no item 4.2.2 atende ao requisito de acrescentar um grupo com afinidade pela amina da arginina, conjugada na etapa subsequente. Outros autores geram uma carboxila por oxidação, como por exemplo reagente de TEMPO, já discutido anteriormente, mas o fato de acrescentar mais dois carbonos ao C-6 da celulose torna o grupo reativo, o COOH, mais disponível. Segue na (FIGURA 18) um esquema propondo o mecanismo de reação. Os produtos formados, a partir de nanocelulose bacteriana são denominados de NCW-S-CB, e celulose vegetal (NCWC-S-CV).

FIGURA 18. Proposta de mecanismo para a reação de succinilação.



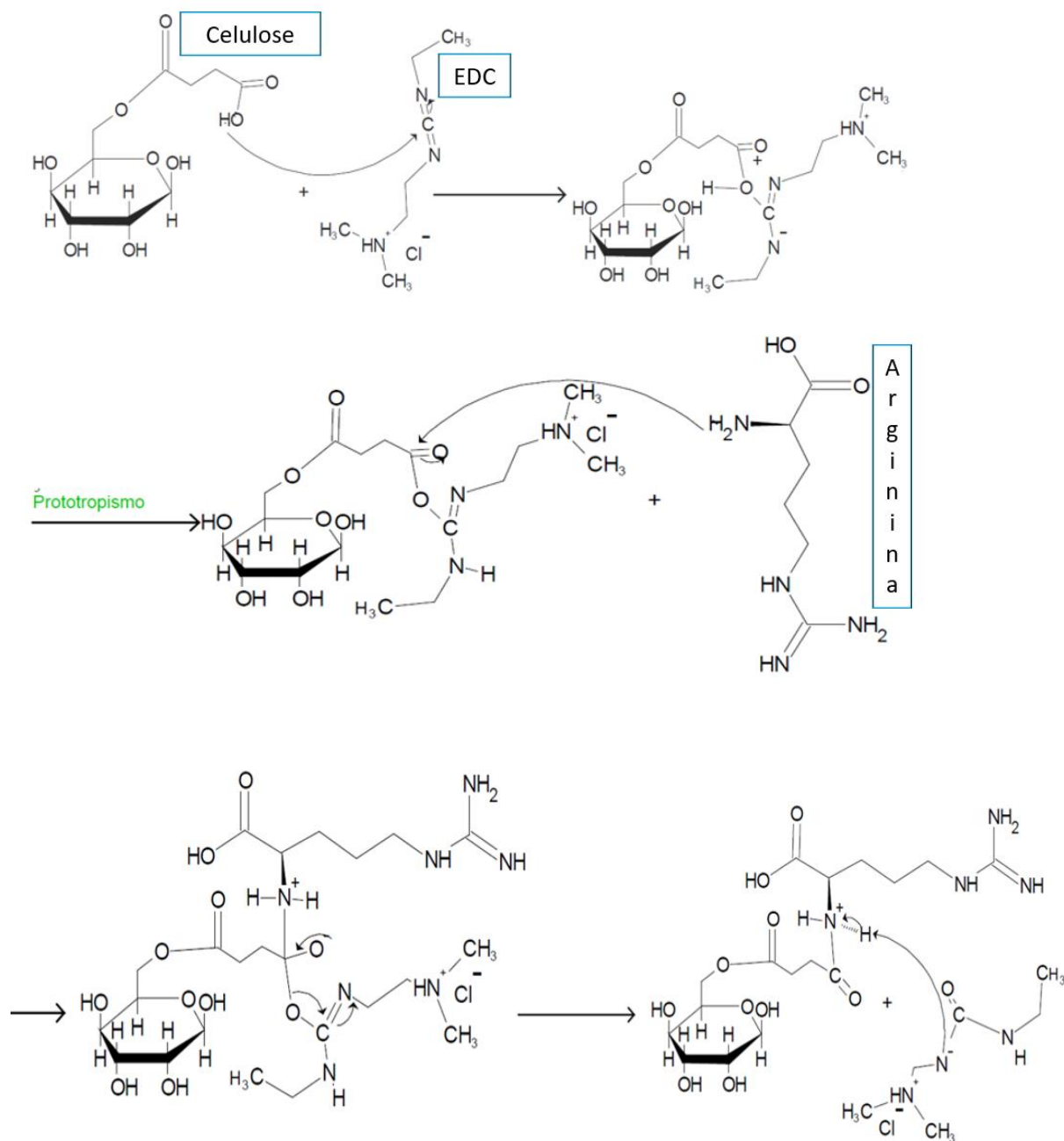


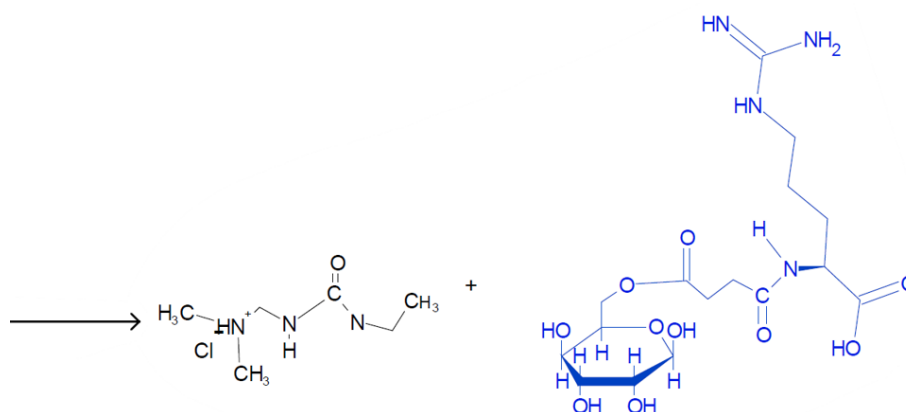
Fonte: Próprio autor

### 5.3. Conjugação de nanoceluloses succiniladas com aminoácido Arginina

A reação com carbodiimida (EDC), como descrito no item 4.2.1, leva ao ataque nucleofílico do oxigênio da hidroxila do ácido carboxílico no *linker* succínico ao carbono quaternário do EDC. Esta é preparação da reação ativa a carboxila a desenvolver um prototropismo à amina ligada ao carbono alfa (FIGURA 19).

FIGURA 19. Proposta de mecanismo de funcionalização de celulose com a arginina, utilizando EDC e NHS em meio aquoso.



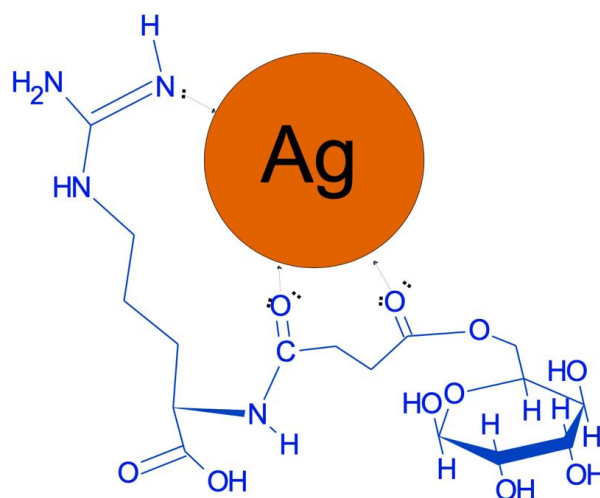


Fonte: Próprio autor.

#### 5.4. Formação de nanopartícula de prata sobre a nanocelulose

O modelo proposto foi baseado na pesquisa de interações de aminoácidos com a prata, o modelo inicial é demonstrado no tópico (3.7) onde a arginina apresenta três ligações complexando o íon de prata. Neste trabalho buscou-se a formação de interação do aminoácido junto da estrutura da nanocelulose com o *cluster* de prata, desta forma resultando num produto com as nanopartículas aderidas quimicamente nos whiskers de celulose (FIGURA 20).

FIGURA 20. Proposta de interação e complexação da nanocelulose funcionalizada com aminoácido ligada à prata.



Fonte: Próprio autor

### 5.5. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Os resultados de MEV demonstraram que a superfície do NCW-BC é compactada e lisa, constituída por várias camadas de nanofibras indicando uma estrutura de cristal líquido (FIGURA 22), o que explica o fenômeno de cor estrutural presente na amostra NCW-CB (FIGURA 21). Em cada camada do corte transversal é possível observar as milhares de “agulhas” características dos *whiskers* de celulose (FIGURA 23), onde há reflexões da luz visível variando com o ângulo de incidência ocorrendo um efeito metalizado de reflexão ou transparência. As imagens referentes à celulose bacteriana e vegetal se diferenciam principalmente pelo grau de ordenação das fibras como se pode observar (FIGURA 22) e (FIGURA 24)FIGURA 23.

Após submeter os materiais à reação de inserção de nanopartículas de prata , foi constatado que as fibras deixaram de obedecer a ordenação existente no material de partida NCW-CB, evidenciando uma mudança na estrutura da celulose para acomodar os novos grupos de funcionalização FIGURA 26. Tal característica também é observada na análise de DRX nos próximos tópicos.

FIGURA 21. Imagem do filme regenerado de NCW-CB, evidenciando o surgimento de cor estrutural, semelhante ao ocorrido em asas de borboletas, por exemplo, dependendo do ângulo de visão pode se tornar transparente ou metalizado

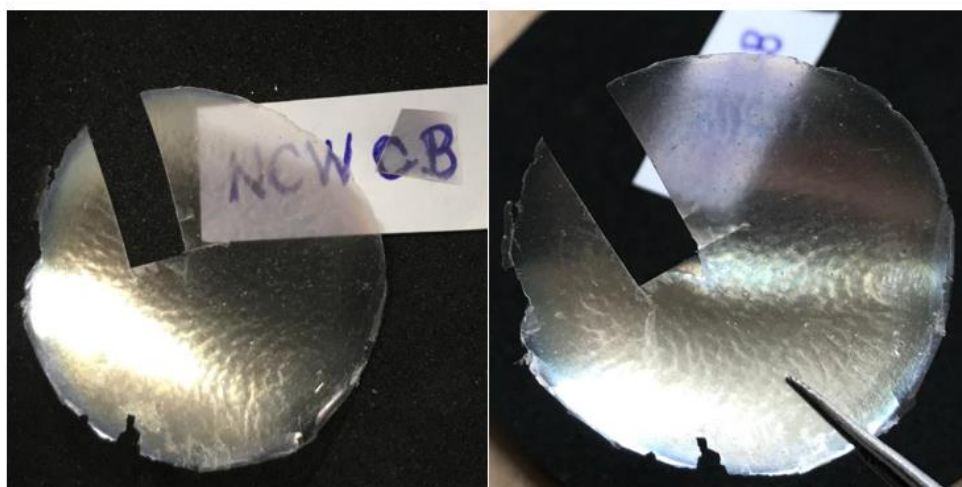


FIGURA 22. MEV do filme regenerado NCW de origem bacteriana.

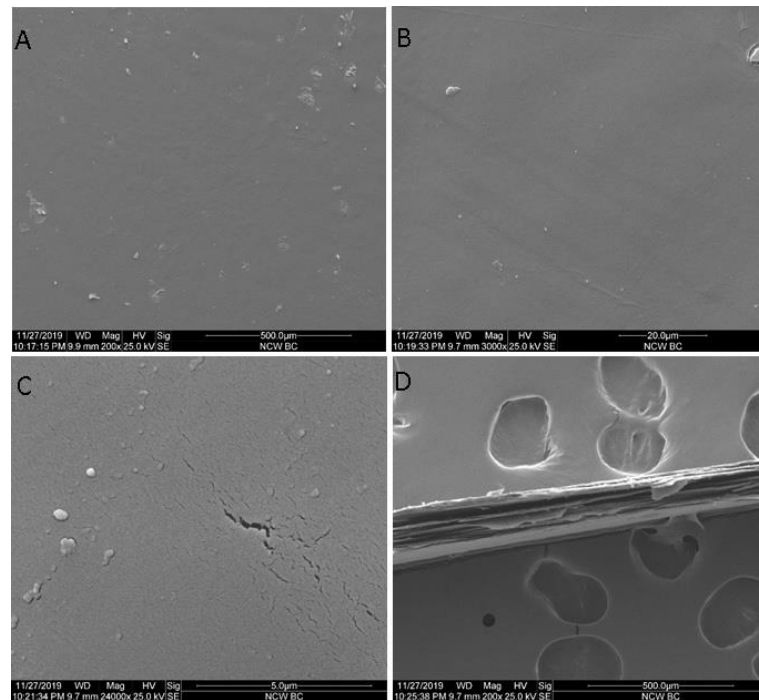


FIGURA 23. MEV de criofratura do NCW CB (A) ampliado 800 x, (B) ampliado 1200 x, e (C) ampliado 24 mil vezes

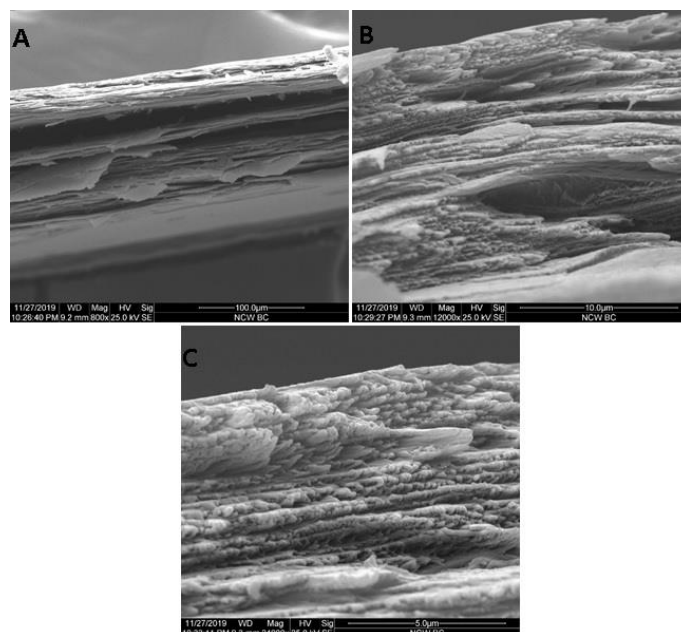
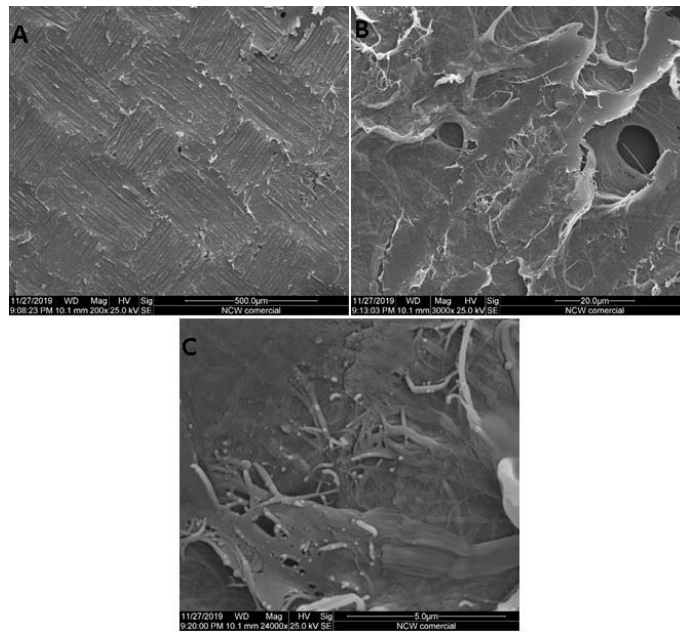


FIGURA 24. MEV do NCW-CV ampliado 200x (A), 3000x (B) e 24 mil vezes (C).



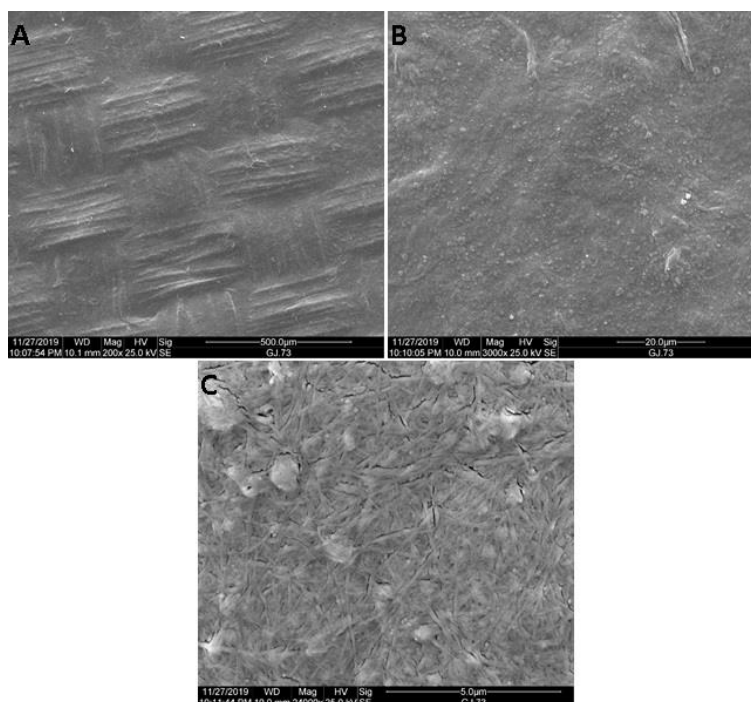
As fibras de celulose de origem bacteriana se encontram ordenadas horizontalmente em um padrão observável, no entanto esse aspecto não é encontrado na NCW-CV, onde as fibras estão sobrepostas mas sem nenhum grau de ordenação resultando em um efeito macroscópico de superfície opaca (FIGURA 25).

FIGURA 25. Imagem do filme regenerado de NCW-CV



Após submeter os materiais à reação de inserção de nanopartículas de prata, foi constatado que as fibras deixaram de obedecer a ordenação existente no material de partida NCW-CB, evidenciando uma mudança na estrutura da celulose para acomodar os novos grupos de funcionalização (FIGURA 26). Tal característica também é observada na análise de DRX nos próximos tópicos.

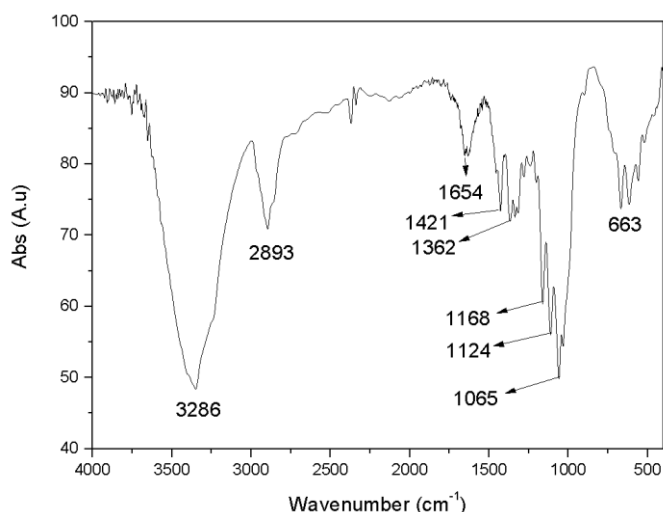
FIGURA 26. MEV da amostra de NCW-S-Arg-npAg-CB em (A) ampliada 200x, (B) ampliada 3000x e (C) ampliada 24 mil vezes.



## 5.6. Espectroscopia infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR)

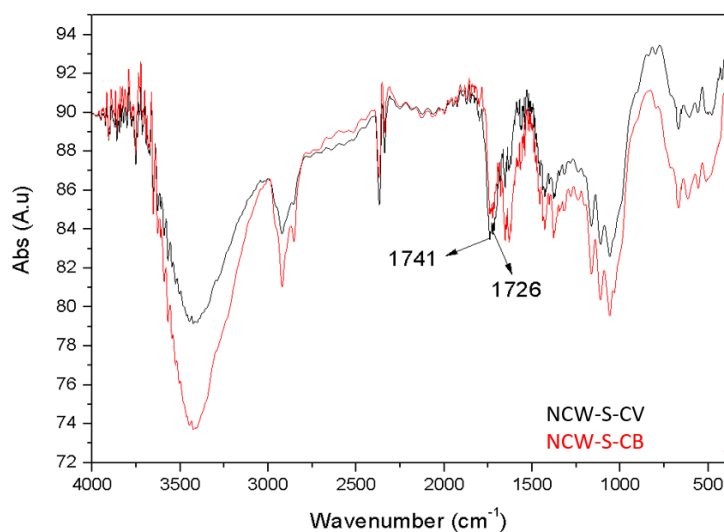
Na FIGURA 27 banda presente em  $3286\text{ cm}^{-1}$  é referente à estiramentos de grupos (-OH) presentes na celulose, em  $2893\text{ cm}^{-1}$  é característica de estiramentos de (C-H) de alcanos, a presença de água intermolecular é indicada pela banda em  $1654\text{ cm}^{-1}$  que também é relacionada com ligações do tipo (C=O) de amidas, no entanto estas por último apresentam uma banda de caráter intenso. A banda presente em  $1421\text{ cm}^{-1}$  é referente a deformações ( $\text{CH}_2$ );  $1360\text{ cm}^{-1}$  deformação (C-OH);  $1168\text{ cm}^{-1}$  vibração assimétrica de (C-O-C);  $1124\text{ cm}^{-1}$  estiramento de (C-O);  $1065\text{ cm}^{-1}$  estiramentos característicos (C3-O3);  $663\text{ cm}^{-1}$  deformação fora do plano de (C-OH) (SCHWANNINGER et al., 2004).

FIGURA 27. Espectro de Ft-Ir da nanocelulose prístina CB.



Os grupos de bandas presentes na celulose nativa estão visíveis da mesma forma no produto succinilado (FIGURA 28), no entanto é notável uma banda forte em  $1741\text{ cm}^{-1}$ , correspondente à frequência de estiramento de (C=O) de éster e uma segunda banda sobreposta em  $1726\text{ cm}^{-1}$  pertencente a grupos de (C=O) de ácidos carboxílicos, levando a crer no sucesso da succinilação, corroborando com os dados obtidos por (RIBEIRO-VIANA; FARIA-TISCHER; TISCHER, 2016a).

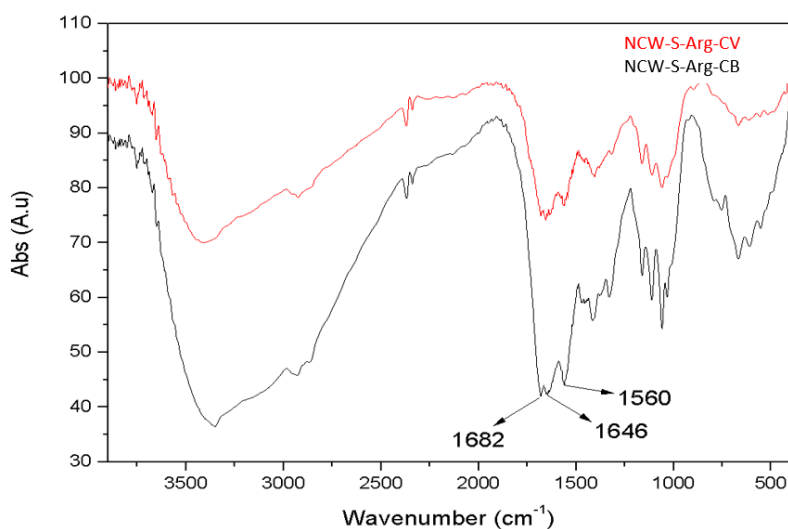
FIGURA 28. Espectro de Ft-Ir da NCW succinilada.



A presença de Arginina pode ser verificada observando bandas referentes às aminas, carboxilas contidas no aminoácido, e carbonila de

amidas. Na FIGURA 29 é notável uma mudança na banda contida entre 3500-3100  $\text{cm}^{-1}$  quando comparada ao material succinilado (FIGURA 28), esse fenômeno provavelmente está ligado a sobreposições de frequência de estiramentos na ligação de grupos (O-H) e (N-H) tanto de amins primárias quanto secundárias que fazem parte da molécula final. A inserção do aminoácido por ligação covalente ao grupo carboxílico presente no NCW-S, é evidenciada com o surgimento de novas bandas no espectro abaixo (FIGURA 29). A banda em 1682  $\text{cm}^{-1}$  se refere a (C=N) de iminas, agrupamento originado da arginina; a frequência em 1646  $\text{cm}^{-1}$  é característica de estiramentos (C=O) de amidas; 1560  $\text{cm}^{-1}$  se refere à dobramentos (N-H) de amidas e amins. Com o surgimento de novas bandas é sugerido a ligação covalente de arginina tanto no NCW comercial, quanto no NCW produzido no laboratório, uma vez que é observado o surgimento de novas bandas nos dois materiais.

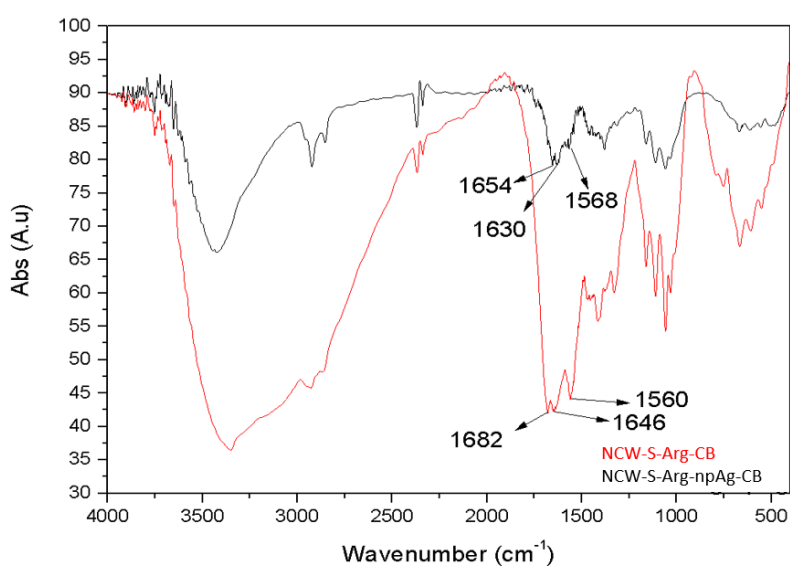
FIGURA 29. Espectro de Ft-Ir das NCW com grupo succínico e a Arginina.



Ambos os materiais, vegetal e bacteriano, apresentaram o mesmo padrão de modificações nas bandas após a inserção de nanopartículas de prata, um deslocamento de bandas relacionadas aos agrupamentos que interagem diretamente com as npAg (FIGURA 30). É importante ressaltar que ao interpretar a estrutura tridimensional que é formada pela ligação de arginina e prata (FIGURA 20), os átomos do nitrogênio terminal (-N=H), oxigênio e nitrogênio da carboxila interagem com prata e estão passíveis de ligações do tipo  $\pi$ , essa interação pode alterar a nuvem eletrônica do ligante expandindo-a, dando origem à um efeito conhecido como nefelauxético. Um exemplo observado na literatura é o ligante carbonil apresentando orbitais disponíveis

para combinar com orbitais d provenientes do metal. Quando o metal tem um NOX elevado, sua ordem de ligação será menor entre os átomos da carbonila, ocorrendo um deslocamento das bandas caracterizando uma menor interação entre (C=O) tabela 3. Na FIGURA 30 é possível observar que o material NCW-Arg contém a banda em  $1682\text{ cm}^{-1}$  correspondente à (C=N) está deslocada para  $1654\text{ cm}^{-1}$  além de menos intensa após reação com prata; em  $1646\text{ (C=O)}$   $\text{cm}^{-1}$  deslocou para  $1630\text{ cm}^{-1}$ , efeito similar também é observado em outro trabalho que inseriu quimicamente nanopartículas de prata em substratos passíveis de interação com as npAgs (VIMALA et al., 2009) e em  $1568\text{ cm}^{-1}$  referente à desdobração (N-H) não houve mudança significativa, mostrando uma possível substituição de átomos ligantes à prata, uma outra ligação possível é o átomo de oxigênio presente na carboxila de amida interagindo com a prata.

FIGURA 30. Espectro de Ft-IR dos materiais antes e após inserção de nanopartículas de prata.



A figura abaixo (FIGURA 31), permite observar a presença de bandas e  $3413\text{ cm}^{-1}$  referente à estiramentos de grupos (-OH);  $2922\text{ cm}^{-1}$  característica de estiramentos de (C-H) de alcanos;  $1654\text{ cm}^{-1}$  característica de estiramentos (C=N) de iminas;  $1630\text{ cm}^{-1}$  (C=O) de amidas;  $1568\text{ cm}^{-1}$  desdobração (N-H),  $1377\text{ cm}^{-1}$  deformação (C-OH);  $1057\text{ cm}^{-1}$  estiramentos característicos (C3-O3); e  $618\text{ cm}^{-1}$  referente a deformação fora do plano de (C-OH) (SCHWANNINGER et al., 2004). Com as bandas características de amidas e aminas presentes no espectro, acredita-se que há ligações covalentes entre NCW e arginina. O deslocamento de bandas após reação de síntese de npAg utilizando o *whisker*

funcionalizado com aminoácido leva a crer que há interação química do mesmo com as nanopartículas de prata.

FIGURA 31. Espectro de FT-IR após a inserção das npAg.

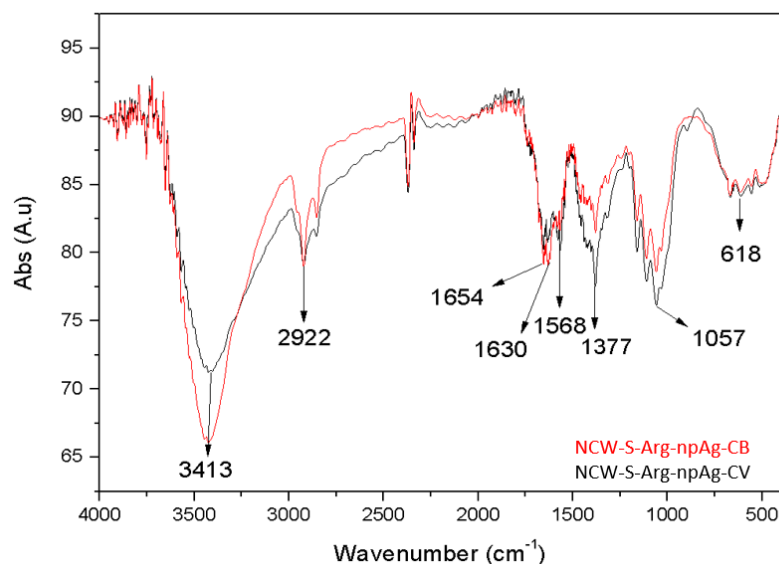


TABELA 3. Frequências de estiramento do CO observadas nos espectros de Ft-Ir de algumas carbonilas binárias.

Complexo	Estado de oxidação	$\nu_{\max}(\text{CO})(\text{cm}^{-1})$	NC
$[\text{Mn}(\text{CO})_6]^+$	+1	2090	6
$[\text{Cr}(\text{CO})_6]$	0	2000	6
$[\text{V}(\text{CO})_6]^-$	-1	1860	6
$[\text{Ni}(\text{CO})_4]$	0	2060	4
$[\text{Co}(\text{CO})_4]^-$	-1	1896	4
$[\text{Fe}(\text{CO})_4]^{2-}$	-2	1790	4
CO livre		2147	

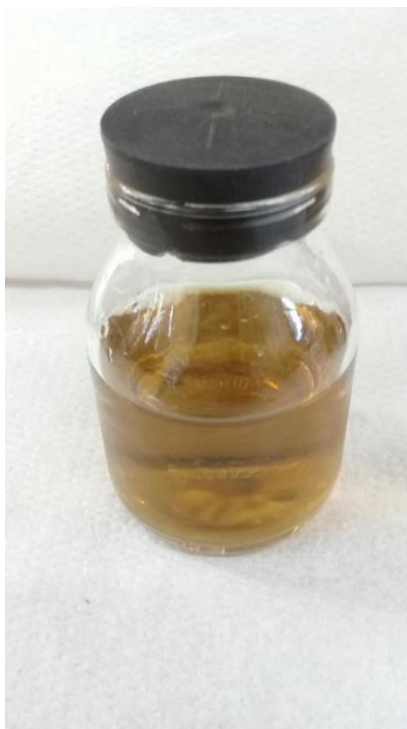
Fonte: (ATKINS et al., 2010)

### 5.7. Análise de Uv-vis da solução de nanopartículas de prata e da suspensão do produto de celulose ligada às nanopartículas de prata.

Como esperado das suspensões contendo *whiskers* de celulose funcionalizados com amina e ligados às nanopartículas de prata, houve absorvância dessas suspensões no comprimento de onda de aproximadamente 420 nm demonstrando a presença das nanopartículas com

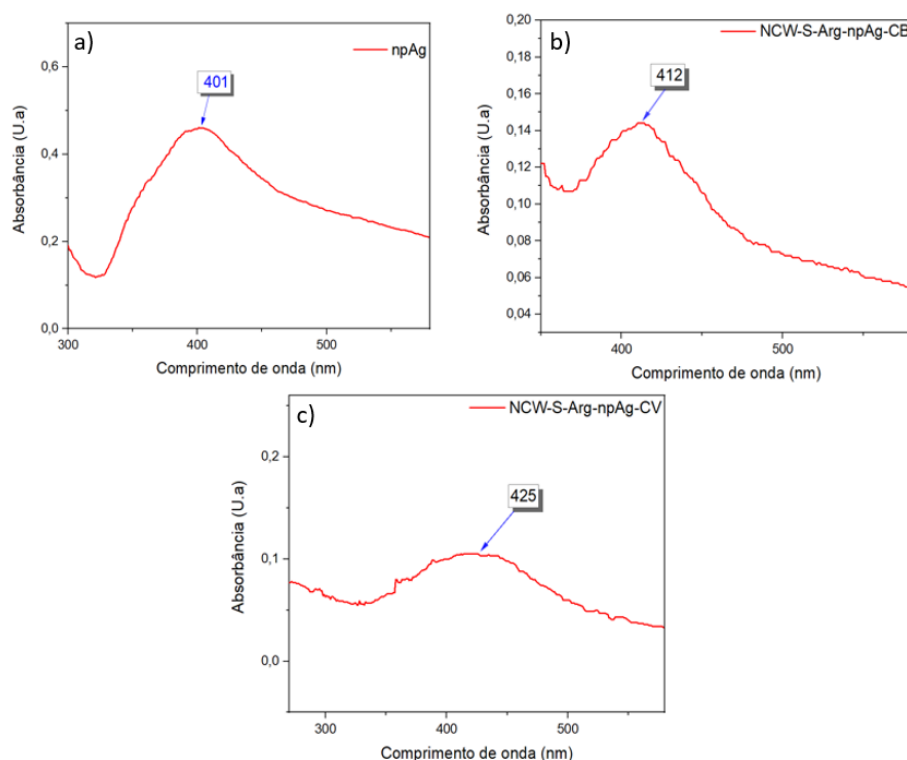
tamanhos entre 35 e 50 nm inseridas nos *whiskers* de nanocelulose. Tais dados estão de acordo com a literatura (GARCIA, 2011a) enquanto a formação das npAg (FIGURA 15) e também em congruência ao espectro obtido da npAg produzida em laboratório (FIGURA 32).

FIGURA 32. Solução de npAg obtida pelo método de redução por boro Hidreto



O comparativo de Uv-vis do produto NCW-S-Arg-npAg tanto e origem vegetal quanto bacteriana entre a solução de npAg obtida em laboratório demonstraram semelhança, no entanto com um leve deslocamento para comprimentos de banda de 412 nm (produto de origem bacteriana) e 425 nm (produto de origem vegetal). Este está relacionado com a interação dos grupos químicos da celulose e arginina com as npAg, por não serem grupos com atividade redutora de mesma capacidade que o borohidreto, tendem a formar espécies maiores em diâmetro, uma vez que a formação e aglomeração das nanopartículas estão relacionadas diretamente com a concentração do agente redutor e sua capacidade redutora (GARCIA, 2011a)

FIGURA 33. Espectro de Uv-vis da suspensão de (a) nanopartículas de prata, (b) NCW-S-Arg-npAg de origem bacteriana, (c) NCW-S-Arg-npAg de origem vegetal.



## 5.8. Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

Os dados adquiridos de DSC para as duas amostras (FIGURA 34) se mostraram semelhantes e se comportaram semelhantemente ao produto de celulose de (TISCHER et al., 2010). Entre 25°C e 100°C há picos endotérmicos característicos de desidratação, diretamente correlacionados com o grau de cristalinidade da celulose, onde picos mais oblíquos próximos e maiores temperaturas evidenciam maior grau de sítios amorfos (CIOLACU; CIOLACU; POPA, 2011). Picos entre 350°C e 400°C são descritos pela literatura como oxidação das ligações glicosídicas manifestando um pico exotérmico de celuloses, levando à perda de cristalinidade dos *whiskers* (TISCHER et al., 2010).

Após o processo de succinilação é possível observar mudanças significativas no gráfico de DSC (FIGURA 35), no entanto o primeiro pico endotérmico, o qual é característico de nanocelulose, ainda está presente em aproximadamente 47°C, porém houve deslocamento na temperatura de

transição vítrea ( $T_G$ ) nos produtos de origem vegetal e bacteriana. Na NCW-CB modificado com grupo succínico, a  $T_G$  ocorreu em 256°C, enquanto o NCW-CV modificado por succinilação apresentou o pico endotérmico de  $T_G$  em 251°C.

O primeiro pico endotérmico presente no gráfico da nanocelulose é diretamente relacionado ao grau de cristalinidade da mesma, por haver cristais melhores formados a quantidade de água presente tende a evaporar em uma temperatura menor, neste caso 45°C, o efeito de maior cristalinidade afetou a temperatura de transição vítrea, por haver mais ligações de hidrogênio intermoleculares, promoveu a estabilidade dos cristalitos que apresentando uma maior temperatura necessária para ocorrer a  $T_G$  (256°C) no NCW-S-CB.

FIGURA 34. Curva de DSC do NCW de origem laboratorial (em preto) e comercial (em vermelho)

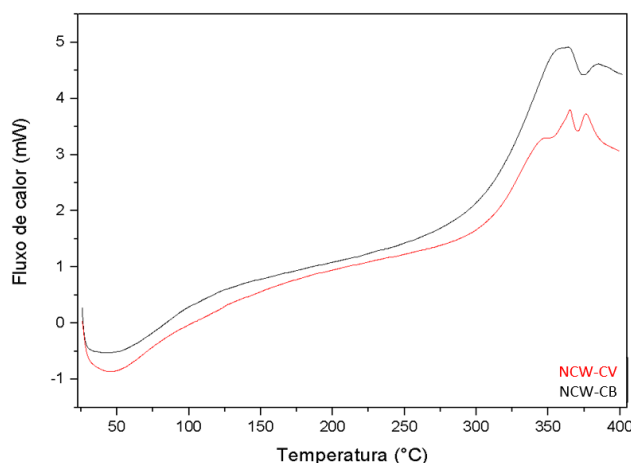
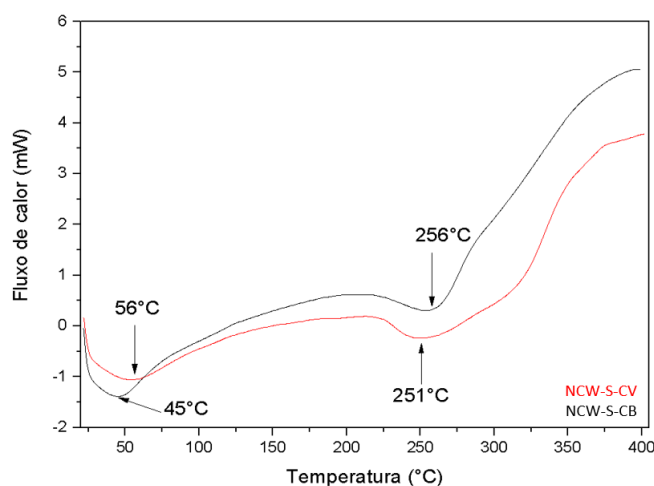


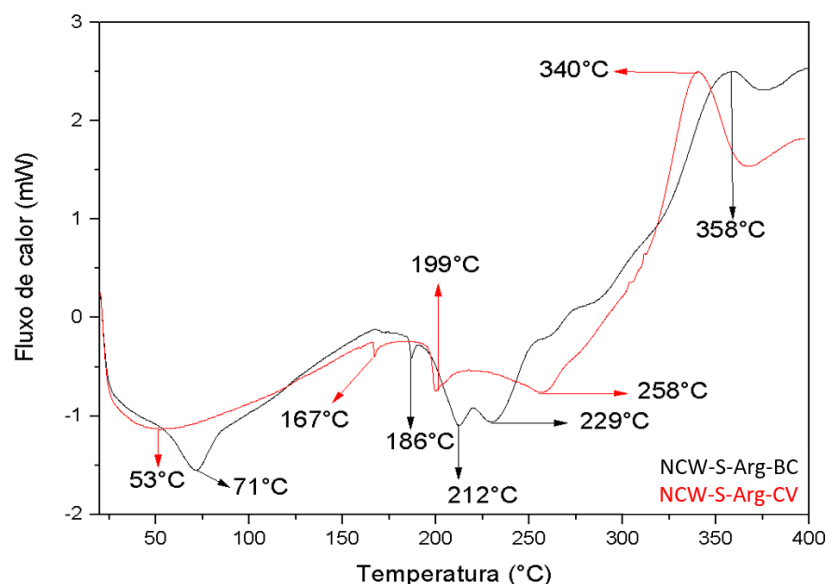
FIGURA 35. Curva de DSC do NCW succinilado, de origem bacteriana em preto, e origem vegetal em vermelho



Quando a Arginina foi incorporada ao material de nanocelulose succinilado, houve mudança notável no pico de desidratação do material de celulose bacteriana (deslocamento de 45°C para 71°C), enquanto o material de celulose vegetal apresentou o mesmo pico de desidratação. Indicando uma maior deformação na estrutura celulósica de origem bacteriana, com consequente aumento de sítios amorfos (FIGURA 36).

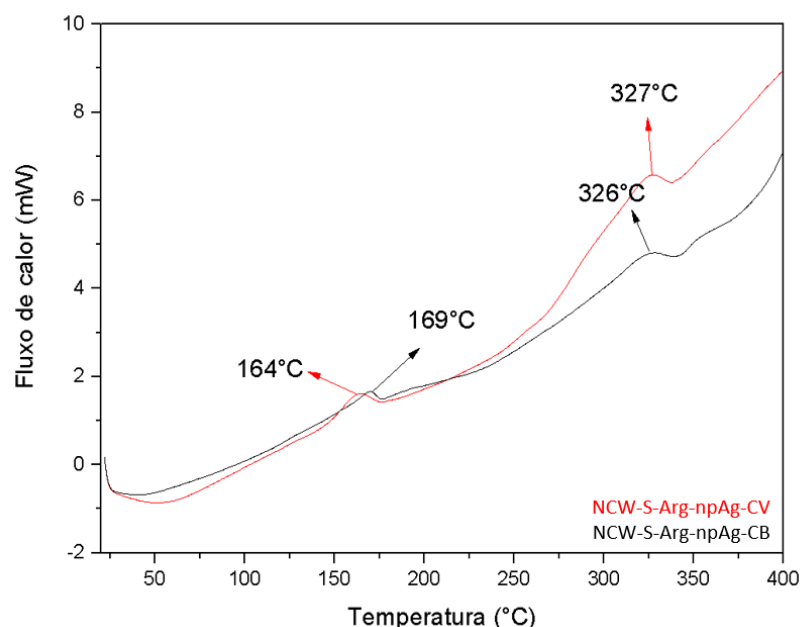
Houve surgimento de dois novos picos em ambas amostras, compreendidos entre 165°C e 212°C, estes são referentes a decomposição da arginina que ocorre sob a forma de dois picos entre 200°C e 250°C (WEISS et al., 2018). O deslocamento da temperatura de decomposição da arginina pode estar ligado à interação do aminoácido com a estrutura celulósica succinilada. A inserção da arginina na matriz celulósica modificou a  $T_G$  tanto do material bacteriano quanto o material vegetal, obtendo valores de 229°C e 258°C no material bacteriano e vegetal respectivamente.

FIGURA 36. Análise exploratória diferencial do NCW-S-Arg de origem laboratorial (em preto) e comercial (em vermelho)



A estabilidade térmica após a inserção das nanopartículas de prata no material pode ser visualizada na (FIGURA 37), ambas amostras exibiram maior estabilidade térmica em relação aos materiais sintetizados nas etapas anteriores, apresentando a grande diferença na ausência dos picos de decomposição de arginina (160°C – 200°C) , indicando a alta afinidade da ligação do aminoácido e a prata, permanecendo mais estável ao longo do aquecimento , este efeito está em concordância com dados apresentados na TABELA 2, onde a arginina apresenta a maior energia de ligação com a prata ( $-\Delta G = 73$ ). O pico relacionado a  $T_g$  em torno de 250°C também está ausente, mais um fator indicativo do aumento da estabilidade térmica. No entanto o surgimento de um pico exotérmico no gráfico de ambas as amostras em aproximadamente 165°C pode ser correlacionado a mudança estrutural da celulose. Que assume uma nova conformação estrutural para estabilizar as npAg ao envolve-las por meio de interações químicas das aminas terminais e carbonilas presente no material NCW-S-Arg-npAg (FIGURA 20).

FIGURA 37. Análise exploratória diferencial do NCW-S-Arg-npAg de origem bacteriana (em preto) e vegetal (em vermelho)



### 5.9. Difração de Raio-X

O produto de nanocelulose whisker funcionalizado com aminoácido e npAg foi analisado quanto a manutenção de sua cristalinidade e presença de picos referente as nanopartículas geradas no interior da estrutura dos *whiskers*. Como era esperado se pôde observar no difratograma (FIGURA 38) fases cristalinas referentes à nanocelulose nativa presentes tanto na NCW-CB quanto na NCW-CV nos ângulos de difração ( $2\theta$ ): 15,22 ; 17,4; 23,2 correspondentes aos planos (0 1 0), (0 0 1) e (0 1 1) respectivamente, estando em coerência com a literatura (OKSMAN et al., 2006) (LOPES et al., 2014). E houve surgimento de quatro novos picos de difração em 38,01° e 44,3° e 64,4, 77,4° correspondendo respectivamente aos planos (1 1 1), (2 0 0), (2 2 0), (3 1 1) referentes às npAg inseridas assim como observado por (WU et al., 2014) durante a síntese de nanopartículas de prata em fibras de membranas de celulose bacterianas ao imergi-las, sob aquecimento, em Reativo de Tollen,  $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]\text{OH}$ , este último em diferentes concentrações molares FIGURA 39.

FIGURA 38. Difratoograma Comparativo entre amostras NCW-CV, NCW-CB, NCW-S-Arg-npAg-CB e NCW-S-Arg-npAg-CV.

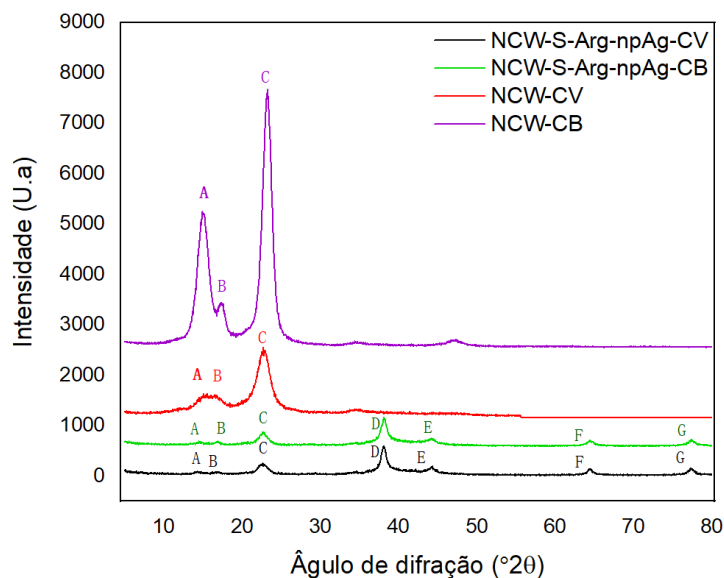
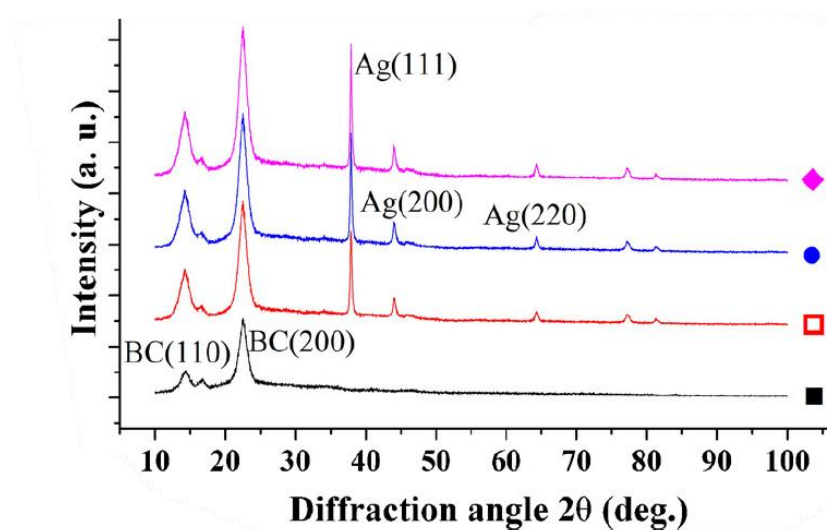


FIGURA 39. Difratoograma de npAg sintetizadas em membranas de celulose bacteriana a partir da imersão em Reativo de Tollen com diferentes concentrações molares, em preto CB nativa, vermelho CB imersa em Reativo de Tollen (0,01 M); em azul 0,03 M; e violeta 0,05 M.



Fonte:(WU et al., 2014)

TABELA 4. Tabela dos picos ( $^{\circ}2\theta$ )

	NCW-Arg- npAg-CB	NCW-Arg- npAg-CV	NCW-CB	NCW-CV
Posição do pico <b>A</b> ( $^{\circ}2\theta$ )	14,4	15,2	14,4	15,2
Posição do pico <b>B</b> ( $^{\circ}2\theta$ )	16,9	17,4	16,9	17,4
Posição do pico <b>C</b> ( $^{\circ}2\theta$ )	22,6	23,2	22,6	23,2
Posição do pico <b>D</b> ( $^{\circ}2\theta$ )	38,12	38,0	-	-
Posição do pico <b>E</b> ( $^{\circ}2\theta$ )	44,3	44,3	-	-
Posição do pico <b>F</b> ( $^{\circ}2\theta$ )	64,4	64,4	-	-
Posição do pico <b>G</b> ( $^{\circ}2\theta$ )	77,3	77,4	-	-

Foi possível constatar a presença de planos cristalográficos referentes à  $\alpha$ -Celulose I (triclínica) em todos os produtos. Nos materiais finais após inserção de prata é notável os planos cristalográficos referentes à mesma, apresentando característica de agrupamento espacial Cúbico Fm-3M. Os produtos NCW-S-Arg-npAg-CB e NCW-S-Arg-npAg-CV continham respectivamente  $17 \pm 3\%$  e  $14 \pm 2\%$  em peso de npAg, os tamanhos dos cristalitos de nanopartículas de prata foram  $53,3 \pm 0,9$  nm e  $76 \pm 0,9$  nm nas amostras NCW-S-Arg-npAg-CB e NCW-S-Arg-npAg-CV respectivamente, TABELA 5.

O refinamento de Rietveld demonstrou que os cristalitos do NCW-CV são orientados aleatoriamente, enquanto que a amostra de NCW-CB apresentou forte orientação em três diferentes direções [010] [001] e [011], ocupando 75%, 16% e 9% em volume respectivamente, caracterizando um material nemático (FIGURA 9), o que explica o efeito de iridescência ao formar filmes a partir de suspensões aquosas. Também foi constatado a falta por preferência de orientação nas três diferentes direções acima citadas nos produtos NCW-S-Arg-npAg-CV e NCW-S-Arg-npAg-CB.

TABELA 5. Quantificação da fase cristalina (peso %) e tamanhos dos cristalitos (nm) dos produtos após inserção de prata.

Amostra	Fase	Peso da fase cristalina (%)	Tamanho do Cristalito (nm)
NCW-S-Arg-npAg-CV	Ag	14 ± 2	76,0 ± 0,9
	α-Cellulose	86 ± 2	---
NCW-S-Arg-npAg-CB	Ag	17 ± 3	53,3 ± 0,9
	α-Cellulose	83 ± 3	---

### 5.10. Antibiograma

Com o teste de antibiograma utilizando o microrganismo *Pseudomonas aeruginosa* e o antibiótico Penicilina/Estreptomicina, se pôde constatar a ação antibacteriana proposta ao modificar quimicamente a nanocelulose com nanopartículas de prata, estas que têm boa afinidade com grupos contendo enxofre e fósforo, desta forma danificando o interior das células impedindo a divisão celular por interação com o DNA e até mesmo nas membranas impedindo a respiração celular. As amostras tanto de origem bacteriana quanto de origem vegetal se mostraram eficazes. Este resultado se assemelha com trabalhos realizados por outros pesquisadores como (WU et al., 2014) que atestou positivo durante a inibição do crescimento de *P. aeruginosa*, no entanto foram obtidos anéis com zona de inibição de 1,04-2,35 mm, enquanto que no presente trabalho formou-se um halo de inibição de 2,67 cm para o produto NCW-S-Arg-npAg-CB e 2,90 cm no produto NCW-S-Arg-npAg-CV TABELA 6.

FIGURA 40. Antibiograma, foi utilizado no disco de celulose bacteriana (BC+A) antibiótico como referência de inibição, (BC) disco controle, (C) filme regenerado de NCW-S-Arg-npAg de origem vegetal (D) filme regenerado de NCW-S-Arg-npAg de origem bacteriana.

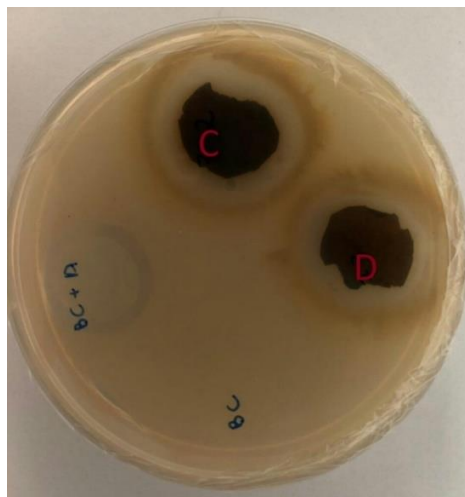


TABELA 6. Dados de inibição das respectivas amostras de celulose bacteriana e vegetal

Amostras	Área do disco de amostra	Diâmetro de inibição	Área do halo de inibição	Razão diâmetro de inibição/área de disco	Razão área de inibição/área de disco
BC	1,971 cm <sup>2</sup>	-	-	-	-
BC+A	1,973 cm <sup>2</sup>	1,963 cm	3,250 cm <sup>2</sup>	0,995 cm <sup>-1</sup>	1,647
C	2,283 cm <sup>2</sup>	2,891 cm	6,152 cm <sup>2</sup>	1,266 cm <sup>-1</sup>	2,695
D	2,090 cm <sup>2</sup>	2,675 cm	4.562 cm <sup>2</sup>	1,280 cm <sup>-1</sup>	2,183

## 6. CONCLUSÃO

Com o conjunto de análises realizados foi possível argumentar que:

- Foi possível produzir whiskers a partir de celulose bacteriana obtida da fábrica de vinagre, o qual apresentou similaridade nos planos cristalográficos em relação ao material de nanocelulose vegetal, bem como houve semelhanças entre as duas fontes de celulose em dados espectroscópicos.
- O material proveniente de bactéria apresenta algumas peculiaridades exibir características de iridescência quando reconstituído em filme a partir de uma solução aquosa. Dados apresentados de DRX para o *whisker* de BC demonstrou as nanopartículas organizadas preferencialmente para três direções específicas [010] [001] e [011].
- Ambos os materiais obtiveram resultado positivo para a succinilação, e posterior conjugação com arginina. Também apresentaram os mesmos padrões de bandas características espectroscópicas quando inseridas nanopartículas de prata, foi observada a inserção por análise de Uv-Vis e principalmente sua presença foi confirmada pelo DRX, ao exibir os planos cristalinos referentes a npAg em ambas NCWs.
- Após inserção de npAg os dois materiais de NCW mostraram atividade bactericida em *Pseudomonas aeruginosa*. Portanto ambos os materiais *whiskers* (bacteriano e vegetal) quando funcionalizados com arginina e npAg são úteis como agentes antibacterianos.
- Não foi realizada uma análise de viabilidade econômica, contudo, tendo em vista a estrutura industrial para produção de celulosas vegetais e fornecimento comercial desta, se torna viável a aplicação do NCW vegetal funcionalizado com arginina e nanopartículas de prata em cosméticos e insumos farmacêuticos.

## REFERÊNCIAS

ASSIS, O. B. G. A asa da borboleta e a nanotecnologia: Cor estrutural. **Revista Brasileira de Ensino de Física**, v. 35, n. 2, p. 1–9, jun. 2013.

ATKINS, P. W. et al. **Shriver and Atkins' Inorganic Chemistry, Fifth Edition**. [s.l: s.n.].

BASTÚS, N. G. et al. Synthesis of Highly Monodisperse Citrate-Stabilized Silver Nanoparticles of up to 200 nm: Kinetic Control and Catalytic Properties. **Chemistry of Materials**, v. 26, n. 9, p. 2836–2846, maio 2014.

BOURGEOIS, J. F.; BARJA, F. The history of vinegar and of its acetification systems. **Archives des Sciences**, v. 62, n. 2, p. 147–160, 2009.

BRISOLA JULIANO. **Imobilização de lipase em celulose e em nanocristais de celulose bacteriana**. [s.l: s.n.].

ÇAKAR, F. et al. Improvement production of bacterial cellulose by semi-continuous process in molasses medium. **Carbohydrate Polymers**, v. 106, n. 1, p. 7–13, 2014.

CANNON, R. E.; ANDERSON, S. M. Biogenesis of bacterial cellulose. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 17, n. 6, p. 435–447, 1991.

CARREIRA, P. et al. Utilization of residues from agro-forest industries in the production of high value bacterial cellulose. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 15, p. 7354–7360, 2011.

CIOLACU, D.; CIOLACU, F.; POPA, V. I. AMORPHOUS CELLULOSE – STRUCTURE AND CHARACTERIZATION. **CELLULOSE CHEMISTRY AND TECHNOLOGY**, v. 45, p. 13–21, 2011.

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

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

ELY, F. et al. *Educação*. v. 30, n. 7, p. 1776–1779, 2007.

FARIA-TISCHER, P. C. S. et al. Preparation of cellulose II and III films by allomorphic conversion of bacterial cellulose I pellicles. **Materials Science and Engineering C**, v. 51, p. 167–173, 2015.

FARIA-TISCHER, P. C. S.; RIBEIRO-VIANA, R. M.; TISCHER, C. A. Bio-based nanocomposites: Strategies for cellulose functionalization and tissue affinity studies. In: **Materials for Biomedical Engineering: Biopolymer Fibers**. [s.l.] Elsevier Inc., 2019. p. 205–244.

FERNANDES, S. N. et al. Mind the Microgap in Iridescent Cellulose Nanocrystal Films. **Advanced Materials**, v. 29, n. 2, p. 1–7, 2017.

FU, L.; ZHANG, J.; YANG, G. Present status and applications of bacterial cellulose-based materials for skin tissue repair. **Carbohydrate Polymers**, v. 92, n. 2, p. 1432–1442, 2013.

GARCIA, M. V. D. Síntese , caracterização e estabilização de

nanopartículas de prata para aplicações bactericidas em têxteis. **Universidade Estadual de Campinas, Campinas**, p. 77, 2011a.

GARCIA, M. V. D. Síntese , caracterização e estabilização de nanopartículas de prata para aplicações bactericidas em têxteis. **Universidade Estadual de Campinas, Campinas**, p. 77, 2011b.

GARDNER, D. J. et al. Adhesion and Surface Issues in Cellulose and Nanocellulose. **Journal of Adhesion Science and Technology**, v. 22, n. 5–6, p. 545–567, 2008.

GIESE, M. et al. Functional materials from cellulose-derived liquid-crystal templates. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 54, n. 10, p. 2888–2910, 2015.

GONÇALVES, M. C. et al. Antimicrobial Activity of Nanocrystals. In: ALMEIDA, F.; TAFT, C. A. (Eds.). **Emerging Research in Science and Engineering Based on Advanced Experimental and Computational Strategies**. Antimicrobial Activity of Nanocrystals: Springer, Cham, 2020. p. 209–221.

GUIDETTI, G. et al. Flexible Photonic Cellulose Nanocrystal Films. **Advanced Materials**, v. 28, n. 45, p. 10042–10047, 2016.

HUBBE, M. A. et al. Cellulosic nanocomposites: a review. **BioResources**, v. 3, n. 3, p. 929–980, 2008.

JANARDHANAN, S.; SAIN, M. M. Cellulose Microfibril Isolation enzymatic. **BioResources**, v. 1, n. 2, p. 176–188, 2006.

JONAS, R.; FARAH, L. F. Production and application of microbial cellulose. **Polymer Degradation and Stability**, v. 59, n. 1–3, p. 101–106, 1998.

JOZALA, A. F. et al. Bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter xylinus* by employing alternative culture media. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, n. 3, p. 1181–1190, 2015.

JOZALA, A. F. et al. Bacterial nanocellulose production and application : a 10-year overview. p. 2063–2072, 2016.

KHAN, S. et al. Bacterial cellulose-titanium dioxide nanocomposites: nanostructural characteristics, antibacterial mechanism, and biocompatibility. **Cellulose**, v. 22, n. 1, p. 565–579, 2015.

KIM, D. Y.; NISHIYAMA, Y.; KUGA, S. Surface acetylation of bacterial cellulose. **Cellulose**, v. 9, n. 3–4, p. 361–367, 2002.

KIM, Y. S. et al. Subchronic oral toxicity of silver nanoparticles. **Particle and Fibre Toxicology**, v. 7, p. 1–11, 2010.

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

KLEMM, D. et al. **Nanocelluloses as innovative polymers in research and application** **Advances in Polymer Science** Springer Berlin Heidelberg, , 2006.

KLEMM, D. et al. Nanocelluloses: A new family of nature-based

materials. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 50, n. 24, p. 5438–5466, 2011.

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.

LAGERWALL, J. P. F. et al. Cellulose nanocrystal-based materials: from liquid crystal self-assembly and glass formation to multifunctional thin films. **NPG Asia Materials**, v. 6, n. 1, p. e80–e80, jan. 2014.

LIU, R. et al. Synthesis of cellulose-2,3-bis(3,5-dimethylphenylcarbamate) in an ionic liquid and its chiral separation efficiency as stationary phase. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 4, p. 6161–6168, 2014.

LOPES, T. D. et al. Bacterial cellulose and hyaluronic acid hybrid membranes: Production and characterization. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 67, p. 401–408, 2014.

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

MOON, R. J. et al. **Cellulose nanomaterials review: Structure, properties and nanocomposites**. [s.l: s.n.]. v. 40

MORÁN, J. I. et al. Extraction of cellulose and preparation of nanocellulose from sisal fibers. **Cellulose**, v. 15, n. 1, p. 149–159, 2008.

MORONES, J. R. et al. The bactericidal effect of silver nanoparticles. **Nanotechnology**, v. 16, n. 10, p. 2346–2353, 2005.

NOGUEZ, C. Surface plasmons on metal nanoparticles: The influence of shape and physical environment. **Journal of Physical Chemistry C**, v. 111, n. 10, p. 3606–3619, 2007.

O'SULLIVAN, A. C. Cellulose: The structure slowly unravels. **Cellulose**, v. 4, n. 3, p. 173–207, 1997.

OKSMAN, K. et al. Manufacturing process of cellulose whiskers/polylactic acid nanocomposites. **Composites Science and Technology**, v. 66, n. 15, p. 2776–2784, 2006.

OLIVEIRA, S. A. et al. Production and characterization of bacterial cellulose membranes with hyaluronic acid from chicken comb. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 97, p. 642–653, 2017.

PERSSON, J.; CHANZY, H.; SUGIYAMA, J. Combined Infrared and Electron Diffraction Study of the Polymorphism of Native Celluloses. **Macromolecules**, v. 89, n. 9, p. 118–131, 1991.

PINKERT, A. et al. Ionic Liquids and Their Interaction with Cellulose. **Chemical Reviews**, v. 109, n. 12, p. 6712–6728, dez. 2009.

RATYAKSHI; CHAUHAN, R. P. Colloidal synthesis of silver nano particles. **Asian Journal of Chemistry**, v. 21, n. 10, 2009.

REVIN, V. et al. Cost-effective production of bacterial cellulose using

acidic food industry by-products. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 49, p. 151–159, 2018.

REVOL, J. F. et al. Helicoidal self-ordering of cellulose microfibrils in aqueous suspension. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 14, n. 3, p. 170–172, jun. 1992.

RIBEIRO-VIANA, R. M.; FARIA-TISCHER, P. C. S.; TISCHER, C. A. Preparation of succinylated cellulose membranes for functionalization purposes. **Carbohydrate Polymers**, v. 148, p. 21–28, 2016a.

RIBEIRO-VIANA, R. M.; FARIA-TISCHER, P. C. S.; TISCHER, C. A. Preparation of succinylated cellulose membranes for functionalization purposes. **Carbohydrate Polymers**, v. 148, 2016b.

SCHNEPP, Z. Biopolymers as a flexible resource for nanochemistry. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 52, n. 4, p. 1096–1108, 2013.

SCHWANNINGER, M. et al. Effects of short-time vibratory ball milling on the shape of FT-IR spectra of wood and cellulose. v. 36, p. 23–40, 2004.

SHANKAR, S.; RHIM, J. W. Tocopherol-mediated synthesis of silver nanoparticles and preparation of antimicrobial PBAT/silver nanoparticles composite films. **LWT - Food Science and Technology**, v. 72, p. 149–156, 2016.

SHOEIB, T. et al. A comparison of copper ( I ) and silver ( I ) complexes of glycine , diglycine and triglycine. p. 853–861, 2001.

SHOEIB, T.; SIU, K. W. M.; HOPKINSON, A. C. Silver ion binding energies of amino acids: Use of theory to assess the validity of experimental silver ion basicities obtained from the kinetic method. **Journal of Physical Chemistry A**, v. 106, n. 25, p. 6121–6128, 2002.

SOLOMON, S. D. et al. Synthesis and Study of Silver Nanoparticles. **Journal of Chemical Education**, v. 84, n. 2, p. 322, 2007.

TERINTE, N.; IBBETT, R.; SCHUSTER, K. C. Overview on Native Cellulose and Microcrystalline Cellulose I Structure Studied By X-Ray Diffraction ( Waxd ): Comparison Between Measurement Techniques. **Lenzinger Berichte**, v. 89, p. 118–131, 2011.

TISCHER, P. C. S. F. et al. Nanostructural reorganization of bacterial cellulose by ultrasonic treatment. **Biomacromolecules**, v. 11, n. 5, p. 1217–1224, 2010.

VIMALA, K. et al. Controlled silver nanoparticles synthesis in semi-hydrogel networks of poly(acrylamide) and carbohydrates: A rational methodology for antibacterial application. **Carbohydrate Polymers**, v. 75, n. 3, p. 463–471, 2009.

WEISS, I. M. et al. Thermal decomposition of the amino acids glycine, cysteine, aspartic acid, asparagine, glutamic acid, glutamine, arginine and histidine. **BMC Biophysics**, v. 11, n. 1, p. 1–15, 2018.

WINTER, G. D. © 1962 Nature Publishing Group. **Nature**, p. 261, 1962.

WU, J. et al. In situ synthesis of silver-nanoparticles/bacterial cellulose composites for slow-released antimicrobial wound dressing. **Carbohydrate**

**Polymers**, v. 102, n. 1, p. 762–771, 2014.

WU, J. M.; LIU, R. H. Cost-effective production of bacterial cellulose in static cultures using distillery wastewater. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 115, n. 3, p. 284–290, 2013.

YUN, J. H.; KIM, J. H.; LEE, J.-E. Surface Film Formation in Static-Fermented Rice Vinegar: A Case Study. **Mycobiology**, v. 47, n. 2, p. 250–255, 2019.