

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CAMPUS SOROCABA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS MATERIAIS

**THAÍS SOARES DE GÓES**

**OBTENÇÃO DE NANOCELULOSE BACTERIANA DE KOMBUCHA**

SOROCABA, 2020

Góes, Thaís Soares de

Obtenção de Nanocelulose Bacteriana de Kombucha /  
Thaís Soares de Góes -- 2020.  
88f.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de São  
Carlos, campus Sorocaba, Sorocaba  
Orientador (a): Dra. Adriana de Oliveira Delgado Silva  
Banca Examinadora: Dra. Maíra de Lourdes Rezende  
Komatsu, Dra. Iolanda Cristina Silveira Duarte  
Bibliografia

1. Celulose Bacteriana. Biopolímero. Nanocelulose. I.  
Góes, Thaís Soares de. II. Título.

Ficha catalográfica desenvolvida pela Secretaria Geral de Informática  
(SIn)

DADOS FORNECIDOS PELO AUTOR

Bibliotecário responsável: Maria Aparecida de Lourdes Mariano -  
CRB/8 6979



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**

Centro de Ciências e Tecnologias Para a Sustentabilidade  
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Materiais

---

**Folha de Aprovação**

---

Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Thais Soares de Góes, realizada em 24/03/2020.

**Comissão Julgadora:**

Profa. Dra. Adriana de Oliveira Delgado Silva (UFSCar)

Profa. Dra. Máira de Lourdes Rezende Komatsu (Fatec-SO)

Profa. Dra. Iolanda Cristina Silveira Duarte (UFSCar)

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.  
O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Materiais.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CAMPUS SOROCABA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS MATERIAIS

**THAÍS SOARES DE GÓES**

**OBTENÇÃO DE NANOCELULOSE BACTERIANA DE KOMBUCHA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Materiais da Universidade Federal de São Carlos Campus Sorocaba como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Mestra na Área de Materiais Funcionais e Polímeros de Fontes Renováveis.

Orientação: Profa. Dra. Adriana de Oliveira Delgado Silva

Co-orientação: Prof. Dr. Aparecido Junior de Menezes

SOROCABA, 2020

Dedico este trabalho à minha querida família.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus por me dar saúde, força e sabedoria para poder executar minhas atividades e assim permitindo a conclusão de mais uma etapa de minha vida.

À Universidade Federal de São Carlos Campus Sorocaba, seus professores e funcionários que de diversas formas contribuíram tanto no âmbito acadêmico como pessoal.

Aos meus pais Anilza e Jonas, que sempre me aconselharam, apoiaram e são minha inspiração para que eu continuasse lutando pelos meus objetivos.

Ao meu irmão Thiago, por acreditar em mim e sempre me apoiar a crescer academicamente.

Ao meu namorado David Oliveira pela força, por acreditar em mim e por todo o amor. À minha orientadora Dra. Adriana de Oliveira Delgado Silva, pela confiança, paciência e principalmente pelos ensinamentos e direcionamento ao desenvolvimento deste trabalho.

Ao meu coorientador Dr. Aparecido Júnior de Menezes, por acreditar em mim, pela ajuda em cada etapa, sempre compartilhando seus conhecimentos, e incentivando em meu crescimento acadêmico.

Aos professores Iolanda, Fábio Leite, Walter e Marcelo Assumpção por todo o suporte relacionado aos reagentes, laboratórios e equipamentos que foram cedidos para a realização deste trabalho.

À Capes, pelo auxílio financeiro.

Às minhas colegas Jéssica, Akemi, Ariana, Larissa, Karen Prado, Vinicius Leles e Mônica pela parceria e colaboração em diversas etapas desde projeto, desde a troca de experiências até ao auxílio nos experimentos e caracterizações.

Às minhas amigas, de longa data, Juliane Alcoléa, Evelyn Gimenez, Laís Estevão e Júlia Marques, por torcerem sempre por mim, e me apoiarem neste momento crucial de minha vida, especialmente com palavras de incentivo e de carinho.

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”

(Arthur Schopenhauer)

GOES, T. S. Obtenção de Nanocelulose Bacteriana de Kombucha. 2020 88 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Materiais) – Universidade Federal de São Carlos, Sorocaba, 2020.

## RESUMO

Atenção especial tem sido dada nos últimos anos à busca por materiais sustentáveis que ofereçam menores impactos ao meio ambiente. Dessa forma, destaca-se a celulose, polímero natural abundante e presente em diferentes fontes renováveis, sejam vegetais ou microbianas. As últimas são capazes de produzir a chamada celulose bacteriana (CB), com vantagens como: ausência de lignina e hemiceluloses, alta resistência à tração, elasticidade, durabilidade e alta cristalinidade, além de ser biodegradável, atóxica e biocompatível. As membranas de Kombucha (KC), são fontes de CB ainda pouco exploradas. A KC, é subproduto de bebida milenar, consideradas películas celulósicas que podem ser obtidas por meio da fermentação de chá preto ou verde. Com isso, o objetivo deste estudo foi a produção e a caracterização das propriedades físicas e químicas de CB, a partir das membranas de celulose bacteriana de Kombucha (MCBK) cultivadas em chá verde e sacarose, além da obtenção de nanocelulose bacteriana de Kombucha (NCCB), via reação hidrolítica. As MCBK foram produzidas por meio de um consórcio simbiótico de leveduras e bactérias, cultivadas pela fermentação de chá verde e sacarose, a partir de um pré-inóculo da própria MCBK, mantidos em estufa a 35°C por 21 dias, os quais foram purificadas com água destilada e hidróxido de sódio (NaOH) posteriormente. Para as suspensões de NCCB, estas foram obtidas mediante reação de hidrólise ácida das MCBK, com ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) a 64% e 50°C, variando o tempo reacional, seguida do processo de diálise até pH neutro. As MCBK antes e após purificação foram caracterizadas mediante as técnicas de microscopia de força atômica (AFM), microscopia eletrônica de varredura (MEV), espectroscopia de energia dispersiva (EDS), espectroscopia de absorção no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) e Difração de Raio-X (DRX). As suspensões de NCCB foram caracterizadas apenas por AFM. Análises de AFM e MEV revelaram a morfologia das estruturas das MCBK em longas cadeias fibrosas, que se apresentaram aglomeradas e entrelaçadas. As intensidades relativas por DRX variaram após o processo de purificação, indicando possível alteração na cristalinidade. A presença dos elementos carbono e oxigênio nas MCBK antes e após purificação também foram confirmados por EDS. Assim, conclui-se que por meio da caracterizações mencionadas e pela morfologia das NCCB, estas oferecem resistência em suas cadeias celulósicas durante o ataque ácido, que pode ser observado pelas imagens de AFM, devido a presença de curvaturas nas nanofibrilas de KC, que por vez a potencializa como fonte promissora de matéria-prima, para produção de novos materiais sustentáveis.

Palavra-chave: Nanociência. Fontes Renováveis. Celulose Bacteriana. Biopolímeros.



GOES, T. S. Obtaining of Bacterial Nanocellulose from Kombucha. 2020 88 p. Dissertation (Master degree in Material Sciences) – Universidade Federal de São Carlos, Sorocaba, 2020.

## ABSTRACT

In the last years, sustainable materials that provide less environmental impact are gaining special attention. In this context, cellulose, a natural and abundant polymer from several renewable vegetable and microbial sources, is being highlighted in related literature. Bacterial cellulose (BC) from microbial sources presents several advantageous properties as lignin and hemicellulose absence, high resistance to traction, elasticity, durability, and a high degree of crystallinity. Also, BC is biodegradable, non-toxic, and biocompatible. A less explored source of BC includes Kombucha membranes (KM), a by-product of Kombucha's ancient beverage. KM are cellulosic pellicles derived from the fermentation of black or green tea broth. Thus, the main objective of this study was the production and characterization of the physical and chemical properties of BC obtained from Kombucha's bacterial cellulose membranes (KBCM) based on the fermentation of green tea broth with added sucrose. We also aimed at the production of bacterial nanocellulose from Kombucha beverage (BNKB) via a hydrolytic reaction. KBCM was produced using a symbiotic consortium of bacteria and yeast during the fermentation of green tea broth and sucrose inoculated with an initial KBCM solution and fermented at 35°C for 21 days. After, the KBCM solution was purified using distilled water and sodium hydroxide (NaOH). BNKB were extracted via KBCM acid hydrolysis with 64% sulfuric acid at 50°C, and reaction time variation, followed by dialysis processes until reach a neutral pH value. KBCM were analyzed before and after the purification process using atomic force microscopy (AFM), scanning electron microscopy (SEM), energy-dispersive spectroscopy (EDS), Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy, and X-ray diffraction (XRD). Suspensions containing BNKB were characterized by AFM only. KBCM before and after purification were characterized by the techniques of atomic force microscopy (AFM), scanning electron microscopy (SEM), dispersive energy spectroscopy (EDS), infrared absorption spectroscopy with Fourier transform (FTIR) and Diffraction X-ray (XRD). BNKB suspensions were characterized only by AFM. AFM and SEM analyzes revealed the morphology of the BNKB structures in long fibrous chains, which were clustered and interlaced. The relative intensities by XRD varied after the purification process, indicating a possible change in crystallinity. The presence of carbon and oxygen elements in KBCM before and after purification were also confirmed by EDS. Thus, it is concluded that through the mentioned characteristics and the BNKB morphology, they offer resistance in their cellulosic chains during the acid attack, which can be observed by the AFM images, due to the presence of curvatures in the KC nanofibrils, which by time it leverages it as a promising source of raw material for the production of new sustainable materials.

Keywords: Nanoscience. Renewable Sources. Bacterial Cellulose. Biopolymers.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFM: Microscopia de força atômica

CB: celulose bacteriana

CMC: microcristais de celulose

CMF: microfibras de celulose

CNC: nanocristais de celulose

CNF: nanofibrilas de celulose

DRX: Difração de Raio - X

EDS: Espectroscopia de Energia Dispersiva

FTIR: Espectroscopia de Absorção na região do Infravermelho com Transformada de Fourier

HÁ: hidrólise ácida

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>: ácido sulfúrico

HCl: ácido clorídrico

KC: Kombucha

KOH: hidróxido de potássio

MCBK: membrana de celulose bacteriana de Kombucha

MCBK<sub>OH</sub>: membrana de celulose bacteriana de Kombucha purificada com NaOH

MEV: Microscopia eletrônica de varredura

NaOH: hidróxido de sódio

NC: nanocelulose

NCCB: nanocelulose bacteriana

NCCBK: nanocristais de celulose bacteriana de Kombucha

NFCBK: nanofibrila de celulose bacteriana de Kombucha

NFCBK<sub>OH</sub>: nanofibrila de celulose bacteriana de Kombucha purificada com NaOH

NFCBK<sub>g</sub>: nanofibrila de celulose bacteriana de Kombucha gelatinosa purificada 0,1 molar

NFCBK<sub>gM</sub>: nanofibrila de celulose bacteriana de Kombucha gelatinosa purificada 1 molar

NFCBK<sub>s</sub>: nanofibrila de celulose bacteriana de Kombucha sobrenadante purificada 0,1 molar

NFCBK<sub>sM</sub>: nanofibrila de celulose bacteriana de Kombucha sobrenadante purificada 1 molar

SCOBY: Cultura simbiótica de bactérias e leveduras

TAPPI: Associação Técnica da Indústria de Celulose e Papel

RA: razão de aspecto

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Monômero da celulose a celobiose.....	16
Figura 2 - Estrutura da microfibrila .....	17
Figura 3 - Estrutura da CB .....	18
Figura 4 - Representação esquemática da CB.....	19
Figura 5 - Formação de CNC mediante hidrólise ácida em regiões amorfas.....	26
Figura 6 - Fluxograma experimental .....	31
Figura 7 - Fluxograma das etapas de síntese das MCBK .....	32
Figura 8 - Preparo e obtenção das membranas em meio de chá verde .....	34
Figura 9 - Membranas purificadas com água antes e após secagem.....	41
Figura 10 - Membrana purificada em NaOH antes e após secagem em estufa.....	41
Figura 11 - Etapas de produção dos NFCBK .....	42
Figura 12 - Parte experimental para obtenção das NFCBK.....	42
Figura 13 - Espectro de infravermelho da MCBK lavada com H <sub>2</sub> O destilada.....	43
Figura 14 - Espectro de infravermelho da amostra de MCBK tratada com NaOH .....	44
Figura 15 - Espectro de EDS da MCBK .....	45
Figura 16 - Espectro de EDS da MCBKOH .....	45
Figura 17 - Difratoograma da MCBK purificada com H <sub>2</sub> O.....	46
Figura 18- Difratoograma da MCBK purificada com 0,1M NaOH .....	47
Figura 19- Difratoograma da MCBK purificada com 1M NaOH .....	47
Figura 20- Imagens das MCKB original em diferentes ampliações .....	49
Figura 21- Imagens das MCBK <sub>OH</sub> 0,1M em diferentes ampliações.....	50
Figura 22 - Imagens das MCBK <sub>OH</sub> 1M em diferentes ampliações.....	50
Figura 23 - Micrografia de MEV das MCBK e MCBKOH.....	52
Figura 24 - Imagem NFCBK sem purificação.....	54
Figura 25 - Imagens NFCBKOH obtidas em 3 min.....	55
Figura 26 - Imagem da NFCBKOH obtida em 4 min .....	56
Figura 27 - Imagens de NFCBKOH obtidas em 5 min.....	57
Figura 28 - Imagens das suspensões gelatinosas NFCBK <sub>g</sub> obtidas em 3, 4 e 5 min...	59
Figura 29 - Imagens das NFCBK <sub>gM</sub> obtidas em 3, 5, 10 min.....	61
Figura 30 - Imagens das NFCBKs obtidas de 3min.....	63
Figura 31 - Imagens das NFCBKs obtidas de 4 min.....	64
Figura 32 - Imagens das NFCBKs obtidas de 10 min.....	65
Figura 33- Imagens das NFCBK <sub>SM</sub> obtidas de 3 min.....	66
Figura 34 - Imagens das NFCBK <sub>SM</sub> obtidas de 4 min.....	66
Figura 35 - Imagens das NFCBKs obtidas de 5 min.....	67
Figura 36 - Modos vibracionais simétricos e assimétricos de uma molécula.....	83
Figura 37 - Esquema de difração de raios-X em materiais com plano cristalino.....	84
Figura 38 - Esquema operacional de um difratômetro na geometria Bragg-Brentano..	84

Figura 39- Diagrama de funcionamento do AFM.....	85
Figura 40 – Desenho ilustrativo dos componentes básicos do MEV.....	87

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Propriedade mecânica das CB em relação outros materiais .....	22
Tabela 2 - Tempo de hidrólise e identificação das amostras .....	35
Tabela 3 - Valores das concentrações e diluições obtidas .....	38
Tabela 4 - Tabela com a síntese dos resultados obtidos nesse trabalho.....	69
Tabela 5- Tabela comparativa dos tamanhos obtidos das NFCBK.....	70

## SUMÁRIO

<b>1.INTRODUÇÃO.....</b>	<b>12</b>
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>15</b>
2.1 Objetivo geral .....	15
2.2 Objetivos específicos.....	15
<b>3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA .....</b>	<b>16</b>
3.1 Celulose .....	16
3.2 Celulose Bacteriana .....	18
3.2.1 Propriedades, morfologia e aplicação.....	21
3.3 Kombucha.....	22
3.4 Nanocelulose .....	25
3.5 Aplicações de Nanocelulose Bacteriana .....	28
<b>4 METODOLOGIA .....</b>	<b>31</b>
4.1 Fluxograma experimental .....	31
4.2 Preparo e Inoculação dos meios cultura.....	31
4.2.1 Meio de controle – Chá verde fermentado (Kombucha).....	32
4.2.2 Purificação das membranas de celulose bacteriana com água destilada.....	33
4.2.3 Purificação das membranas de celulose bacteriana em NaOH.....	33
<b>4.3 Suspensões de Nanofibrilas de celulose bacteriana de Kombucha.....</b>	<b>33</b>
4.3.1 Suspensões de Nanofibrilas de celulose bacteriana de Kombucha (NFCBK <sub>OH</sub> ) purificada com NaOH .....	36
4.3.2 Suspensões de Nanofibrilas de celulose bacteriana de Kombucha em estado gelatinoso (NFCBK <sub>g</sub> e NFCBK <sub>gM</sub> ) purificada com NaOH .....	36
4.3.3 Suspensões de sobrenadante de Nanofibrilas de celulose bacteriana de Kombucha gelatinoso (NFCBKs e NFCBKs <sub>M</sub> ).....	37
4.3.4 Preparo para caracterização das MCBK e NFCBK via AFM .....	37
<b>4.4 Caracterização.....</b>	<b>39</b>
4.4.1 Espectroscopia de Absorção no Infravermelho com Transformada de Fourier..	39
4.4.2 Difração de Raio X.....	39
4.4.3 Microscopia de Varredura.....	39
4.4.4 Espectroscopia de Energia Dispersiva.....	40

<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>41</b>
<b>5.1 Caracterização das Membranas de Kombucha .....</b>	<b>43</b>
5.1.1 Composição química.....	43
5.1.2 Cristalinidade.....	46
5.1.3 Morfologia.....	48
5.1.3.1 Micrografia de força atômica .....	48
5.1.3.2 Micrografia Eletrônica de Varredura.....	51
<b>5.2 Caracterização das Nanofibrilas de Kombucha.....</b>	<b>53</b>
5.2.1 Micrografia de Força Atômica.....	53
5.2.2 Análise morfológicas das suspensões de NFCBK.....	53
5.2.3 Análise morfológicas das suspensões de NFCBK <sub>OH</sub> .....	54
5.2.4 Análise morfológicas das suspensões de NFCBK <sub>g</sub> .....	58
5.2.5 Análise morfológicas das suspensões de NFCBK <sub>gM</sub> .....	61
5.2.6 Análise morfológicas das suspensões de NFCBK <sub>s</sub> .....	62
5.2.7 Análise morfológicas das suspensões de NFCBK <sub>sM</sub> .....	65
5.2.8 Síntese dos resultados de morfologia.....	68
<b>6 CONCLUSÃO .....</b>	<b>71</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>73</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>81</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, devido aos impactos globais provocados pelo homem, em especial os problemas ambientais, tem-se acentuado o interesse da sociedade e, em particular, da comunidade científica, para o desenvolvimento de materiais ecologicamente amigáveis (GONG et al., 2017; LIMA et al., 2015).

Neste contexto o termo biodegradabilidade vem ganhando força, sendo que, materiais de base biológica têm sido amplamente estudados e utilizados no desenvolvimento de bionanocompósitos. Dentre esses materiais biológicos, destacam-se os nanocristais de celulose (CNC) e nanofibrilas (CNF) de celulose, obtidos a partir de fontes naturais, tais como plantas, bactérias e algas, por exemplo (GONG et al., 2017; Xu et al., 2013).

Por sua vez, tanto os CNC como CNF podem atuar como agentes de reforços em matrizes poliméricas, naturais ou sintéticas, classificando-os como nanocompósitos. A ampla aplicação dos materiais nanocompósitos tem se apresentado como alternativa promissora aos compósitos comuns, principalmente em setores industriais, de embalagens, alimentos e afins (WOEHL et al., 2010; SIQUEIRA et al., 2009; XU et al., 2013; PRADO et al., 2019).

Destaca-se a utilização de fontes renováveis, como matéria-prima sustentável, e considerável potencial de aplicações nesse campo científico. Dentre as fontes naturais para o desenvolvimento de polímeros biodegradáveis, destaca-se o amido e a celulose, podendo ser encontrados em grande escala na natureza (LAHIJI et al., 2010).

A celulose é um polímero natural que pode ser encontrado em abundância a partir de fontes renováveis terrestres (madeira, rami, juta, algodão, entre outros), algas marinhas, tunicados e de algumas bactérias (LIMA et al., 2015; PRADO et al., 2019). As nanoceluloses (denominadas por nanofibrilas ou nanocristais) podem ser adotadas como material de reforço na produção de novos materiais, além de oferecerem melhores propriedades físico-químicas, grande área superficial específica, alta resistência e baixa densidade (LIMA et al., 2015; XU et al., 2013; PRADO et al., 2019).

Uma fonte promissora para obtenção da celulose são as bactérias, capazes de produzir a chamada celulose bacteriana (CB), que tem tido notável crescimento neste



campo da nanociência que busca alternativas dos produtos sintético por sustentáveis, em especial porque as CB não necessitam de tratamentos complexos para sua extração comparadas às celuloses vegetais, e também pelas CB oferecerem excelentes propriedades mecânicas, como resistência a tração entre outros, por exemplo (LIMA et al.,2015).

Segundo os autores (LIMA et al., 2015; PIRICH, 2017; SOUZA,2012; BRANDES et al., 2016; PRADO et al.,2019), um dos processos mais empregados para obtenção de nanocelulose, vegetais e/ou bacterianas, é o processo de hidrólise ácida, geralmente empregando um ácido de caráter forte, por exemplo, ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$

Ressalta-se, considerável aplicação de nanocelulose bacteriana para uso como biossensores, no campo biomédico, capazes de promover diagnósticos medicinais, precursores cirúrgicos e também como agentes de reforços em matrizes poliméricas, conferindo melhores desempenhos mecânicos e de resistência aos novos nanomateriais (WOEHL et al., 2009; LIMA et al., 2015; KONDAGESKI, 2016; PIRICH, 2017).

Com base no exposto, o presente estudo tem por objetivo obter membranas de celulose bacteriana, a partir de membrana de Kombucha (MCBK), e destas produzir as nanofibrilas de celulose bacteriana de Kombucha (NFCBK), a fim de determinar as condições ideais de isolamento das NFCBK e assim verificar suas dimensões e morfologia, que poderão atuar como agentes de reforços.

A investigação de uma fonte de CB como a KC reforça a necessidade de melhor explorá-la devido à pouca demanda de trabalhos científicos que discutam suas potencialidades e a torna promissora por ser de fácil obtenção e baixo custo.

Os desafios e também vantagens dessa CB se encontram em explorar minuciosamente suas condições experimentais, uma vez que requerem processos simples de obtenção, o que viabiliza maiores análises de suas propriedades, como mecânica, química, toxicidade, biodegradabilidade entre outros.

Para tanto, foram investigadas as melhores condições reacionais de hidrólise ácida para isolamento da nanocelulose, tais como concentração de ácido, tempo e temperatura. Além disso foram empregados as principais técnicas microscópicas de caracterização para avaliar e interpretar a morfologia e composição química das amostras em estudo, dentre elas microscopia de força atômica (AFM), microscopia eletrônica de varredura (MEV), espectroscopia de energia dispersiva (EDS), espectroscopia de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) e Difração de Raio-X (DRX).

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Obter as membranas de celulose bacteriana de Kombucha a partir do chá verde e obter as nanofibrilas de celulose via hidrólise ácida.

### **2.2 Objetivos específicos**

Os objetivos específicos deste trabalho são:

- Caracterizar morfológicamente (AFM e MEV) as membranas de celulose bacteriana;
- Caracterização da composição química de elementos e grupos químicos, e a cristalinidade das MCBK via EDS, FTIR e DRX.
- Investigar o efeito do tempo de hidrólise ácida para obtenção das nanofibrilas;
- Caracterizar morfológicamente as nanofibrilas de celulose via AFM.

### 3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

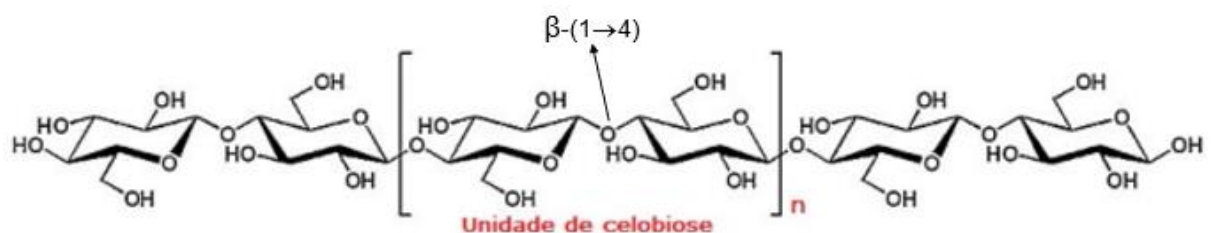
#### 3.1 Celulose

A celulose  $(C_6H_{10}O_5)_n$  é o biopolímero mais abundante da natureza e possui uma taxa de regeneração superior a 1000 t/ano por meio da fotossíntese. Dentre as plantas que apresentam uma elevada quantidade de celulose destacam-se o linho, juta, algodão, rami e cânhamo. Pode também ser encontrada em alguns animais marinhos, por exemplo, os tunicados e em menor proporção em fungos, algas, bactérias e até em protozoários (PEREIRA et al., 2014; CÉSAR et al., 2015).

Esse biopolímero apresenta as seguintes características: é fibroso, resistente, insolúvel em água, biodegradável e responsável pela manutenção da estrutura das paredes celulares das plantas (CÉSAR et al., 2015; SILVA et al., 2009).

É um polissacarídeo linear, cuja estrutura regular é constituída por unidades repetidas de  $\beta$ -D-glicopiranosose unidas por ligações glucosídicas do tipo  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) como observado figura 1. Podem ser observados a unidade repetitiva, conhecida como celobiose, os grupos hidroxilas que promovem a formação de ligações de hidrogênio (DE MENEZES, 2007; PEREIRA et al., 2014).

**Figura 1-** Estrutura da celulose.



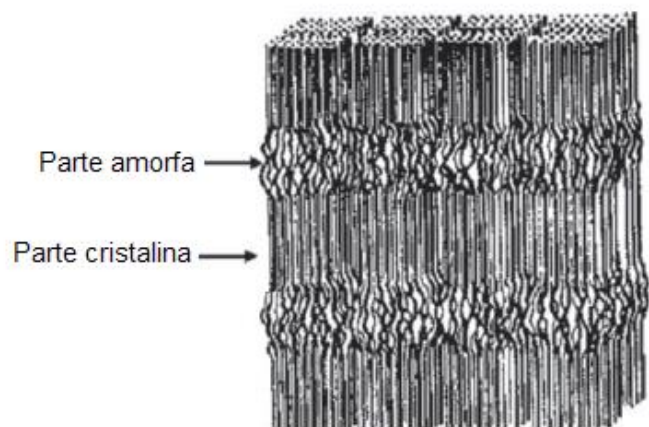
Fonte: FERRER et al, 2017

A celulose nativa, denominada celulose do tipo I, é a mais abundante e apresenta duas conformações, denominadas celulose I $\alpha$  e I $\beta$ . Sendo que a I $\alpha$  pode ser encontrada em maior quantidade em bactérias, algas e amebas, enquanto I $\alpha$  e I $\beta$  estão presentes em plantas superiores, e as células unitárias I $\beta$  podem ser especialmente encontradas em celuloses de algodão, rami e madeira (SANTOS, 2012). As cadeias de celulose são sintetizadas por enzimas e organizadas de forma

regular a se obter as microfibrilas. Essas estruturas são estabelecidas lateralmente por ligações de hidrogênio entre grupos hidroxilas e de oxigênio das moléculas adjacentes. As microfibrilas apresentam dimensões transversais que variam entre 2 a 20 nm, de acordo com o tipo de fonte celulósica (SAMIR, ALLOIN, DUSFRENE, 2005). O estudo das propriedades de resistência mecânica das nanofibras celulósicas tem sido alvo de grande interesse para a utilização destes como reforços em matrizes poliméricas (CÉSAR et al., 2015).

As interações das forças do tipo van der Waals e a ligações de hidrogênio promovem a formação de regiões altamente ordenadas, definidas como regiões cristalinas. Há também as regiões desordenadas, conhecidas como regiões amorfas, conforme apresentado na Figura 2. A proporção das regiões amorfas como das regiões cristalinas é diferente para cada tipo de espécie lignocelulósica (SANTOS, 2012; CÉSAR et al., 2015; SILVA et al., 2009).

**Figura 2-** Estrutura da microfibrila.

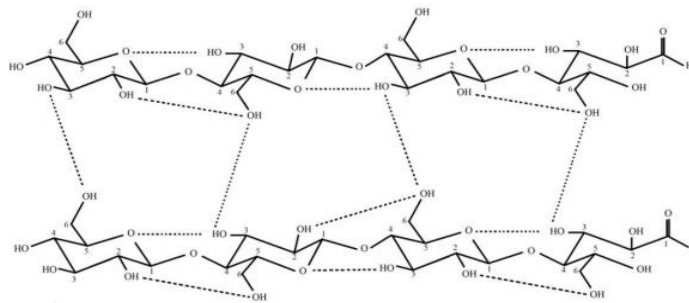


Fonte: ULLMAN, 2010

### 3.2 Celulose Bacteriana

A celulose bacteriana (CB) pode ser também denominada por biocelulose ou celulose microbiana (figura 3) e apresenta fórmula molecular similar à celulose vegetal, em especial a celulose tipo I, que possui grande quantidade da cela unitária  $1\alpha$  (KLEM et al., 2002; SANTOS, 2012).

**Figura 3- Estrutura da CB.**



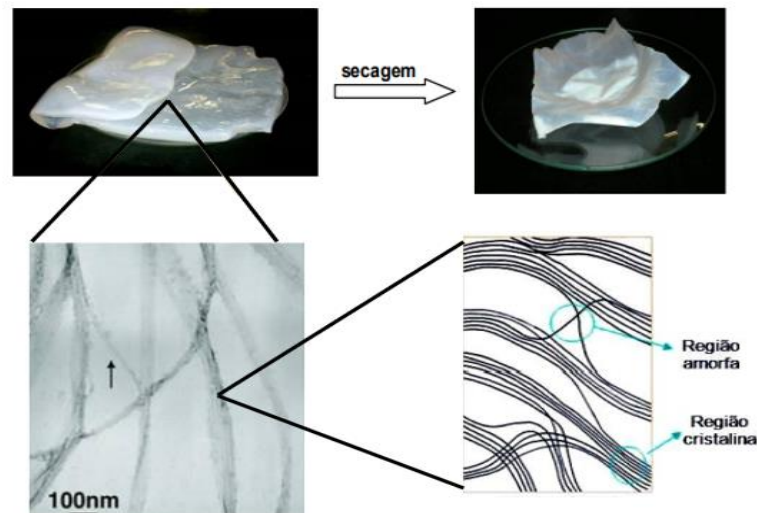
Fonte: ESA et al., 2014.

A CB é intitulada pelos produtores de vinagre como espécie de “mãe” ou “planta” do vinagre, sintetizada por bactérias aeróbicas, conhecidas por bactérias fermentadoras de ácido acético do gênero *Gluconacetobacter*, que se formam numa espécie de película gelatinosa e translúcida sobre a superfície dessas culturas microbianas (SANTOS, 2012; SOUZA, BRANDES, et al., 2016; WOEHL, et al, 2010).

O primeiro relato sobre celulose bacteriana aconteceu em 1886 por Adrian Brown, quando durante o processo de fermentação de vinagre, identificou uma espécie de película gelatinosa sobre a superfície. Com isso, a CB foi classificada a partir de *Acetobacter xylinus* (BROWN, 1886; BARREIRO, et al., 2010).

Tal película gelatinosa produzida compõe uma rede aleatória de microfibrilas, cujo diâmetro tem valores inferiores a 100nm, composta por longas cadeias celulósicas alinhadas paralelamente, envolta por regiões amorfas, com cadeias sem orientação definidas, como pode ser observada na figura 4, a qual ilustra a membrana bacteriana celulósica antes e após secagem, seguido de uma micrografia de microscopia eletrônica de varredura das microfibrilas de CB, e por último, as regiões que compõem as microfibrilas (WOEHL, et al., 2010).

**Figura 4-** Representação esquemática da CB.



Fonte: adaptado de Pirich, 2017.

De acordo com o estudo de Koizumi et al (2008), a parte amorfa das microfibrilas detém cerca de 90% do seu volume, e o volume da CB é constituído de 99% de água, de modo que essa região não oferece um valor significativo em massa (WOEHL, et al.,2010; PIRICH, 2017).

Segundo Recouvreux (2008), a bactéria *Acetobacter xylinus* foi reclassificada ao gênero *Gluconacetobacter*, denominada por *Gluconacetobacter xylinus* (*G.xylinus*). Outras espécies de bactérias que também fazem parte desse gênero, como: *G. hansenii*, *G. europaeus*, *G. oboediens* e *G. intermedius* (RECOUVREUX, 2008), por vez, reclassificadas para o gênero *Komagataeibacter*. Outras espécies também se fazem presente como *Achromobacter*, *Aerobacter*, *Agrobacterium*, *Rhizobium*, *Sarcina* e *Alcaligenes* (BIELECKI et al., 2005; DONINI et al,2010).

As bactérias da família Acetobacteraceae são Gram-negativas possuem formato de bacilos, são altamente resistentes as condições ácidas, além de crescerem em pH menores que 5,0. Contudo, chama-se atenção para a bactéria *G. xylinus*, uma vez que produz celulose em escala comercial com alta cristalinidade e pureza, sendo também capaz de metabolizar diversas fontes de açúcar para sintetizar o polímero (SANTOS, 2012; HOMMEL, 2014; ANTONIO, et al, 2012).

A síntese de CB a partir de gêneros diferentes de bactérias, não patogênicas e capazes de produzir celulose extracelular, podem ser obtidas através de processos fermentativos de açúcares, como por exemplo, oriundos de suco de frutas, melaço de cana, bebidas fermentadas como cervejas e vinhos não pasteurizados, Kombucha

(bebida gaseificada a base de chá verde/preto), além da nata de coco (sintetizada a partir da *G. xylinus*), resíduos agroindustriais, trigo, entre outros (LILLARD et al., 1999; MACHADO et al., 2018; BARREIRO, et al., 2010; JAYABALAN, 2016; CARREIRA et al., 2011; CHEN et al., 2013).

Por meio da síntese das CB, há possibilidade de testar várias condições experimentais, desde alteração composicional de nutrientes do meio (nitrogênio e carbono, por exemplo), que são capazes de oferecer diferentes características às membranas, tais como espessuras maiores (YIM et al., 2017).

A realização de culturas de microrganismos em laboratório, como experimentos *in vitro*, permitem que a produção de CB ocorra por meio de cultivo estático ou sob agitação que são responsáveis pelas diferentes morfologias das microfibrilas que formam as membranas (WANG et al., 2019; SANTOS, 2012; DONINI et al, 2010).

Logo, a espécie mais usual para estudos de CB é a *G. xylinus*, que apresenta oxidação incompleta para muito açúcares e álcoois e resulta na produção de uma camada de celulose entre a face líquido/ar. Assim, a produção eficaz da síntese de CB é dependente da espécie de linhagem da *Gluconacetobacter*, dos componentes para meio de cultura, temperatura, e em especial pelo fornecimento contínuo de oxigênio e carbono (SANTOS, 2012; DONINI et al, 2010; ANTONIO et al, 2012).

A produção da CB acontece a partir das membranas externas com o plasma da célula, pelo complexo sintetizado de celulose, o qual inicia-se com a glicose uridina difosfato (GUD glicose). Por sua vez, este complexo relaciona-se com os poros superficiais presentes na célula bacteriana, cujo diâmetro é de 3,5 nm. Com isso, a celulose sintase é responsável por catalisar a adição da GUD glicose, a fim de promover o desenvolvimento final da cadeia de celulose, presente na célula como uma fibrila elementar. Por fim, resultarão numa rede 3D com outras fibrilas, formando microfibrilas e fitas (SANTOS, 2012; DONINI et al, 2010).

Evidencia-se que a polimerização e cristalização das fibrilas estão relacionadas. Assim, uma célula sozinha tem potencial para produzir mais de 100 moléculas de glicose por hora formando a celulose (SANTOS, 2012; DONINI et al, 2010).



### 3.2.1 Propriedades, morfologia e aplicação

Comparada à celulose vegetal, a CB é considerada pura, pois é livre de lignina, hemiceluloses e outros constituintes lignocelulósicos, não exigindo processos de obtenção e purificação complexos (BROWN, SAXENA, KUDLICKA, 1996; BARREIRO, et al., 2010; PIRICH, 2017). A primeira, devido suas impurezas (hemiceluloses, lignina, pectina), requer tratamentos químicos para sua purificação, processos estes considerados altamente poluentes e que configuram danos irreversíveis às estruturas vegetais (PIRICH, 2017; RECOUVREUX, 2008).

As celulosas bacterianas apresentam cadeias formadas por longas nanofibrilas, com largura em escala nanométrica com dimensões de 1,5 nm aproximadamente de largura, além de conferirem maior área superficial em relação as fibras de celulose vegetal (WANG, et al., 2019; SANTOS, 2012).

As longas cadeias de nanofibrilas podem ser cristalizadas, e assim convertidas em microfibrilas, originando feixes de microfibrilas conforme ilustrado anteriormente pela figura 4. Tais microfibrilas tem aspecto ultrafino, cuja largura varia de 1 a 9 nm, de modo a estabelecer a formação de uma estrutura reticulada mantida por muitas ligações de hidrogênio. Dessa forma, essas redes oferecem às CB um alto índice de cristalinidade (60-90%) (KLEMM, et al., 2005; SANTOS, 2012).

Destaca-se especialmente que, devido sua estrutura, as CB apresentam excelentes propriedades físicas e mecânicas, além das características como maior capacidade de absorção e retenção de água, grande elasticidade, alta resistência mecânica e à tração, flexibilidade (LIMA, et al., 2015; SHEYKHNAZARI et al., 2011; PIRICH, 2017; DONINI et al, 2010).

As principais vantagens oferecidas pela CB, além de serem livres de impurezas, se relacionam a durabilidade, biodegradabilidade, não toxicidade e biocompatibilidade (LIMA et al., 2015; PIRICH, 2017; DONINI et al, 2010). Propriedades mecânicas como deformação, resistência a tração, módulo de Young, comparada a outros materiais orgânicos, pode ser observados na Tabela 1:

**Tabela 1-** Propriedade mecânica das CB em relação outros materiais

<b>Material</b>	<b>Módulo de Young (Gpa)</b>	<b>Resistência à tração (Mpa)</b>	<b>Deformação (%)</b>
Celulose Bacteriana (CB)	15 - 35	200 – 300	1,5 - 2,0
Polipropileno (PP)	1 – 1,5	30- 40	100 - 600
Poli(tereftalato de etileno) (PET)	3 – 4	50 – 70	50 - 300
Celofane	2 – 3	20 – 100	15 – 40

Fonte: Adaptado SANTOS, 2012.

Frente as principais vantagens que as CB oferecem, pode-se destacar o crescente interesse por essa fonte celulósica para aplicação nos mais diferentes setores e áreas, especialmente na utilização como agente de reforços estruturais em compósitos poliméricos, em indústrias alimentícias, dispositivos biomédicos, entre outros, (GINDL, KECKES, 2004; WOEHLE, et al., 2009; SANTOS, 2012; DONINI, et al, 2010).

A CB apresenta grau de polimerização (DP) (de 16.000 a 20.000)g/mol, superior quando comparada com outras fontes renováveis como algodão (DP>3000), linho (DP 7000-9000), polpa de madeira (DP 300-1000) (LIMA, et al.,2015; SHEYKHNAZARI et al., 2011; PIRICH, 2017, KLEMM, et al.,1998).

As desvantagens da CB se devem por demandarem um determinado tempo durante seu processo de produção (cerca de 21 dias), como condições axênicas para crescimento das bactérias, e condições reacionais da biossíntese (DIMA et al., 2017; ALMAGRO, 2019; JAYABALAN et al., 2010).

### **3.3 Kombucha**

Como exposto acima, as CB são consideradas uma biomassa em potencial, devido ao seu alto valor ecológico, principalmente por serem livres de impurezas quando comparada a celulose vegetal.

Assim, uma fonte promissora de CB é a membrana de Kombucha, popularmente conhecida como uma bebida fermentativa. A KC pode ser obtida por processos fermentativos em meios como chá verde, preto, bagaço de laranja, por exemplo. Uma das vantagens de se obter CB está relacionada ao rápido crescimento da bactéria em meios controlados como do processo de produção delas por diferentes

fontes de carbono, que contenham glicose, etanol, sacarose e glicerol (VILLAREAL-SOTO et al., 2018).

As KC caracterizam-se como películas celulósicas que se formam mediante processo de fermentação de chá verde ou preto, com um teor de 5 a 8% de sacarose, cujo cultura iniciadora deve-se a um consórcio simbiótico, chamado de SCOBY (cultura simbiótica de bactérias e leveduras), composto por bactérias e leveduras, capaz de inibir o crescimento de bactérias e outros microrganismos potencialmente contaminantes (DIMA et al., 2017; ALMAGRO, 2019; JAYABALAN et al., 2010; GAGGIA et al., 2018).

O consórcio simbiótico (SCOBY) são compostos pela presença de bactérias acéticas (especialmente dos gêneros *Gluconactobacter*, *Acetobacter*), menos de 1% de *Lactobacillus* e pelas leveduras mais abundantes: *Zygosaccharomyces* e *Brettanomyces* (JAYABALAN, 2016; GAGGIA et al., 2018).

No contexto histórico, o Kombucha (KC) é de origem asiática, sendo obtido pela primeira vez na região de Manchúria, nordeste da China, cerca de 220aC, com fins medicinais, pois detinha propriedades detoxificantes e energizantes, considerado uma bebida fermentada e gaseificada, levemente alcoólico (com teor alcoólico de 0,5 a 2,5%) e, quando a fermentação é prolongada, denomina-se, vinagre (DIMA et al., 2017; JAYABALAN et al., 2010).

Também conhecida por “fungo de chá”, a SCOBY, fase sólida, constitui-se como um hidrogel que se forma na interface entre o meio de cultura e o ar, num período compreendido entre 3 a 21 dias, sintetizado durante a fermentação. Tal biofilme microbiano, é composto por uma matriz com muitas camadas emaranhadas de nano microfibrilas de celulose bacteriana, caracterizando-se como uma espécie de proteção contra a ação de agentes contaminantes (DIMA et al., 2017; AUGIMERI, VARLEY, STRAP, 2015; ALMAGRO, 2019; VILLARREAL -SOTO et al., 2018).

No entanto, é imprescindível o armazenamento adequado do chá em ambientes isentos de luz, bem como a redução do pH do chá, para promover o crescimento do consórcio microbiano, diminuindo as chances de crescimento de levedura, durante o processo fermentativo. Sob essas condições, o consórcio simbiótico do Kombucha converte o açúcar e o chá em uma bebida azeda e

gaseificada (JAYABALAN, 2014; ALMAGRO, 2019; VILLARREAL -SOTO et al., 2018).

Ressalta-se que no período de crescimento microbiano, há formação de um novo biofilme sobre o biofilme inicial (ou biofilme-mãe), o qual por sua vez, irá afundar (JAYABALAN, 2014; ALMAGRO, 2019).

O consórcio simbiótico entre bactérias e leveduras participam da fermentação do Kombucha de forma complementar. Logo, o papel desempenhado pela sacarose neste processo é de fornecer polissacarídeos, porém, as bactérias acetogênicas não a processam, enquanto as leveduras são capazes de realizar hidrólise, ou seja, convertem a sacarose em monossacarídeos. Desse modo, esses carboidratos passam a ser assimiláveis pelas bactérias (VILLARREAL-SOTO et al., 2018).

Diante da quebra da sacarose e formação de etanol, as bactérias acetogênicas sintetizam alguns ácidos e principalmente a celulose, por meio do processo de polimerização da *Gluconacetobacter xylinus* (VILLARREAL-SOTO et al., 2018).

Mediante o processo de fermentação, os principais ácidos produzidos são ácido acético, tartárico, málico, glucônico e o ácido cítrico (em menor porcentagem). Tais ácidos conferem o sabor azedo à bebida (VILLARREAL -SOTO et al., 2018).

Os ácidos acético, glucônio e etanol, constituem tanto a fase líquida como o biofilme formado no consórcio simbiótico, o qual apresenta grande capacidade de absorção de água (CZAJA, KRYSZYNOWICZ, BIELECKI, & BROWN, 2006 apud VILLARREAL -SOTO et al., 2018).

O tempo de fermentação, a temperatura, a concentração de sacarose, a qualidade do chá e o SCOBY simbiótico são determinantes em relação as propriedades químicas e antioxidantes presentes na bebida. Destaca-se que a qualidade e a composição do chá podem variar de acordo com a espécie, época do ano, idade das folhas e condições climáticas de horticultura (GAGGIA et al., 2018).

Por fim, a obtenção do Kombucha é resultante do processo fermentativo da bebida pelo consórcio microbiótico de leveduras e bactérias presentes no biofilme quando adicionado ao meio de cultura (ALMAGRO, 2019).

Atualmente, pesquisadores e profissionais da área da saúde alertam para os principais benefícios que a bebida de Kombucha propicia, dentre eles ameniza dores, trata úlceras gástricas, desintoxica o organismo. Além de suas propriedades hipoglicêmicas e antilipidêmicas, e até mesmo anti-cancerígenas (DIMA et al., 2017; VILLARREAL -SOTO et al., 2018; NGUYEN et al, 2018; JABALAYAN et al, 2010).

Gaggia et al (2018) ressaltam a importância dos compostos químicos presentes no Kombucha, os quais lhe conferem alto valor nutricional, principalmente pela quantidade significativa de antioxidante. Da mesma forma a presença de fenóis e polifenóis, ácido glucurônico, ácido D-sacárico-1,4-lactona e complexo de vitamina B, obtidos durante o processo final de fermentação, numa temperatura entre 20 -30°C, e pH baixos que previnem a contaminação bacteriana. No entanto, seu considerável conteúdo de probióticos é crucial para saúde humana (DIMA et al., 2017).

O trabalho desenvolvido por Dima et al (2017), que visava a obtenção de nanocelulose bacteriana a partir da Kombucha, destaca a importância da purificação das membranas de KC, de modo a eliminar as células bacterianas, de leveduras, metabólitos, além das proteínas, peptídeos e oligossacarídeos, para melhorar, investigar e determinar métodos de obtenção de nano e microfibrilas de celulose.

### **3.4 Nanocelulose**

As CB por oferecerem excelentes propriedades mecânicas e devido ao seu potencial de aplicação nanotecnológica, requerem tratamentos específicos, tais como a utilização de processos de hidrólise ácida (HA), os quais permitem isolar os cristais de celulose presentes nas cadeias fibrosas. Há diferentes métodos de isolamento segundo a literatura, tais como ação mecânica intensa, hidrólise enzimática, microfluidização, moagem coloidal, atomização, embora a HA, seja amplamente adotada (WOEHL, et al., 2010; DIMA et al., 2017).

Diante de condições controladas, a hidrólise é responsável pela destruição da região amorfa da celulose (susceptíveis a HA), de modo que os domínios monocristalinos permaneçam intactos, mediante a rápida cinética da hidrólise desta região comparada à hidrólise dos cristalitos, em virtude da alta permeabilidade da região amorfa (CÉSAR et al., 2015).

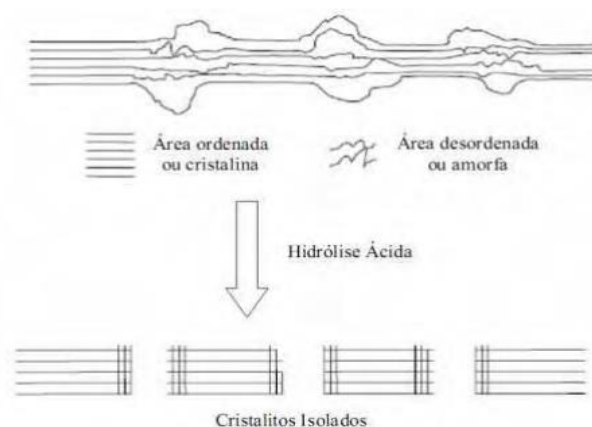
Quando as regiões fibrosas da celulose são atacadas quimicamente, via HA, elas são fragmentadas em pequenas partículas cristalinas, particularmente denominada por nanocristais de celulose, whiskers, nanowhiskers, nanofibrilas, que variam de acordo com as dimensões adquiridas (SILVA et al., 2009).

Em paralelo, materiais celulósicos que apresentam uma de suas dimensões em escala nanométrica, segundo normas da TAPPI (Associação Técnica da Indústria de Celulose e Papel), são denominados nanomateriais celulósicos ou de nanoceluloses (NC). As nanoceluloses podem ser classificadas como: microcristais de celulose (CMC), microfibras de celulose (CMF), nanocristais de celulose (CNC) e nanofibrilas de celulose (CNF).

As NC são denominadas de acordo com seus valores de diâmetro e razão de aspecto (L/D). Dessa forma os CNC compreendem estruturas cristalinas com dimensão de 3-10 nm de diâmetro e RA geralmente menor que 50; já as CNF apresentam entre 5-30 nm de diâmetro e RA maior que 50 (TAPPI).

Independentemente se o isolamento dos cristais seja obtido por processos químicos ou enzimáticos, esses processos buscam destruir especialmente as regiões amorfas, conferindo alta cristalinidade às nanoceluloses como observado na figura 5 (SAMIR, ALLOIN, DUSFRENE, 2005; WOEHL et al., 2009; SILVA et al., 2009).

**Figura 5** - Formação de CNC mediante hidrólise ácida em regiões amorfas.



Fonte: Santos, 2012.

A HA é responsável por converter a celulose em cadeias menores (oligossacarídeos, dissacarídeo – celobiose ou monossacarídeo – glucose), e sua reação química só ocorre mediante ação de ácidos de caráter forte, preferencialmente

o ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ) ou o ácido clorídrico (HCl), ambos empregados num expressivo volume de trabalhos (WOEHL, et al., 2010; SILVA et al., 2009; PIRICH, 2017).

A primeira obtenção de nanopartículas de celulose, especificamente nanocristais de celulose (CNC) aconteceu em 1951 por Ranby, utilizando ácido sulfúrico na reação de hidrólise. Em 1962, Battista e Smith obtiveram suspensão de celulose microcristalina, por utilizarem ácido clorídrico ao invés do ácido sulfúrico, procedido assim por desintegração mecânica (SILVA et al., 2009; EICHHORN et al., 2008).

Tal descoberta possibilitou a comercialização da celulose monocristalina, atualmente empregada em indústrias farmacêuticas e alimentícias, além de ser um material estável, fisiologicamente inerte e com grande potencial de aplicabilidade em diversos fins (SILVA et al., 2009; EICHHORN et al., 2008).

Em paralelo, Lima et al (2015), realizaram o estudo da influência da HA para extração de nanocristais de celulose bacteriana (NCCB) a partir da CB de *Gluconacetobacter xylinus*, além da preparação das suspensões e filmes. A obtenção das NCCB ocorreu mediante o emprego de ácido sulfúrico com concentração de 64% à 50°C sob agitação constante, em diferentes tempos de hidrólise ácida. Os NCCB obtidos apresentaram morfologia semelhante a agulhas, com elevada razão de aspecto, assim como suas dimensões, estabilidade térmica, cristalinidade e revelaram-se com melhor tempo o de 10 minutos de hidrólise (LIMA et al., 2015).

O tempo excessivo da hidrólise também pode provocar diminuição no tamanho dos CNC e um aumento nas cargas superficiais, como consequência do aumento da extensão do processo de sulfonação na superfície destes. Diversos grupos de pesquisa nos últimos anos têm estudado novas técnicas para a elaboração de CNC oriundos de diferentes fontes renováveis (CÉSAR, 2013; SILVA et al., 2009).

Os CNC definidos como monocristais são partículas que possuem morfologia com formato cilíndrico, dimensões em escala nanométricas (iguais ou menores que 100nm), altos valores de razão de aspecto e, pode apresentar diferentes morfologias e graus de cristalinidade, de acordo com o tipo de fonte celulósica e das condições

experimentais (tempo, temperatura, concentração do ácido e tratamento com ultrassom) (CÉSAR et al., 2015; SILVA et al., 2009).

Os CNC são insolúveis em solventes comuns, mas formam suspensões coloidais em água, cuja estabilidade destas suspensões depende da carga superficial e das dimensões das partículas dispersas, pois quanto menor o tamanho da partícula, maior é o índice de cristalinidade alcançado (CÉSAR, et al., 2015; SIVA et al., 2009; SAMIR, ALLOIN, DUSFRENE, 2005).

Assim, pode-se destacar que indústrias automobilísticas na Alemanha adotaram pela substituição do plástico comum por compósitos reforçados por fibras naturais, na produção de painéis e forros das portas. Os plásticos reforçados por CNC têm apresentado vantagens mecânicas quando comparados a plásticos automotivos comuns, pois são 30% mais leves e até quatro vezes mais fortes do que os materiais utilizados atualmente e menos suscetíveis a ação de calor, produtos químicos, entre outros (SIQUEIRA, BRAS, DUSFRENE, 2013; KABOORANI et al., 2012).

O estudo de Leung et al (2013), evidencia outra aplicação da NC, por exemplo, ao empregar CNC ou CNF na fabricação de aerogéis (nova classe de materiais nanoporosos e de baixa densidade) e plásticos para obtenção de nanocompósitos leves e biodegradáveis. Os aerogéis podem apresentar várias aplicações comerciais, como agentes espessantes em tintas e cosméticos, isolante térmicos para janelas, catalisador para processos químicos e afins.

### **3.5 Aplicações de Nanocelulose Bacteriana**

Mediante a necessidade global pela busca de novos recursos sustentáveis, como apresentado anteriormente, torna-se fundamental estudar novas alternativas de produção de materiais de bens de consumo e tecnológicos, dentre outros. E é nesse contexto que materiais designados como bionanocompósitos têm se tornado promissores.

Uma das principais justificativas e crescente interesse nesse segmento, é por constituírem pelo menos uma de suas fases em nanopartículas ou nanofibrilas, os quais oferecem aos novos materiais, no caso, nanocompósitos, características exclusivas em relação aos materiais comuns (estes com dimensões micrométricas ou maiores) (WOEHL et al., 2009).



Tais características estão atreladas a origem desses biomateriais, provenientes de fontes renováveis, especialmente de celulose vegetal como de celulose bacteriana, que oferecem excelentes propriedades físicas e mecânicas, assim como resistência, biodegradabilidade, atoxicidade, baixo custo, e demais fatores (WOEHL, et al., 2010; SILVA et al., 2009; JOZALA et al., 2016).

Especial atenção às nanocelulose deu-se especificamente pela sua aplicação como agente de reforços estruturais em diferentes matrizes poliméricas, para produção de novos nanocompósitos, devido aos benefícios e meios de obtenção que os mesmos oferecem (WOEHL, et al., 2010; CÉSAR et al., 2015; SILVA et al., 2009; LAHIJI et al., 2010; LIMA et al., 2015; SANTOS, 2012).

O trabalho de Woehl (2009) buscou estudar a produção de nanofibras de celulose bacteriana a partir da bactéria do gênero *A. xylinum*, a fim de empregá-la como reforço em matriz polimérica de amido plastificado com o intuito de investigar melhor suas propriedades mecânicas, para posterior obtenção de bionanocompósitos.

Em paralelo, outra aplicação significativa das nanocelulose, em particular dos CNC, refere-se a sua atuação em setores biomédicos, como biossensores. Tal fato está vinculado pelas suas características, como boa absorção em diferentes superfícies, boa estabilidade coloidal, possibilidade de funcionalização e imobilização em outras moléculas (enzimas, anticorpos), alta razão de aspecto, extração sustentável, entre outros (PIRICH, 2017).

Alguns exemplos relevantes são os trabalhos reportados por Orelma et al (2012), onde os CNC atuaram como biossensores, na imobilização de macromoléculas, tais como antígenos; Barker et al (1971) como enzimas, e de Mahmoud et al (2013) atuando como partículas magnéticas.

A pesquisa desenvolvida por Pirich (2017), avaliou o potencial de empregabilidade dos nanocristais de celulose bacteriana, em biossensores para detecção mais eficaz da infecção do vírus da dengue, nomeado como DENV. Onde seu objetivo foi funcionalizar e caracterizar via AFM, sensores microbalanças de cristal de quartzo, com nanofilmes de CNC imobilizados de imunoglobinas monoclonais específicas, de modo a reconhecer o antígeno NS1 do vírus da dengue.

Dima et al (2017) enfatiza a preparação de nanofibras de celulose bacteriana a partir de Kombucha, mediante processos de purificação, separação e tratamentos mecânicos. Em seu estudo explorou três métodos de extração para isolamentos das nanofibras: atomização, microfluidização e moagem coloidal. Seus resultados evidenciaram a importância do processo de purificação das membranas bacterianas, que chegou a 85%, configurando uma maior cristalinidade às nanofibras (de 37% a 87%). Além disso determinou, via microscopia de transmissão (MET) o comportamento morfológico das CNF.

O trabalho de Kondageski (2016), contribuiu para o desenvolvimento de um compósito polimérico de nanocelulose bacteriana aderido a uma blenda de poli (L-ácido láctico-co-trimetileno carbonato) PLLA/TMC, utilizando o *Komagataeibacter hansenii* (*Gluconacetobacter hansenii*), como meio para extração das NCCB. A produção desse nanocompósito destinou-se a avaliar sua possível empregabilidade para tratamento cirúrgico intrauterino das mielomeningoceles. Diante das características e compatibilidade celular obtidas, o nanomaterial confirmou potencial para regeneração tecidual da pele, em particular à correção de disrafismos espinhais no período intrauterino.

Outros trabalhos científicos também relataram o uso da nanocelulose bacteriana em suas pesquisas, em diferentes segmentos, desde indústrias alimentícias, farmacêuticas, cosmético, embalagens entre outros. Assim, destaca-se como substituto dural (MELLO et al., 1997; PEDREIRA et al., 2011; SANCHEZ E OLIVEIRA et al., 2007); aplicações clínicas (BEVILACQUA; PEDREIRA, 2015); como curativos, *scaffolds* (matriz de crescimento celular), regeneração de tecidos; na área alimentícia podem atuar como estabilizadores, ingrediente alimentar funcional (DIMA et al, 2017); como agente de reforços em matrizes de poli(L-ácido láctico) (PLLA) (COSTA et al., 2017); produção de nata de coco, sorvetes, espessantes (BROWN Jr., 1998a) e afins.

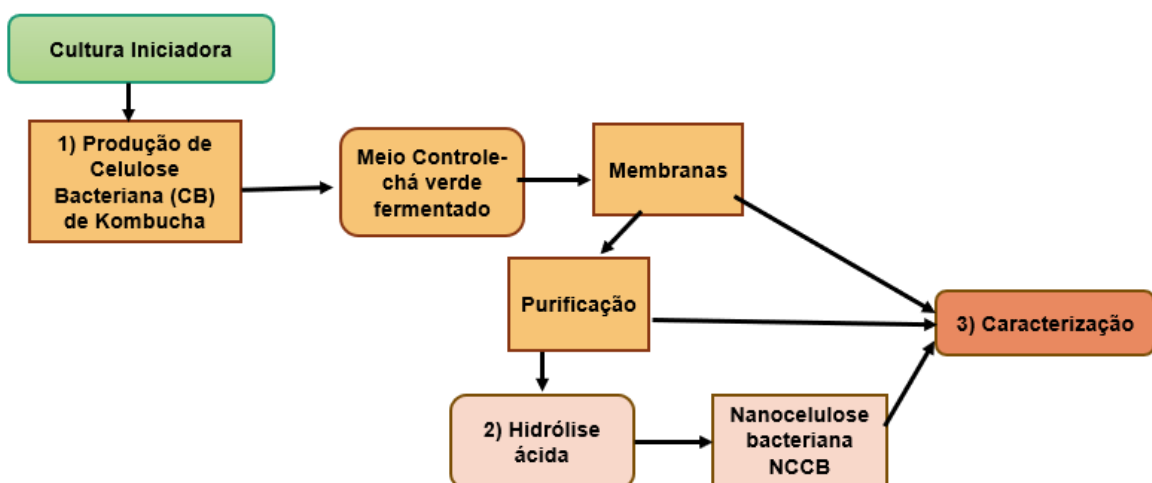
## 4. METODOLOGIA

A execução desse trabalho foi dividida em três etapas experimentais: 1) Produção da celulose bacteriana de Kombucha e purificação da mesma, realizada no Laboratório de Microbiologia Ambiental (LAMA) da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), campus Sorocaba; 2) Preparo das suspensões de nanofibrilas de celulose bacteriana de Kombucha, produzidas no Laboratório de Química Orgânica da UFSCar, campus Sorocaba e 3) Caracterização das membranas e suspensões de celulose bacteriana realizadas em diferentes laboratórios parceiros: Laboratório Multidisciplinar de Nanoneurobiofísica (LMN) da UFSCar, campus Sorocaba; Laboratório de Caracterização de Amostras Sólidas da UFSCar, campus Sorocaba; Laboratório de Caracterização de Materiais Nanoestruturados da UFSCar, campus Sorocaba; Laboratório Nacional de Nanotecnologia (LNNano) e Instituto de Física de São Carlos – IFSC/USP, campus São Carlos. As etapas serão explicadas adiante.

### 4.1 Fluxograma experimental

A parte experimental deste trabalho foi desenvolvida conforme o fluxograma apresentado na figura 6:

**Figura 6-** Fluxograma experimental.



### 4.2 Preparo e inoculação dos meios de cultura

O meio de cultivo utilizado para produção de celulose bacteriana foi chá verde fermentado, denominado comercialmente por Kombucha e obtido mediante metodologia de Jayabalan et al. (2014).

#### 4.2.1 Meio de controle – Chá verde fermentado (Kombucha)

Para síntese das membranas de celulose de Kombucha (MCBK) do meio chá verde utilizou-se:

- 1000 mL de água destilada;
- 5 g de folhas de chá verde (Granel);
- 50 g de sacarose;
- 200 mL de pré-inóculo (caldo de chá fermentado)<sup>1</sup>;
- 24 g de membrana do pré-inóculo.

A produção das membranas de Kombucha de chá verde está representada no esquema da Figura 7:

**Figura 7-** Fluxograma das etapas de síntese das MCBK.



Fonte: Almagro (2019).

Inicialmente solubilizou-se 50g de sacarose à 80°C em 1000mL de água destilada em um béquer, onde adicionou-se 5,0 g de chá verde, que permaneceu em infusão entre 10 a 15 minutos. Em seguida, o chá foi filtrado e autoclavado a 121°C, 1 atm por 20 minutos e resfriado a temperatura ambiente. Para a inoculação, utilizou-se 200 mL do chá previamente fermentado e inoculado para acidificar o meio e 24 g

<sup>1</sup> Caldo de chá fermentado – obtido por uma cultura de Kombucha mantida em condições ideais.

de membrana que atuaram como pré-inóculo. Finalmente, o frasco foi tampado com tecido e mantido em estufa bacteriológica à 35°C por 21 dias para fermentação e consequente formação das membranas.

#### **4.2.2 Purificação das membranas de celulose bacteriana em água destilada**

Para purificação, as membranas de celulose de Kombucha (MCBK) produzidas, após período de fermentação foram mantidas em água destilada, por 1 hora em banho-maria a 80°C. Em seguida, as membranas foram lavadas em água destilada corrente de 3-4 vezes e mantidas em estufa a 60°C durante *overnight*, conforme metodologia adaptada de Rangaswamy (2015).

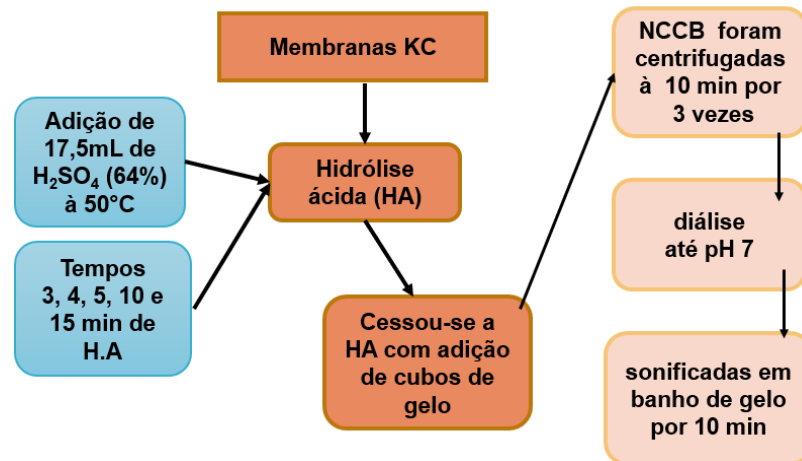
#### **4.2.3 Purificação das membranas de celulose bacteriana em NaOH**

Para purificação das membranas de celulose bacteriana de Kombucha, estas foram submetidas à solução de 0,1 e 1 molar de hidróxido de sódio (NaOH), sendo denominadas por MCBK<sub>OH</sub>, em banho-maria a 80°C durante 15 minutos respectivamente; posteriormente as membranas foram lavadas em água destilada corrente e submetidas por 1 hora em banho-maria a 80°C, num volume de 400 mL de água destilada, dessa forma o meio retornou à neutralidade líquida (pH= 7,0). Logo, repetiu-se quatro vezes esta etapa, até que as membranas fossem purificadas. Por fim, as membranas foram levadas à estufa de secagem em placa de Petri acrílicas e deixadas para secar a 60°C *overnight*, mediante metodologia modificada de Rangaswamy (2015).

#### **4.3 Suspensões de nanofibrilas de celulose bacteriana de Kombucha (NFCBK)**

A síntese de nanocelulose NFCBK para as próximas etapas foram preparadas de acordo com o esquema da figura 8:

**Figura 8-** Etapas de produção dos NFCBK.



A obtenção das suspensões de nanofibrilas de celulose bacteriana de Kombucha (NFCBK) deu-se por reação de hidrólise ácida (HA), usando ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) 64% a  $50^\circ\text{C}$ . Inicialmente as membranas de celulose bacteriana de Kombucha (MCBK) (purificadas com água) secas foram submetidas às condições de hidrólise, em intervalos de tempos: 5,10 e 15 min, sob agitação constante. As amostras identificadas constam na tabela 2, assim como as demais amostras purificadas com NaOH obtidas para este trabalho.

**Tabela 2 - Tempo de hidrólise e identificação das amostras**

Amostra purificada com H <sub>2</sub> O	
5 min	NFCBK 5
10 min	NFCBK 10
15 min	NFCBK 15
Amostra purificada a 0,1M NaOH	
3 min	NFCBK <sub>OH</sub> 3
4 min	NFCBK <sub>OH</sub> 4
5 min	NFCBK <sub>OH</sub> 5
Amostra em estado gelatinoso purificada a 0,1 M de NaOH	
3 min	NFCBK <sub>g</sub> 3
4 min	NFCBK <sub>g</sub> 4
5 min	NFCBK <sub>g</sub> 5
10 min	NFCBK <sub>g</sub> 10
Amostra em estado gelatinoso purificada a 1 M de NaOH	
3 min	NFCBK <sub>gM</sub> 3
4 min	NFCBK <sub>gM</sub> 4
5 min	NFCBK <sub>gM</sub> 5
10 min	NFCBK <sub>gM</sub> 10
Amostra das suspensões do sobrenadante 0,1M	
3 min	NFCBK <sub>s</sub> 3
4 min	NFCBK <sub>s</sub> 4
5 min	NFCBK <sub>s</sub> 5
10 min	NFCBK <sub>s</sub> 10
Amostra das suspensões do sobrenadante 1M	
3 min	NFCBK <sub>sM</sub> 3
4 min	NFCBK <sub>sM</sub> 4
5 min	NFCBK <sub>sM</sub> 5
10 min	NFCBK <sub>sM</sub> 10

A reação de hidrólise cessou-se pela adição de gelo no béquer contendo a suspensão de NFCBK. Em seguida, as suspensões foram centrifugadas à 3000 rpm durante 10 minutos, por três vezes. O precipitado obtido foi colocado em membranas para diálise em água destilada até atingir pH 7.

Assim, após a diálise as suspensões foram sonificadas em banho de gelo, durante 10 minutos em um ultrassom da UNIQUE, modelo: USC-1650 25khZ, e a determinação da concentração de cada amostra foi calculada após completa evaporação da água mantida em estufa a 80°C, conforme metodologia adaptada de Lima et al (2015).

#### **4.3.1 Suspensões de nanofibrilas de celulose bacteriana de Kombucha (NFCBK<sub>OH</sub>) purificadas com NaOH**

A obtenção das suspensões de nanofibrilas de celulose bacteriana de Kombucha purificadas (NFCBK<sub>OH</sub>), pela lavagem das MCBK secas com 0,1M de NaOH (processo de purificação) identificadas como MCBK<sub>OH</sub>, também foram obtidas via hidrólise ácida, (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 64% a 50°C em diferentes tempos: 3, 4 e 5 minutos, sob agitação constante. As amostras foram preparadas pela adição de 17,5mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> por grama de MCBK purificada. As amostras identificadas constam na tabela 2.

Cessou-se a HA, novamente pela adição de gelo no béquer contendo a suspensão hidrolisada. Logo, as suspensões foram centrifugadas à 3000 rpm durante 10 minutos, por três vezes. O precipitado produzido foi introduzido em membranas para diálise contra água destilada até pH 7.

Após a diálise, as suspensões foram sonificadas em banho de gelo, durante 10 min em um ultrassom, e a concentração de cada amostra, foi determinada após completar evaporação da água mantida em estufa a 80°C, mediante metodologia adaptada de Lima et al. (2015).

#### **4.3.2 Suspensões de nanofibrilas de celulose bacteriana de Kombucha em estado gelatinoso (NFCBK<sub>g</sub> e NFCBK<sub>gM</sub>) purificada com NaOH**

A obtenção das suspensões de nanofibrilas de celulose bacteriana gelatinosa mantidas em estado gelatinoso (NFCBK<sub>g</sub>), sem etapa de secagem das MCBK, deu-se pela reação de hidrólise ácida com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> com 64% a 50°C. Nesta etapa as MCBK gelatinosa purificada a 0,1M e 1M foram submetidas primeiramente a filtração a vácuo,



para total remoção do excesso de água e foi sucessivamente hidrolisadas em diferentes tempos: 3, 4, 5 e 10 minutos, sob agitação constante, respectivamente. Nesta etapa, as amostras foram preparadas sob as mesmas condições de hidrólise já descritas e estão identificadas na tabela 2.

#### **4.3.3 Suspensões de sobrenadante de nanofibrilas de celulose bacteriana de Kombucha gelatinosa (NFCBKs e NFCBKs<sub>M</sub>)**

Para uma análise mais completa, o sobrenadante formado durante as etapas de centrifugação das NFCBK gelatinosas tratadas com 0,1 M e 1M de NaOH, foram considerados relevantes para investigação, em virtude de poder conter material celulósico disperso. Sendo assim, os sobrenadantes das NFCBKg/NFCBKg<sub>M</sub> de 3, 4, 5 e 10 minutos, foram centrifugadas por 3 vezes e mantidos até neutralização do pH em membranas para diálise. Após neutralização, as suspensões foram sonificadas em banho de gelo, em ultrassom por 10 minutos, seguida da medida de concentração da amostra. As amostras identificadas constam na tabela 2.

#### **4.3.4 Preparo para caracterização das MCBK e NFCBK via AFM**

As MCBK purificadas com água e NaOH foram analisadas em microscópio de força atômica (modelo Solver Nano da NT-DMT), do Laboratório Multidisciplinar de Nanoneurobiofísica (LMN) da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), campus Sorocaba, através do software (Nova Px 3.2.5). Tais MCBK foram caracterizadas em modo contato, com temperatura ambiente de 23°C, onde procurou-se manter um padrão de varreduras, nas seguintes escalas: (80-80; 50-50; 30-30; 20-20; 10-10; 5-5; 3-3; 2-2; e 1-1) µm respectivamente. Entretanto, a caracterização na escala de 10 µm melhor evidenciou a morfologia das membranas com aspecto de nanofibrilas.

Já a caracterização morfológica da nanocelulose bacteriana de Kombucha com e sem purificação de NaOH foi realizada num microscópio de força atômica modelo Dimension ICON da Bruker do Instituto de Física de São Carlos – IFSC/USP, campus São Carlos. As imagens morfológicas das suspensões ácidas (NFCBK, NFCBK<sub>OH</sub>, NFCBKg, NFCBKg<sub>M</sub>, NFCBKs e NFCBKs<sub>M</sub>) foram obtidas pelo modo intermitente, em temperatura ambiente, através do Software Nanoscope Analysis 8.10.

Para facilitar a investigação da morfologia e determinação das dimensões das nanofibrilas, as suspensões analisadas foram diluídas em água destilada. Os valores

de concentração de cada condição de hidrólise, bem como as diferentes diluições aplicadas estão indicadas na tabela 3:

**Tabela 3-** Valores das concentrações e diluições obtidas

Amostra	Tempo hidrólise (minutos)	Concentração [g/L]	Diluição (razão)		
NFCBK	5	14,2	1:5	1:25	1:50
NFCBK	10	4,6	1:5	1:25	1:50
NFCBK	15	15,6	1:5	1:25	1:50
NFCBK <sub>OH</sub>	3	0,40	1:5		1:50
NFCBK <sub>OH</sub>	4	0,80	1:5	1:50	1:100
NFCBK <sub>OH</sub>	5	0,60	1:5	1:50	1:100
NFCBK <sub>g</sub>	3	0,20	1:5		
NFCBK <sub>g</sub>	4	0,20	1:5		
NFCBK <sub>g</sub>	5	0,20	1:5		
NFCBK <sub>g</sub>	10	0,10	1:5		
NFCBK <sub>s</sub>	3	0,40	1:5		
NFCBK <sub>s</sub>	4	0,80	1:5		
NFCBK <sub>s</sub>	5	0,20	1:5		
NFCBK <sub>s</sub>	10	0,40	1:5		
NFCBK <sub>g<sub>M</sub></sub>	3	3,0	1:5		
NFCBK <sub>g<sub>M</sub></sub>	4	3,20	1:5		
NFCBK <sub>g<sub>M</sub></sub>	5	0,60	1:5		
NFCBK <sub>g<sub>M</sub></sub>	10	4,60	1:5		
NFCBK <sub>s<sub>M</sub></sub>	3	7,60	1:5		
NFCBK <sub>s<sub>M</sub></sub>	4	2,0	1:5		
NFCBK <sub>s<sub>M</sub></sub>	5	1,0	1:5		
NFCBK <sub>s<sub>M</sub></sub>	10	2,20	1:5		

Para análise de cada uma das NFCBK foi adsorvida cerca de 5-20  $\mu$ L da amostra de nanocelulose de interesse sobre uma amostra de mica muscovita recém-clivada (amostra atômica plana), e seca em condições de temperatura ambiente.

O tratamento das imagens obtidas na caracterização por AFM foi realizado com auxílio do Software NanoScope Analysis 8.10., que também permitiu realizar a medida das dimensões (diâmetro) das nanofibrilas.

#### **4.4 Caracterização**

##### **4.4.1 Espectroscopia de Absorção no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)**

Para estudo e identificação dos principais grupos funcionais presentes nas MCBK, sem e purificadas em NaOH, a técnica de espectroscopia de absorção no infravermelho com transformada de Fourier – FTIR foi determinante. Assim, as análises foram realizadas em um espectrofotômetro FTIR *Nicolet*, modelo IR 200 no laboratório de Caracterização de Materiais Nanoestruturados da UFSCar, campus Sorocaba.

As análises das membranas foram realizadas pelo modo absorbância, cujo intervalo de medida foi definido entre 4000 e 600  $cm^{-1}$ , com resolução de 4  $cm^{-1}$ , dessa forma proporcionando a observação das bandas e identificação dos principais grupos funcionais, comparados aos valores teóricos de número de ondas, correspondentes a cada grupo funcional, expressos na literatura.

##### **4.4.2 Difração de Raio X (DRX)**

As análises de difração de raio X, deste trabalho foram realizadas em um difratômetro Shimadzu, modelo XRD-6100, no laboratório de Caracterização de Amostras Sólidas da UFSCar, a fim de determinar maiores informações sobre cristalinidade das MCBK, como também determinar suas possíveis estruturas.

A análise foi realizada no modo filme, com fenda de divergência de 0,3 mm, ângulo de incidência theta = 1,5°, e ângulo 2theta variando entre 10,0 e 80,0°, com velocidade 2°/min e passo de 0,02°.

##### **4.4.3 Microscopia de Varredura (MEV)**

As MCBK originais e as MCBK<sub>OH</sub> secas foram caracterizadas, pelo microscópio eletrônico de varredura, marca Quanta modelo 650FEG do Laboratório de Microscopia Eletrônica (LME) do Laboratório Nacional de Nanotecnologia (LNNano). As amostras

foram metalizadas com ouro por aspersão utilizando baixa taxa de deposição, para determinação da imagem morfológica das membranas.

#### **4.4.4 Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS)**

Neste estudo, a concentração dos elementos químicos presentes na superfície das MCBK e MCBK<sub>OH</sub> foi determinada pelo Laboratório de Microscopia Eletrônica (LME) do Laboratório Nacional de Nanotecnologia (LNNano), com o microscópio Quanta, modelo 650FEG e no microscópio Inspect modelo F50, usando o periférico de espectroscopia de raios-X por dispersão de energia (EDS). As amostras foram cobertas com filme de ouro em equipamento Bal-Tec SCD 005 Coater, durante 60 segundos e 40mA.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

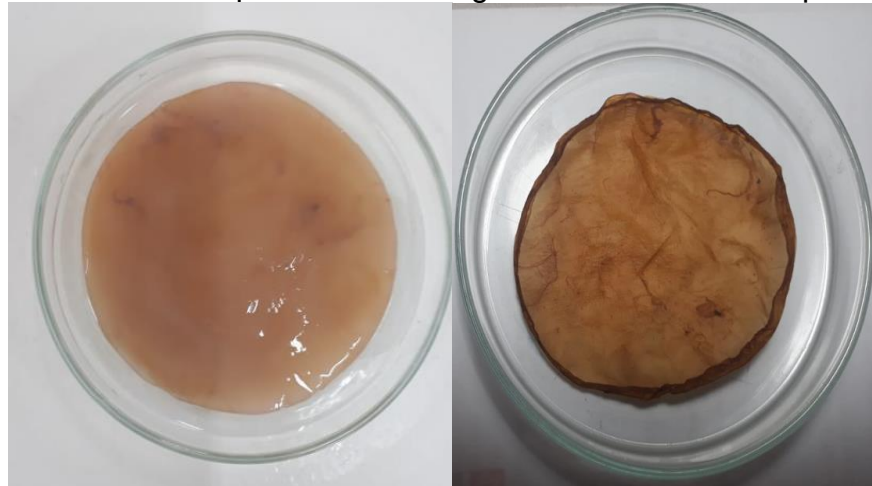
As imagens 9,10,11 e 12 a seguir representam as etapas de obtenção das membranas e nanofibrilas de Kombucha.

**Figura 9-** Membranas obtidas após processo fermentativo.



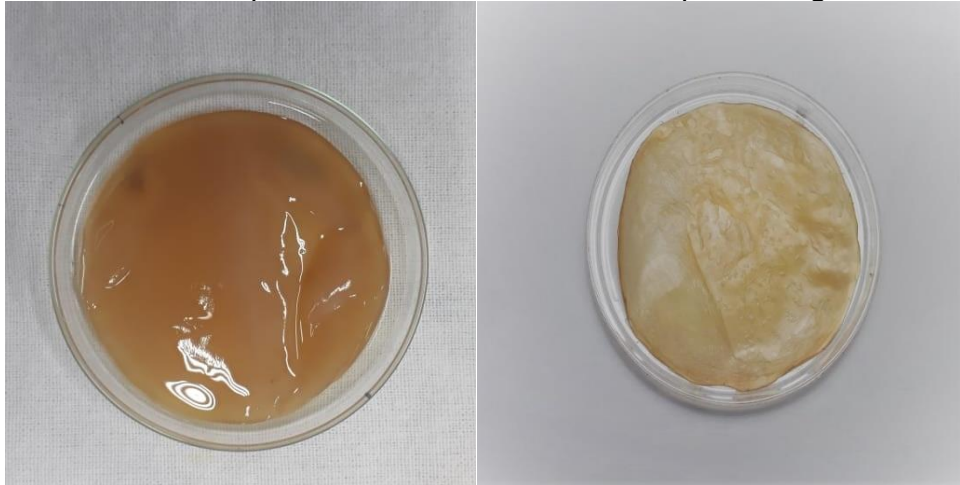
Fonte: própria

**Figura 10 -** Membranas purificadas em água destilada antes e após secagem.



Fonte: própria

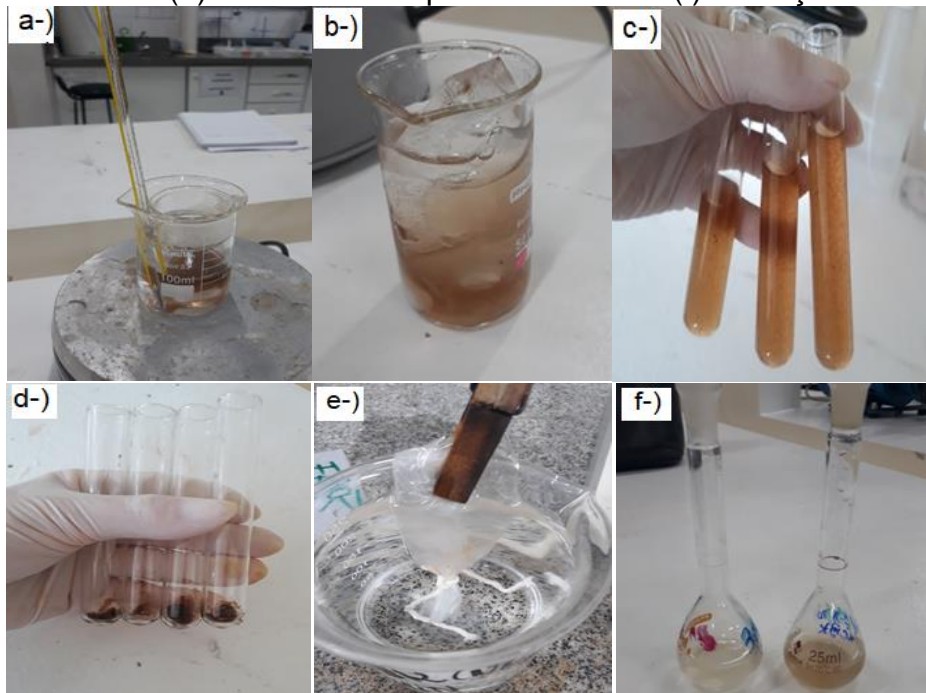
**Figura 11-** Membrana purificada em NaOH antes e após secagem em estufa.



Fonte: própria

Na figura 12 (a) e (b) ilustra a reação de HA antes e após cessá-la, (c) e (d) ilustra a obtenção das suspensões antes e após centrifugação, (e) e (f) representa a etapa de diálise e a NFCBK obtida.

**Figura 12 -** Parte experimental para obtenção das NFCBK, em (a) reação de HA (b) adição de gelo para cessar HA (c) suspensões antes etapa de centrifugação (d) precipitado obtido (e) diálise das suspensões NFCBK (f) obtenção das NFCBK.



Fonte: própria

## 5.1 Caracterização das Membranas

Nesta primeira parte são apresentados os principais resultados das análises realizadas nas membranas de Kombucha após purificação com água destilada (MCBK) e com hidróxido de sódio (MCBK<sub>OH</sub>). Assim, a composição química, morfologia e estrutura cristalina foram caracterizadas mediante as técnicas de: microscopia de força atômica (AFM), espectroscopia de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), microscopia eletrônica de varredura (MEV), espectroscopia de energia dispersiva (EDS) e difração de raios-X (DRX), que serão apresentadas adiante.

### 5.1.1 Composição química

As características da estrutura molecular das membranas purificadas com água destilada e NaOH foram investigadas pela espectroscopia FTIR e estão apresentadas nas Figura 13 e 14

Figura 13 - Espectro de infravermelho da MCBK purificada com  $H_2O$  destilada.

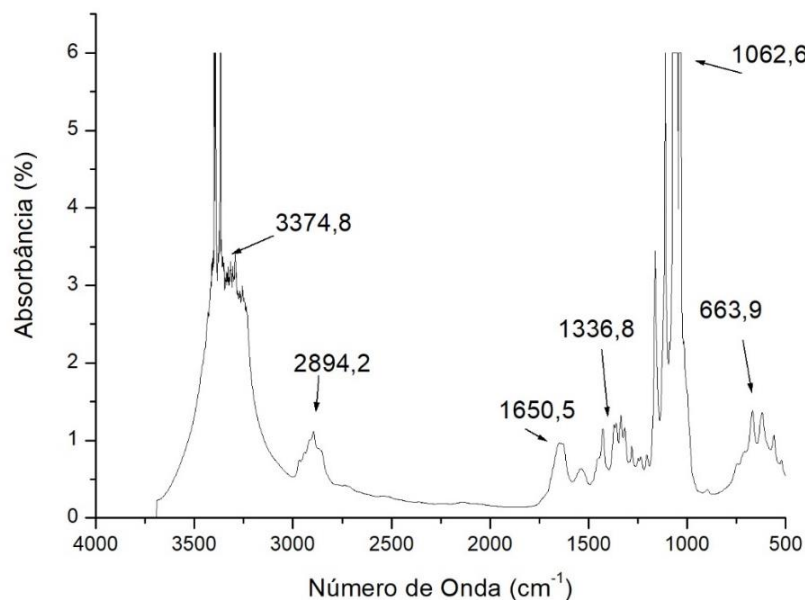
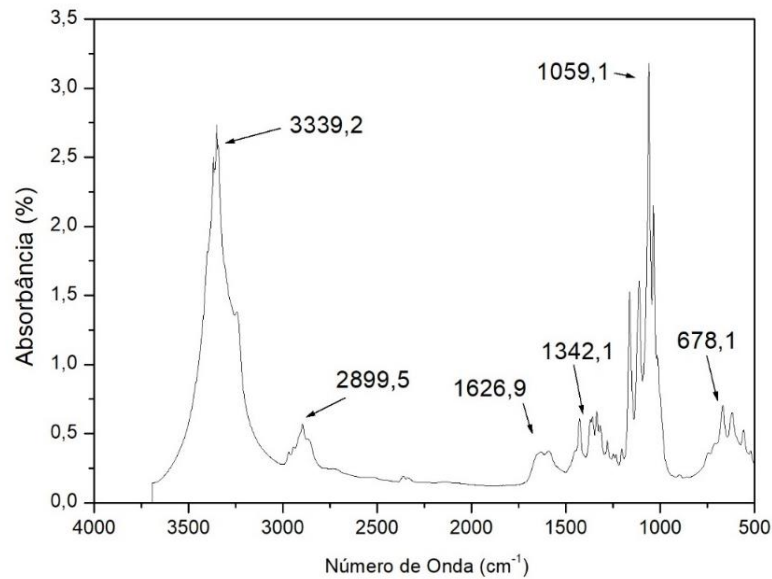


Figura 14 - Espectro de infravermelho da amostra de MCBK purificada com NaOH a 0,1M.



Nos espectros das Figuras 13 e 14 observam-se as bandas entre 3600 e 3100 $\text{cm}^{-1}$ , característica da celulose bacteriana (celulose tipo I), correspondente à vibração de alongamento da ligação de hidrogênio intramolecular (grupos OH). Uma banda de absorção menos acentuada aparece em 2895  $\text{cm}^{-1}$ , indicando a presença da vibração de estiramento C-H. A banda de absorção em 1650  $\text{cm}^{-1}$  corresponde à vibração específica do grupo C=O e em 1540 $\text{cm}^{-1}$  um pico de absorção devido a presença dos grupos NH. Segundo trabalho de DIMA et al (2017) e LI et al (2019) as bandas entre 1654  $\text{cm}^{-1}$ , 1648  $\text{cm}^{-1}$  e 1542  $\text{cm}^{-1}$  tende a indicar a presença das proteínas da membrana de Kombucha (DIMA et al.; 2017; LI et al.; 2019), porém para este trabalho a banda correspondente das proteínas foi 1062,6-1059,1.

Dima et al (2017) ressaltam a necessidade da etapa de purificação com NaOH das membranas de Kombucha, em vigor de preparar as MCBK para receber novos tratamentos químicos, principalmente para produção de nanopartículas celulósicas. Neste trabalho, a mesma etapa de purificação fez-se necessária para eliminar quaisquer células microbianas e demais compostos orgânicos presentes, devido processo metabólico após fermentação da CB. Com isso, pode-se observar que apenas após esta etapa de purificação das MCBK foi possível obter as NFCBK efetivamente. O trabalho de Lima et al (2015) obteve CB por meios fermentativos alternativos como de sisal, caju e algaroba, cuja bandas de FTIR foram similares às obtidas de KC, logo confirma-se que o alto grau de pureza pode ser obtido após processo de purificação, o qual caracteriza a CB, pois sua estrutura é livre de lignina



As figuras 15 e 16 apresentam as análises químicas das superfícies das membranas de Kombucha, MCBK e MCBK<sub>OH</sub>, respectivamente, realizada pela técnica de espectroscopia de energia dispersiva – EDS.

O EDS é uma técnica que permite a análise qualitativa e semi-quantitativa de elementos presentes na superfície de um material. É capaz de detectar quase todos os elementos com exceção dos que apresentam menor número atômico como Hidrogênio, Hélio e Berílio (GOLDSTEIN, 2003).

Figura 15 - Espectro de EDS da MCBK.

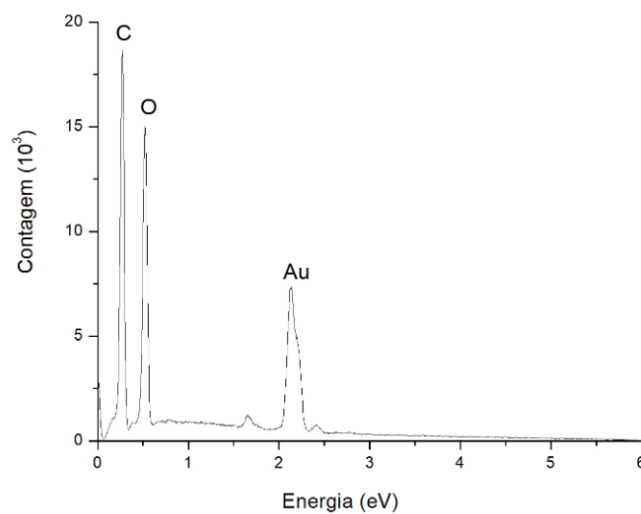
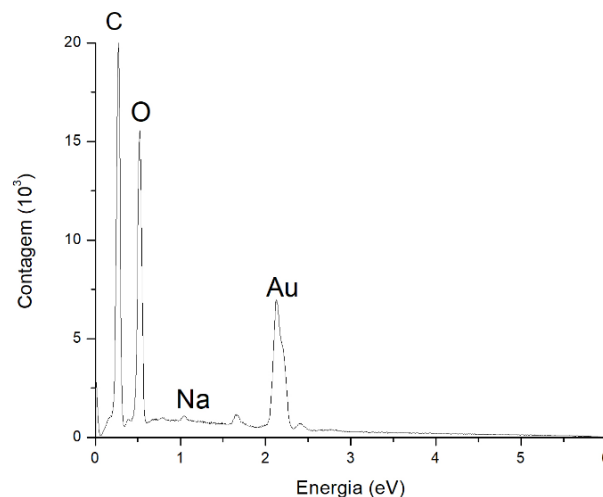


Figura 16 - Espectro de EDS da MCBK<sub>OH</sub> a 0,1M.



Os espectros ilustram os principais elementos químicos que compõem as membranas. Nesse caso nas MCBK sem tratamento (figura 15), apenas purificadas com água destilada, os elementos identificados foram carbono e oxigênio, que correspondem a superfície da celulose bacteriana. O carbono apresentou um teor de

55,2% e de oxigênio 44,8%. O pico correspondente ao ouro, corresponde ao recobrimento das MCBK com filme de ouro, etapa necessário para a realização da análise. O espectro de EDS das MCBK<sub>OH</sub>, após etapa de purificação mostrou a presença do elemento químico sódio (Na), proveniente do hidróxido de sódio utilizado. A composição de carbono nessa etapa foi de 55,2%; 43,9% de oxigênio e 0,5% de sódio, assim pode-se observar que não houve uma alteração significativa nos teores dos elementos, o qual possivelmente deve-se a baixa concentração usada de NaOH (0,1M).

Os teores de carbono e oxigênio estão de acordo com valores obtidos por outros trabalhos com celulose, podendo variar conforme as condições experimentais aplicadas (CAMARGO, 2016).

Em trabalho complementar sobre síntese MCBK foi realizado a técnica de FRX que estimou a porcentagem de outros elementos químicos presentes nas membranas, como ferro, cálcio, sódio, enxofre, magnésio, silício e cloro. Os elementos com maiores teores foram ferro e cálcio. Ressalta-se que os elementos identificados correspondem a composição do chá verde, meio o qual as CB foram sintetizadas (AMAGRO, 2019).

### 5.1.2 Cristalinidade

As figuras 17, 18 e 19 correspondem aos difratogramas obtidos pela técnica de DRX, utilizada com a finalidade de possível alteração de cristalinidade das MCBK purificadas com água e NaOH.

Figura 17- Difratograma da MCBK purificada com H<sub>2</sub>O.

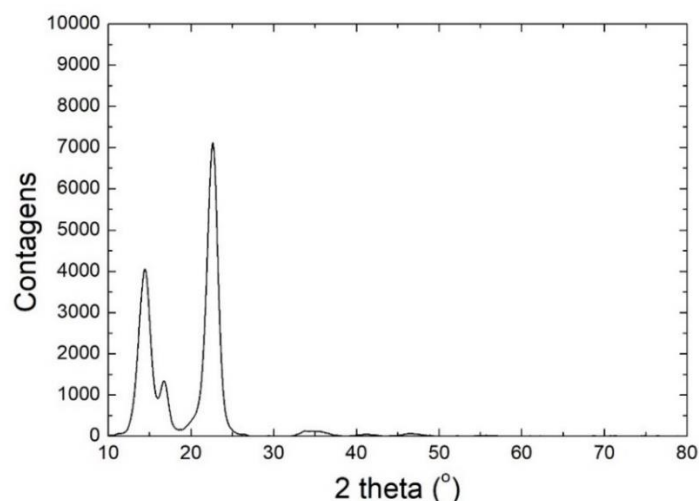


Figura 18 - Difratoograma da MCBK<sub>OH</sub> purificada com 0,1 molar NaOH

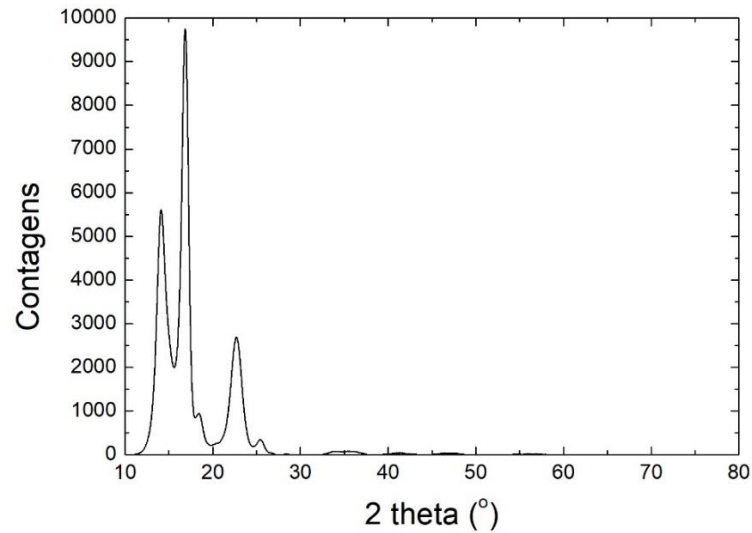
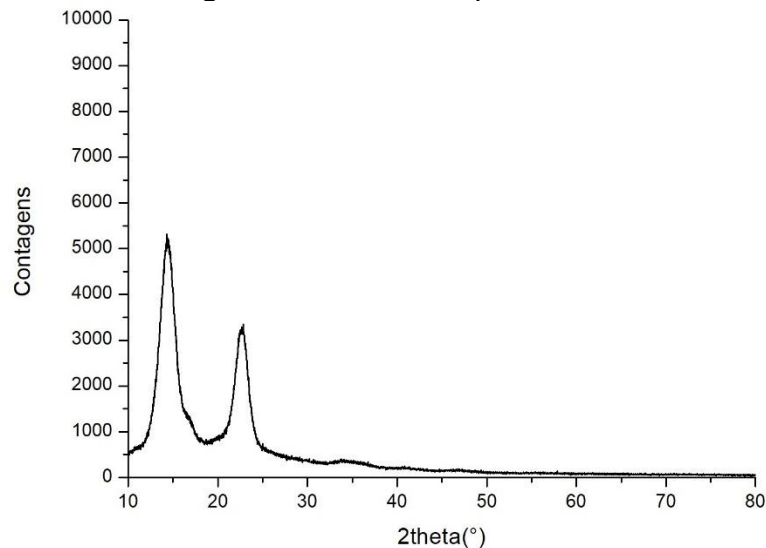


Figura 19 -Difratoograma da MCBK<sub>OH</sub> purificada com 1 molar NaOH



Conforme mencionado anteriormente, a celulose I possui dois alomorfos, celulose I $\alpha$  e I $\beta$ , de estruturas semelhantes. Na celulose bacteriana há a predominância da celulose I $\alpha$ , com células unitárias triclinicas de cadeia única. A celulose I $\beta$  é característica das plantas, cuja estrutura é complexa, devido a presença de materiais lignocelulósicos, com células unitárias monoclinicas. Entretanto, a celulose I $\alpha$  pode ser transformada em I $\beta$ , mediante tratamento térmico, pois é considerada menos estável termodinamicamente (WOEHL, 2009; Dima et al., 2017)

Os difratogramas das medidas de DRX para as MBCK purificadas com água e as purificadas com 0,1 molar de NaOH apresentaram três principais picos em  $2\theta = 14,7^\circ; 16,5^\circ$  e  $22,6^\circ$  que corresponderam as estruturas (-1 0 1), (1 0 1) e (0 0 2). Assim,

tais intensidades obtidas confirmam a estrutura cristalina típica da celulose I, de acordo com estudos anteriores, como LI et al (2019); Dima et al (2017); Aydin e Aksoy (2014); Cai e Kim (2010); Keshk e Sameshima (2006).

A celulose II pode ser obtida através da celulose I, quando submetida a tratamento alcalinos (LI et al., 2019; MOHARRAM e MAHMOUD., 2008; LENGOWSK ,et al.,2013). Assim, as MCBK<sub>OH</sub>, cujo difratograma corresponde a figura 18 e 19, apresentam as intensidades obtidas na etapa de purificação com hidróxido de sódio.

Diante dos difratogramas obtidos para as membranas de Kombucha, ressalta-se que as intensidades relativas, da MCBK purificada apenas com água para purificada com 0,1 molar de NaOH variaram, no qual possivelmente entende-se que ocorreu certa alteração na cristalinidade.

O difratograma correspondente a MCBK purificada a 1M, indicou apenas 2 picos em  $2\theta = 14,7^\circ$  e  $22,9^\circ$  cujas estruturas são  $(-1\ 0\ 1)$  e  $(0\ 0\ 2)$ . Se comparado com o difratograma da membrana também de Kombucha, apresentado pelo trabalho de Dima et al (2017), os picos apresentados na figura 24, mostraram-se incoerentes, o qual, não era esperado, como o desaparecimento do pico correspondente a  $16^\circ$ - $18^\circ$ , logo, tais resultados serão posteriormente investigados e terão suas medidas repetidas.

A diminuição dos picos de DRX e possível alargamento pode estar associados a dois fatos: aumento da região amorfa em virtude de diversos tratamentos, redução do tamanho dos cristais e seu arranjo orientado (DIMA et al., 2017).

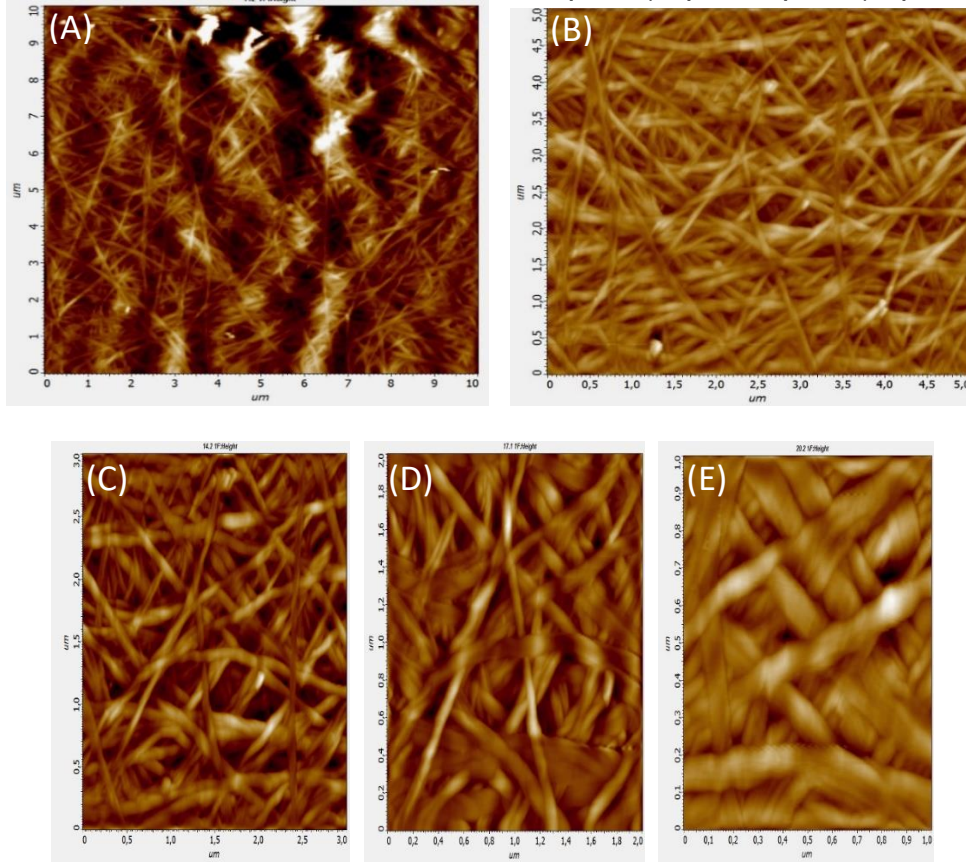
### 5.1.3 Morfologia

#### 5.1.3.1 Microscopia de força atômica

Para determinação do comportamento morfológico das membranas de celulose bacteriana do Kombucha, a técnica de AFM foi fundamental, levando em consideração a escala de interesse e o fato de não haver necessidade de metalização das amostras.

A Figura 20 ilustra as imagens da membrana de Kombucha original, purificada com água destilada em diferentes escalas.

Figura 20 - Imagens das MCKB com diferentes escalas:  
a)  $10\mu\text{m} \times 10\mu\text{m}$ ; b)  $5\mu\text{m} \times 5\mu\text{m}$ ; c)  $3\mu\text{m} \times 3\mu\text{m}$ ; d)  $2\mu\text{m} \times 2\mu\text{m}$ ; e)  $1\mu\text{m} \times 1\mu\text{m}$ .



A etapa seguinte foi caracterizar as membranas de Kombucha, purificadas com 0,1M e 1M de NaOH. Tal purificação foi realizada a fim de remover eventuais impurezas presentes no processo microbiológico, como proteínas, sacarídeos, aminoácidos. Dessa forma, as MCBK<sub>OH</sub> estariam prontas para serem submetidas a tratamentos químicos, como HA. As Figuras 21 e 22 apresentam as imagens morfológicas obtidas das MCBK<sub>OH</sub> purificadas à 0,1 M e 1 M, respectivamente, em diferentes escalas.



Figura 21- Imagens das MCBK<sub>OH</sub> a 0,1M em diferentes escalas:  
 a) 10 $\mu$ m x 10  $\mu$ m; b) 5  $\mu$ m x 5 $\mu$ m; c) 3 $\mu$ m x 3 $\mu$ m; d) 2 $\mu$ m x 2 $\mu$ m; e) 1 $\mu$ m x 1 $\mu$ m.

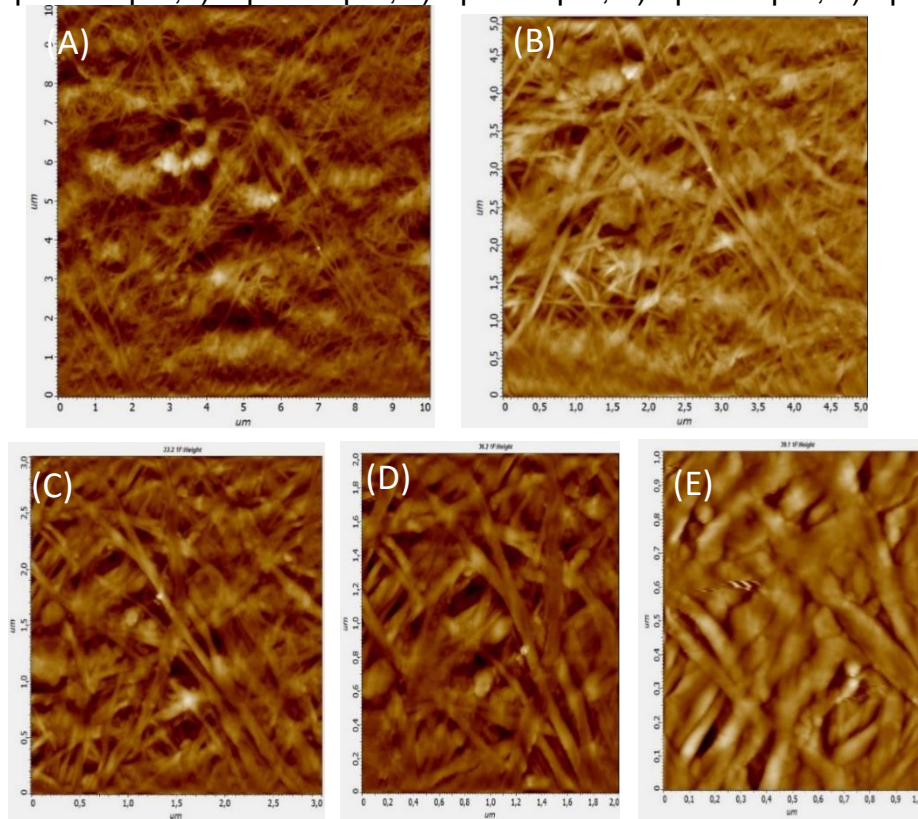
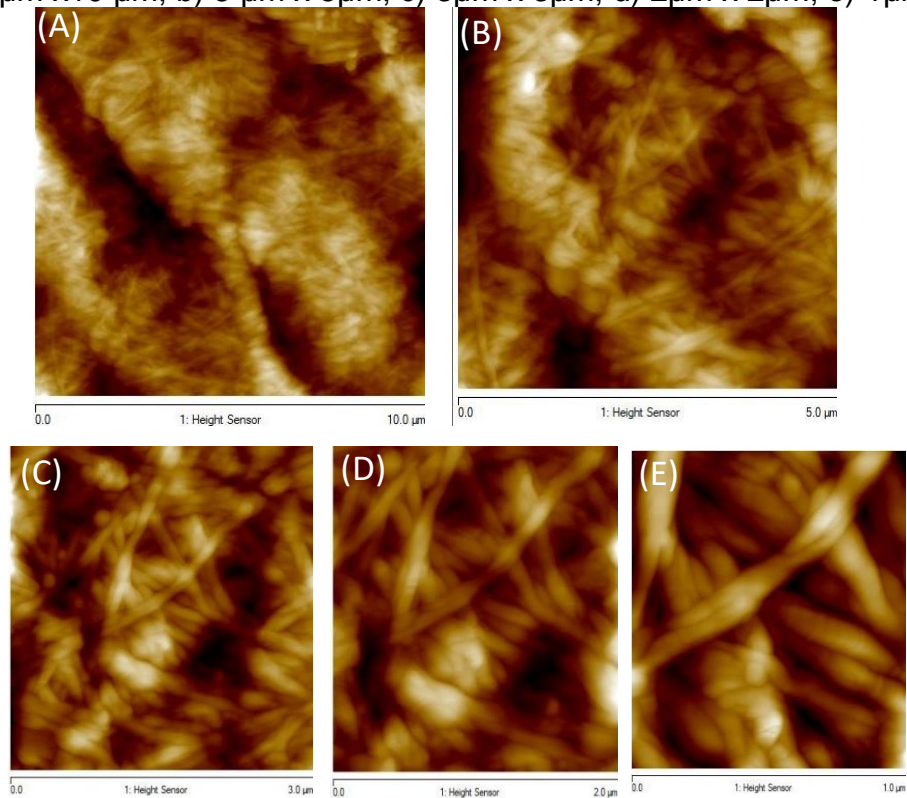


Figura 22- Imagens das MCBK<sub>OH</sub> a 1M em diferentes escalas:  
 a) 10 $\mu$ m x 10  $\mu$ m; b) 5  $\mu$ m x 5 $\mu$ m; c) 3 $\mu$ m x 3 $\mu$ m; d) 2 $\mu$ m x 2 $\mu$ m; e) 1 $\mu$ m x 1 $\mu$ m.



As análises de AFM das MCBK purificadas com água, figura 20 revelaram a morfologia em longas cadeias fibrosas, com as fibras aglomeradas e entrelaçadas, que era esperado, segundo caracterizações da mesma pela literatura.

Morfologia similar das nanofibrilas observadas na MCBK também foi obtida nos trabalhos de Woehl (2009), que produziu CB a partir da bactéria *G. xylinus*, e Pirich (2017), com CB a partir de xiloglucanas de sementes de *Tamarindus indica*.

Também é notório que as nanofibrilas das imagens de MCBK não seguem uma única direção, além da presença de regiões com superfícies irregulares, como observado na figura 20, em especial (d) e (e).

Já as morfologias das MCBK<sub>OH</sub> purificadas a 0,1M, embora apresentem perfil aglomerado, cadeias entrelaçadas e certa desorganização, suas imagens apresentam morfologias e comportamento similares às membranas purificadas com água.

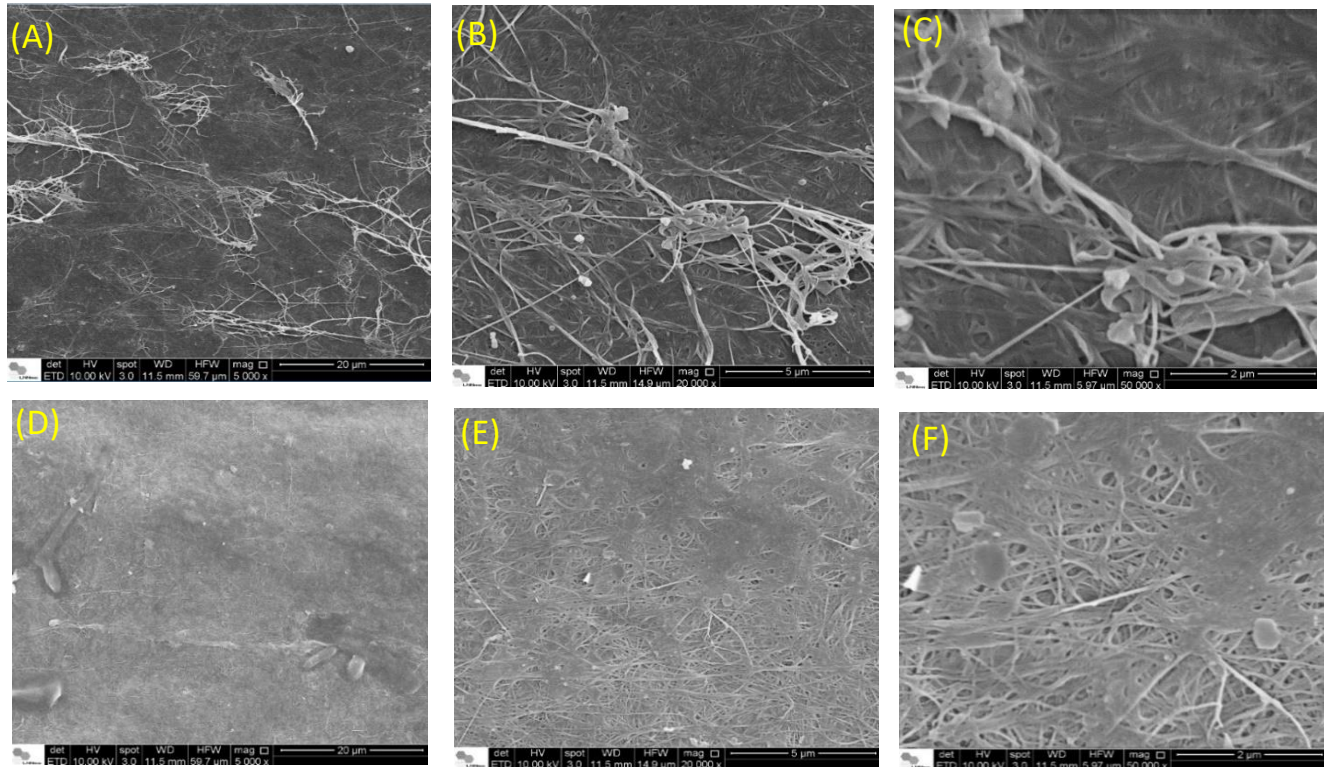
O processo de purificação com hidróxido de sódio é considerado uma etapa crucial para remoção de metabólitos presentes nas membranas. O mesmo processo pode ser identificado por outros trabalhos como Lima et al (2015); Dima et al (2017); Woehl (2009).

A figura 22, refere-se as MCBK<sub>OH</sub> submetidas a purificação com 1 M de NaOH, na qual verifica-se mesmo comportamento morfológico das anteriores, com cadeias fibrosas e entrelaçadas. O emprego de maiores concentrações molares de NaOH, durante processo de purificação, é responsável por uma purificação mais profunda das membranas de celulose, podendo ser confirmado pela técnica de difração de raio-X (Dima et al., 2017). A modificação na concentração de NaOH no processo de purificação depende das condições que se busca, entretanto ressalta-se que neste trabalho foi investigado a purificação das MCBK com 0,1 e 1 molar, de modo a avaliar suas possíveis alterações morfológicas ou não.

#### 5.1.3.2 Micrografia Eletrônica de Varredura

A análise morfológica pela técnica de MEV para as membranas pode ser observada na Figura 23, em diferentes escalas.

Figura 23 – Imagens de MEV das MCBK em (a), (b) e (c) e em (d) (e) e (f) imagens das MCBK<sub>OH</sub> a 0,1 molar em escalas: 20 µm x 20µm, 5µm x 5µm, 2µm x 2µm respectivamente.



As micrografias das MCBK secas obtidas pela microscopia eletrônica de varredura confirmam o comportamento emaranhado e aglomerado para as cadeias de nanofibrilas de celulose, como apresentadas nas imagens de AFM (figura 21). A superfície é constituída de feixes com direções aleatórias e certa irregularidade superficial, semelhante ao reportado por Souza e Recouvreux (2016) ao investigar CB produzida por bactérias do gênero *Gluconacetobacter hansenii*.

As nanofibrilas tendem a apresentar alta razão de aspecto (comprimento/diâmetro). Conforme estudos de Klemm et al (2005) e Souza e Recouvreux (2016), as celuloses bacterianas têm valor próximo de 50 para razão de aspecto. Esse fato confere uma vantagem às fibras de celulose, pois possuem alto potencial para atuarem com agentes de reforços em nanomateriais.

Os resultados das micrografias para as MCBK<sub>OH</sub> (figura 23 -d, e, f), revelaram pequenas alterações na superfície, que se deve a submissão das membranas ao



processo de purificação com hidróxido de sódio. Logo, similares comportamentos morfológicos também foram observados nas imagens de AFM na figura 21.

## **5.2 Caracterização das Nanofibrilas de Kombucha**

### **5.2.1 Micrografia de Força Atômica**

A técnica de AFM foi crucial para esta última etapa do trabalho, o qual, após submeter as membranas de Kombucha em tratamento com hidrólise ácida, se esperava obter nanocelulose bacteriana, na configuração de nanofibrilas de celulose. Visou-se investigar os comportamentos morfológicos, dimensões, seu possível isolamento, além de avaliar seu possível potencial como agente de reforços, os quais serão apresentados nesta seção.

### **5.2.2 Análise morfológica das suspensões de NFCBK**

Como mencionado na etapa experimental (tópico 4.3), a primeira parte deste estudo após HA, foi buscar converter as MCBK (purificadas com água destilada) em NFCBK. Assim, os tempos de hidrólise usados foram de 5, 10 e 15 minutos, com 64% de ácido sulfúrico à 50°C.

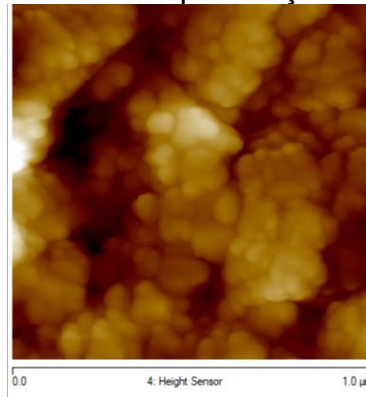
As suspensões ácidas obtidas apresentaram coloração marrom escura, para os três tempos, despertando certa curiosidade, pois geralmente suspensões de nanocelulose tendem a apresentar aspecto aquoso e esbranquiçado, como reportados em diversos trabalhos (Lima et al, 2015).

Desse modo, deve-se recordar que tais membranas não foram purificadas com NaOH, o qual é ideal para o efeito visual das suspensões.

Entretanto, as análises de AFM não revelaram nenhum comportamento similar de cadeias fibrosas ou nanofibrilas entrelaçadas/isoladas conforme os trabalhos científicos reportam (WOEHL, et al., 2010; PIRICH, 2017; LIMA et al.,2015).

Porém a morfologia apresentada nesta etapa continha formas esféricas aglomeradas entre si. Tais aglomerados podem ser provenientes do próprio material celulósico; ou as membranas foram degradadas durante a HA.

Figura 24 -imagem NFCBK sem purificação em escala 1  $\mu\text{m}$  x 1  $\mu\text{m}$



### 5.2.3 Análise morfológicas das suspensões de $\text{NFCBK}_{\text{OH}}$

Foram mantidas as condições reacionais para as membranas de Kombucha purificada com NaOH, cujas membranas estavam secas, porém o tempo de hidrólise foi modificado para 3, 4 e 5 minutos.

As suspensões ácidas obtidas nessa etapa, devido terem sido previamente purificadas com 0,1M de NaOH, no processo de hidrólise resultaram em suspensões com colorações marrons mais claras, ponto favorável em relação as suspensões das MCBK escuras obtidas anteriormente.

A concentração das bases (KOH, NaOH) usadas durante tratamento alcalino, é um ponto determinante frente à obtenção da coloração das suspensões ácidas, segundo Dima et al (2017). Quanto maior a concentração das bases, mais esbranquiçadas serão as nanocelulose.

Os tempos sugestivos para obtenção da  $\text{NFCBK}_{\text{OH}}$ , em menores tempo, 3, 4 e 5, foi considerado em virtude de se obter uma coloração mais clara das suspensões e evitar possíveis processos de degradação. Trabalho similar para obtenção de CNC, confirmou que o melhor tempo reacional foi de 10 minutos, para hidrólise ácida, contribuindo para altas razões de aspecto e formato agulhas para os nanocristais, além de melhor estabilidade térmica, dimensões e cristalinidade (Lima et al., 2015)

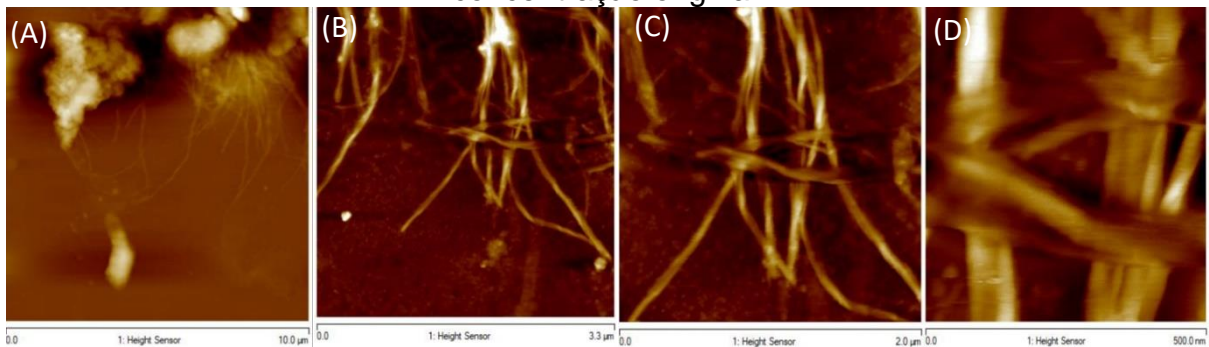
Na Figura 25 são apresentadas as imagens morfológicas obtidas para as  $\text{NFCBK}_{\text{OH}}$  em 3 minutos de hidrólise.

Verifica-se a partir da escala de 10 $\mu\text{m}$ , a presença de uma região mais aglomerada e, através dela, as fibras se desmembrando.

Nas próximas escalas pode-se visualizar as cadeias fibrosas, ainda que entrelaçadas, porém não se converteram em cristais isolados mediante ataque ácido. A região acima da porção de fibras aglomeradas se desfibrilando, na escala de  $10\ \mu\text{m} \times 10\ \mu\text{m}$ , evidencia a presença de um comportamento mais acentuado, em formato assimétrico, que pode ser entendido como a presença de resíduos experimentais que secaram na superfície amostra de  $\text{MCBK}_{\text{OH}}$ , podendo encobrir de certa forma a região das nanofibrilas.

Das concentrações analisadas, a que melhor apresentaram resultados foi a imagem das diluídas na razão de 1:50, indicando a necessidade de trabalhar mais condições experimentais a fim de atingir possível isolamento das  $\text{NFCBK}_{\text{OH}}$ .

Figura 25 – Imagens  $\text{NFCBK}_{\text{OH}}$  obtidas em 3 min, com escalas de varredura:  $10\ \mu\text{m} \times 10\ \mu\text{m}$ ;  $5\ \mu\text{m} \times 5\ \mu\text{m}$ ;  $2\ \mu\text{m} \times 2\ \mu\text{m}$  e  $500\text{nm} \times 500\text{nm}$ , todas estas pela diluição 1:50 da concentração original.

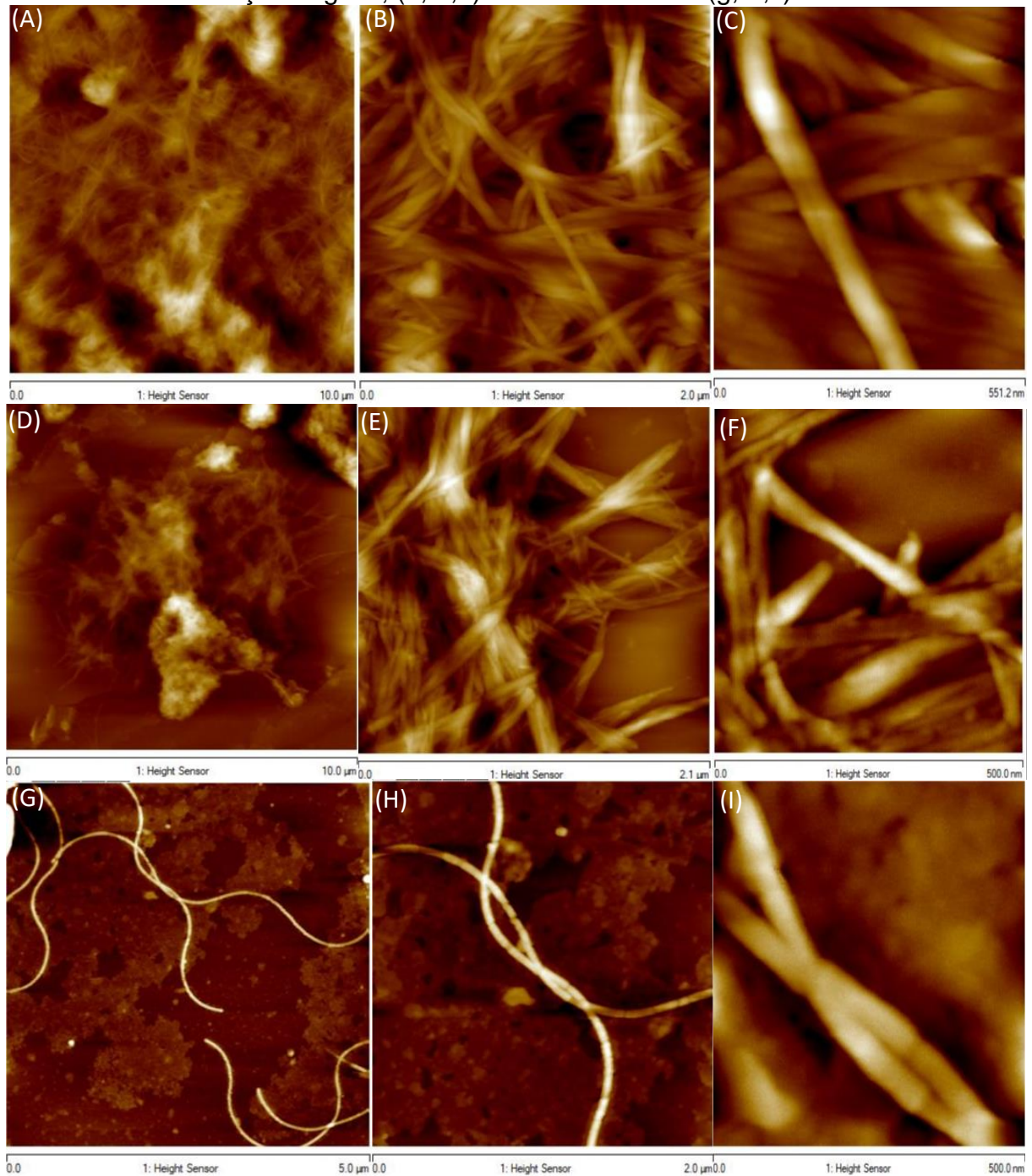


Na Figura 26, apresentam-se as imagens de  $\text{NFCBK}_{\text{OH}}$  obtidas após 4 minutos de hidrólise, considerando a concentração original [0,80g/L].

As imagens morfológicas para concentração original, evidenciaram que a hidrólise ácida nessa concentração não foi efetiva, pois as cadeias fibrosas foram extremamente resistentes à quebra, embora apresentassem pelas figuras (b) e (c) pequenas regiões de microfibrilas em evidencia às demais, fato este que não elucidada a obtenção dos nanocristais ou nanofibrilas isoladas.

Já em relação a figura (d, e, f) não se observa nenhuma mudança significativa em relação às anteriores, para mesmas escalas. As cadeias ainda permanecem aglomeradas, e emaranhadas, porém em menor intensidade.

Figura 26 – Imagem da NFCBK<sub>OH</sub> obtida em 4 min, e as diluições nas razões de 1:5 e 1:100, em diferentes escalas. As figuras (a, b, c) correspondem as amostras de concentração original; (d, e, f) na razão de 1:5 e (g, h, i) de 1:100.



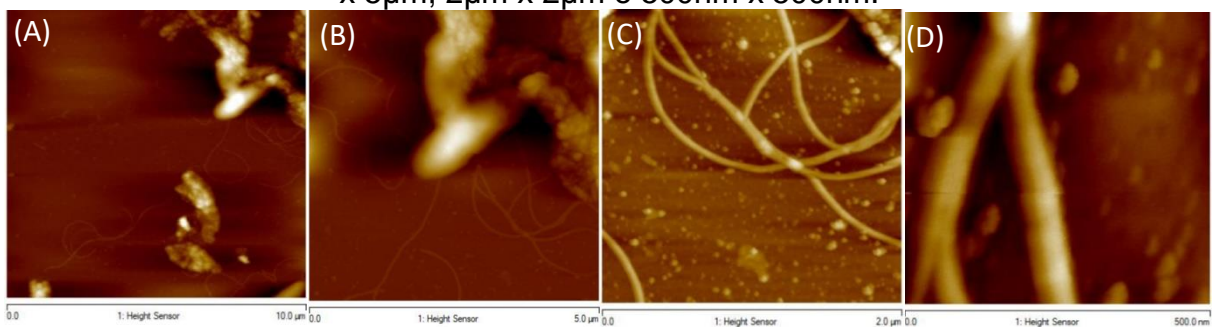
Mas, atenção especial deve-se as morfologias em (g, h, i), que apontaram um possível isolamento das NFCBK. Entretanto, não se pode determinar onde elas começam ou terminam. Fato este que impede de afirmar que este processo foi viável para isolá-las. Muito embora, algumas informações importantes podem se revelar: a primeira que se comportam como nanofibrilas, configuram-se num aspecto de



curvatura, seu valor de diâmetro e a necessidade de maiores diluições das suspensões de nanocelulose para visualizá-las.

Novo tempo reacional de 5 minutos foi testado, conforme Figura 27 (a, b, c, d), para as NFCBK<sub>OH</sub> mantendo a padronização das escalas anteriores. Ainda aqui, pode ser notado certo grau de aglomeração no substrato, que por meio deste, as microfibrilas surgem, mesmo não revelando comportamento em formato agulhas, demarcado pelos CNC.

Figura 27 - Imagens de NFCBK<sub>OH</sub> obtidas em 5min, nas escalas 10  $\mu\text{m}$  x 10 $\mu\text{m}$ ; 5 $\mu\text{m}$  x 5 $\mu\text{m}$ ; 2 $\mu\text{m}$  x 2 $\mu\text{m}$  e 500nm x 500nm.



Em comparativo as imagens obtidas via AFM para as amostras MCBK sem tratamento ácido (figuras 21 e 22), onde destaca-se os feixes fibrosos entrelaçados, pode-se identificar que após HA ocorre a desagregação das fibras, especialmente nas figuras 25 (b, c), figura 26 (g,h,i) e figura 27 (a,b, c).

Segundo WOEFL (2009) entende-se que a modificação morfológica nas cadeias pode ser responsável por sua maior dispersibilidade quando convertidas em nanofibrilas, o que eleva sua potencialidade como reforços estruturais.

Diante das caracterizações realizadas para esta parte do trabalho, considerando que houve resultados pertinentes ao objetivo do mesmo, foi possível medir a largura das nanofibrilas para os três tempos estipulados 3, 4, 5 minutos.

Dessa forma, foi selecionada uma imagem de cada tempo na escala de 2 $\mu\text{m}$  x 2 $\mu\text{m}$ , padronizando o mesmo formato de medição. Com a auxílio do software Nanoscope Analysis pode-se medir o diâmetro, onde escolheu-se 3 pontos distintos do feixe de uma nanofibrila, determinando por fim uma média com respectivo desvio padrão.

As NFCBK<sub>OH</sub> de 3 minutos apresentaram largura média de:  $16,77 \pm 1,40$  nm; as NFCBK<sub>OH</sub> de 4 min  $11,88 \pm 1,95$  nm e as de 5 min  $11,57 \pm 0,50$  nm, apresentando valores muito similares. Nota-se que houve uma redução da largura em virtude do aumento do tempo de HA (CÉSAR, 2013; SILVA et al., 2009).

Assim, de acordo com especificações ao tipo de nanocelulose, tais amostras apresentaram valor de diâmetro inferior a 50nm, o que as classificam como nanofibrilas, conforme esperado.

Diante disto, pode presumir que as nanofibrilas de celulose do Kombucha, são resistentes à quebra, mesmo quando submetidas a altas concentrações de ácido, dificultando sua conversão para cristalitos, whiskers de celulose, impedindo-as de defini-las como CNC.

Resume-se que para a obtenção do diâmetro das NFCBK, como outras nanofibrilas celulósicas é possível obtê-las através do conjunto de técnicas microscópicas existentes, capazes de definir os comportamentos das amostras. Por fim, a mensuração das dimensões das nanofibrilas ainda é um fator que oferece limitações, principalmente pela dificuldade em reconhecer as extremidades das nanofibrilas isoladas (BHAT et al., 2018).

#### 5.2.4 Análise morfológicas das suspensões de NFCBKg

Frente a necessidade de encontrar as nanofibrilas separadas foi necessário buscar novas condições experimentais para tal finalidade. Assim, ao invés de secar as MCBK<sub>OH</sub> purificadas a 0,1M, consideramos a possibilidade de usá-las *in natura*, ou seja, no próprio estado gelatinoso.

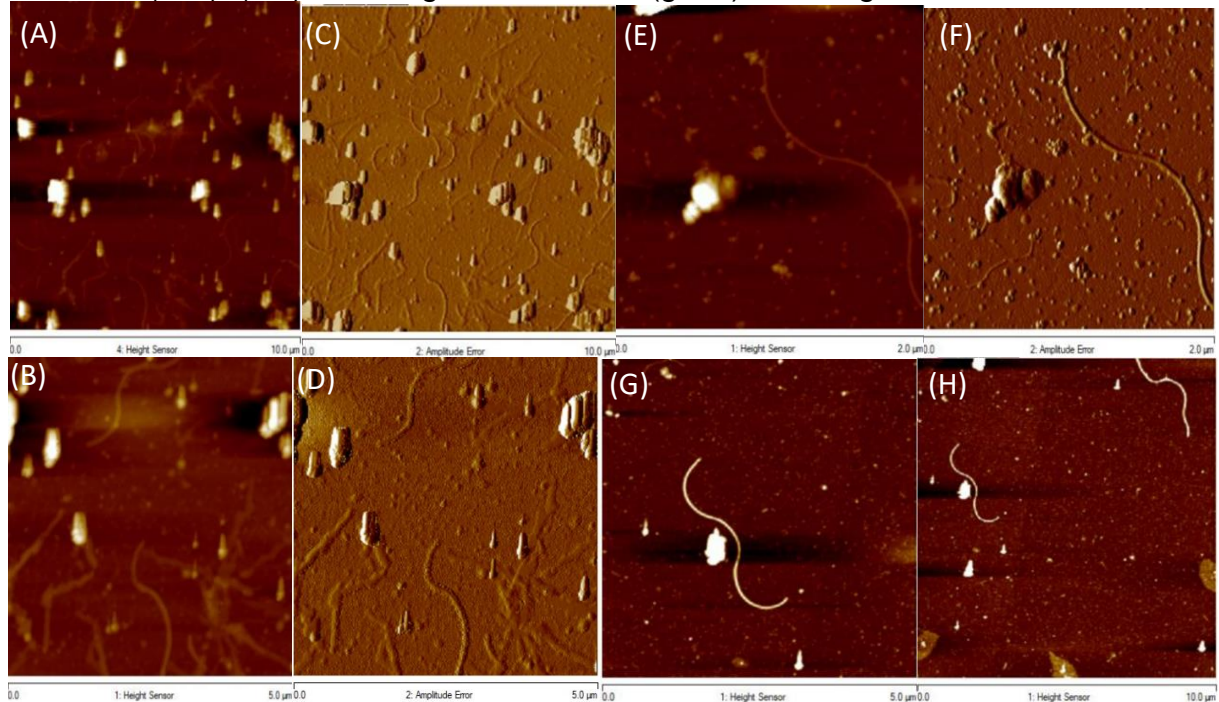
Conforme estudo de WOEHL (2009) as MCBK contêm muita água e se comportam como hidrogéis., logo são compostas de 99% de água em massa, fator este que pode vir influenciar na etapa da hidrólise.

A figura 28 apresenta as caracterizações obtidas para as suspensões gelatinosas de NFCBKg, para os respectivos tempos de 3, 4 e 5.

De acordo com as análises obtidas para este tempo, deve-se ressaltar que as imagens de amplitude são específicas para obter uma melhor imagem de altura da amostra, enquanto a denominada como height sensor é imagem de AFM geralmente

adotada para topografia das amostras, ou seja é originada pela força de atração entre a superfície da amostra e o cantilever (ponta de AFM).

Figura 28 - Imagens de suspensões gelatinosas NFCBKg obtidas, onde (a, b, c, d) correspondem as NFCBKg de 3 minutos, com imagens de height (a, b) e amplitude (c, d); (e, f) NFCBKg de 4 minutos, (g e h) NFCBKg de 5 minutos.



Os AFM das NFCBKg de 3 min correspondente as imagens de altura (a, b) que se mostraram com certa limitação a presença da nanofibrilas, muito embora, as imagens (c, d) de amplitude colaboraram para melhor entendimento da morfologia da amostra. É evidente o aparecimento de regiões com partículas aleatórias que não indicam fibra, e sim um amontoado de partículas secas, possivelmente oriundos de material residual ou indícios de uma purificação ineficiente.

A obtenção do AFM para a amostra NFCBK de 4 minutos, foi bem limitada, em virtude da dificuldade de encontrar as nanofibrilas durante a varredura. Um ponto relevante, pode ser a adsorvidade da amostra sobre a superfície da mica (substrato) adotado para receber a suspensão dos NFCBK, onde as suspensões devem ter maior adesão do que coesão.

A micrografia de AFM (g) e (h) das NFCBKg pertencem ao tempo de 5 minutos de HA, mostraram resultados satisfatórios, ao indicar o isolamento da nanofibrila de Kombucha. Sua morfologia em especial se confirma com a obtida na etapa anterior,

figura 26 (g, h), com aspecto de curvas uniformes, que sugerem certa resistência das nanofibrilas de se quebrarem em cristalitos, com formatos agulhas.

Com auxílio do software foi possível calcular o diâmetro médio para os três tempos acima mencionados, com as ferramentas descritas no tópico anterior. Porém, a escala de varredura usada na NFCBKg 3 e 5 minutos foi de  $5\ \mu\text{m} \times 5\ \mu\text{m}$ , enquanto na NFCBKg 4 minutos de  $2\ \mu\text{m} \times 2\ \mu\text{m}$ , em razão de serem as menores varreduras determinadas. Os valores de NFCBKg 3min foram  $7,88 \pm 0,01\text{nm}$ ; NFCBKg 5min  $7,80 \pm 0,40\ \text{nm}$  e NFCBKg 4 min de  $7,41 \pm 0,40\text{nm}$ .

Os valores de largura obtidos para 3 e 5 minutos mostraram-se interessantes, uma vez que o diâmetro diminuiu, pode ter sido influenciado pelo tempo de hidrólise que aumentou. Embora, o diâmetro da NFCBKg 4 min apresentou menor valor dentre eles. A diferença entre os valores obtidos é considerada aceitável, pois pode variar devido a escala selecionada para análise, como também outros fatores: tempo e concentração usados durante HA.

De acordo com a morfologia de aspecto curvatura, tanto para as nanofibrilas purificadas a  $0,1\text{M}$  das  $\text{MCBK}_{\text{OH}}$  secas como as gelatinosas, estima-se que a nanofibrilas apresentam comprimento dentro da ordem de micrômetros.

Em paralelo, Lima et al. (2015), obtiveram para suas amostras provenientes de CB, nanocelulose com dimensões que variaram de 10 a 50 nm em largura, assim como seu tamanho também entre 100 nm a vários micrômetros.

Yadav e Maji (2018) conseguiram isolar nanofibrilas celulósicas com diâmetro na faixa de 5-80 nm, e comprimento até poucos micrômetros, que corrobora com nossos resultados apresentados. Os autores também apontaram que as aderências físicas como químicas podem exercer um papel na consolidação da morfologia resultante.

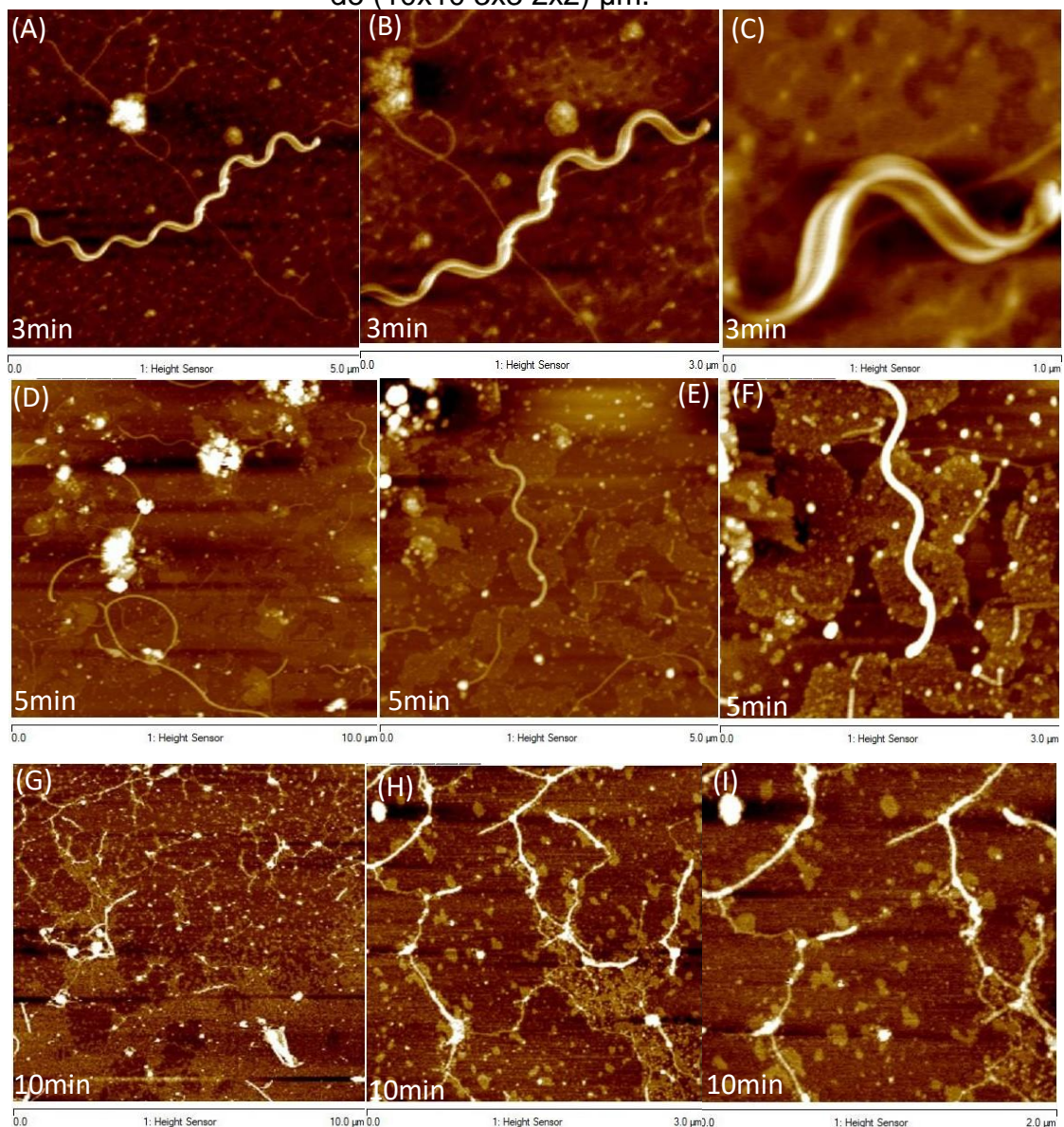
Por fim, ressalta-se que as NFCBKg caracterizadas de 10 minutos não revelaram nanofibrilas nas imagens morfológicas durante esta etapa de análise, como também as amostras diluídas na razão de 1:5.



### 5.2.5 Análise morfológicas das suspensões de NFCBKg<sub>M</sub>

A partir das membranas purificadas a 1 molar com NaOH, mantidas em estado gelatinoso foi obtido as nanocelulose por meio da reação de HA, nos tempos de 3, 4, 5 e 10 minutos. A amostra de 4 minutos, não evidenciou nanofibrilas, onde possivelmente o material celulósico pode ter se concentrado sobre o sobrenadante gerado (parte líquida obtida durante centrifugação), investigado posteriormente. Assim, a figura 29, apresenta os resultados referentes aos demais tempos.

Figura 29 - Imagens das NFCBKg<sub>M</sub> obtidas, onde (a) (b) (c) correspondem de 3 minutos nas escalas de (5x5 3x3 1x1)μm; NFCBKg<sub>M</sub> de 5 minutos (d) (e) (f) nas escalas de (10x10 5x5 3x3) μm e NFCBKg<sub>M</sub> de 10 minutos em (g) (h) (i) nas escalas de (10x10 3x3 2x2) μm.



Segundo as imagens obtidas nesta etapa, pode-se observar que as morfologias ao tempo de 3 e 5 minutos de HA mantiveram-se, quando comparadas as NFCBK<sub>g</sub> tratadas a 0,1M, pois comportaram-se de forma isolada e as nanofibrilas permaneceram com formatos de curvaturas, em especial a figura (c), que na varredura em escala de 1  $\mu\text{m}$  x 1  $\mu\text{m}$  ficou nítido uma formato de anel na nanofibrila.

Especula-se que este aspecto de anéis pode estar associado a características específicas das cadeias fibrosas da membrana bacteriana de Kombucha.

Contudo, as imagens para as NFCBK<sub>gM</sub> de 10 minutos se revelaram formas mais segregadas, ou seja, mais cilíndricas e isoladas, perdendo o aspecto curvado apresentado anteriormente. Assim, deduz-se que o aumento do tempo de HA para 10 minutos, como a maior concentração molar de NaOH na etapa de purificação da membrana foi determinante no comportamento das nanofibrilas obtidas.

Mediante a caracterização morfológica das nanofibrilas apresentadas, suas dimensões também puderam ser mensuradas, por meio do software Nanoscope Analysis, de modo que os valores médios apresentados de largura para os respectivos tempos de 3 e 5, a partir da escala de 3x3  $\mu\text{m}$  foram:  $2,11 \pm 0,05\text{nm}$  e  $2,33 \pm 0,20\text{nm}$  e na escala de 2x2  $\mu\text{m}$  para 10 minutos foi  $1,21 \pm 0,04\text{nm}$ .

Em virtude dos AFM de NFCBK<sub>gM</sub> de 10 minutos apresentar uma nanofibrila isolada, mais próxima de um CNC teve seu comprimento expresso na ordem de micrômetros igual a: 0,260  $\mu\text{m}$ .

De acordo com os valores apresentados, é evidente que ocorreu uma diminuição do diâmetro médio das nanofibrilas em relação a etapa anterior. Destaca-se que o tempo de 10 minutos foi o menor valor obtido até o momento.

As amostras de NFCBK<sub>gM</sub> diluídas na razão 1:5 para todos os tempos mencionados não revelaram resultados morfológicos pertinentes ao comportamento esperado das nanofibrilas de Kombucha.

#### 5.2.6 Análise morfológica das suspensões de NFCBKs

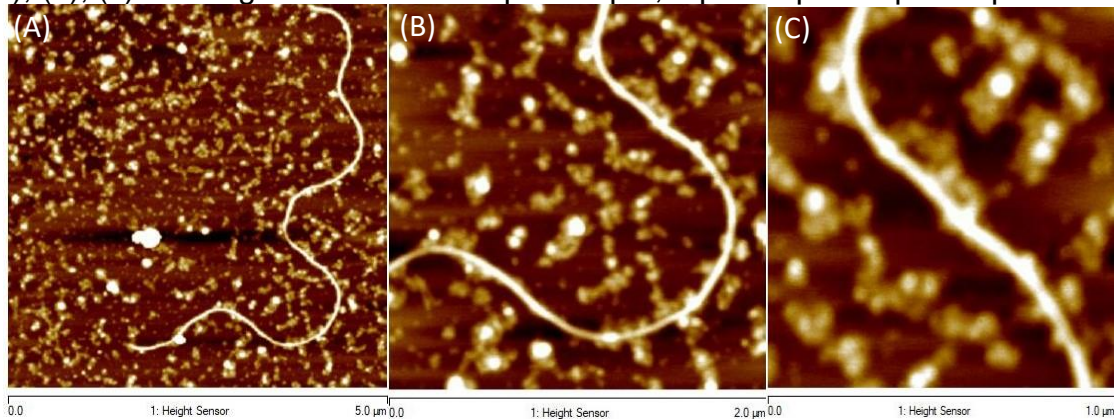
Ao longo das etapas, rumo a obtenção das nanofibrilas, e diante da dificuldade para isolá-las, foi considerado avaliar o sobrenadante obtido durante a etapa de centrifugação, o qual poderia conter material celulósico presente. Para tal

investigação, a solução recebeu o mesmo tratamento final das demais suspensões (centrifugação, diálise, sonificação) para posterior caracterização.

Assim, foram obtidas quatro suspensões de sobrenadante, para os tempos de 3, 4, 5 e 10 minutos. No entanto, para esta etapa do trabalho apenas o NFCBKs de 3,4 e 10 minutos revelaram morfologia desejável.

As imagens de AFM para as NCBKs de 3 minutos são apresentadas na figura 30, que revelaram apenas um feixe de nanofibrila isolada e mantendo o formato curvada das etapas anteriores. Mas, não se pode determinar suas extremidades, de modo que não é possível obter o valor do comprimento.

Figura 30 – Imagens das NFCBKs obtidas de 3min (concentração inicial) com (a), (b), (c) nas seguintes escalas:  $5\ \mu\text{m} \times 5\ \mu\text{m}$ ,  $2\ \mu\text{m} \times 2\ \mu\text{m}$  e  $1\ \mu\text{m} \times 1\ \mu\text{m}$ .

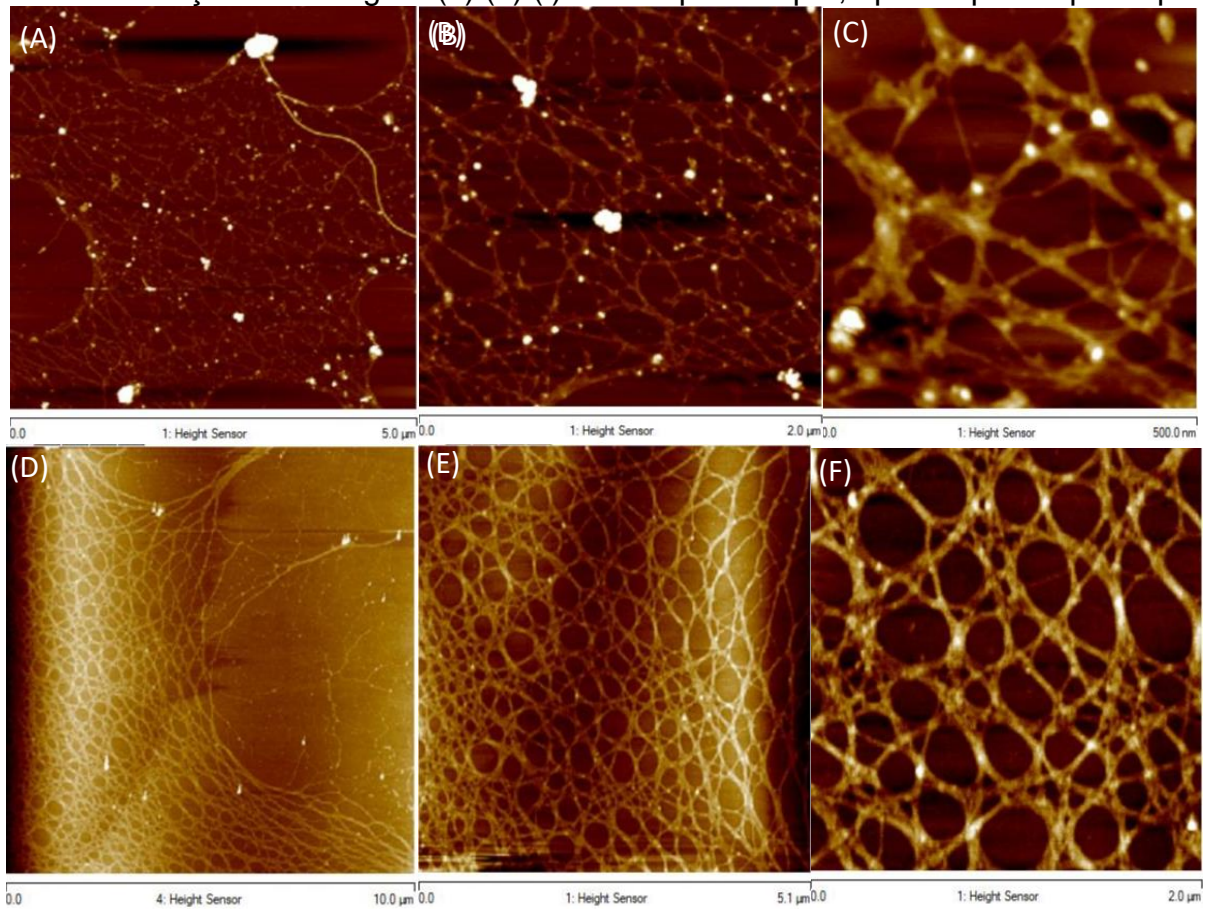


Os resultados morfológicos para as amostras do sobrenadante de 4 minutos, figura 31, se mostraram interessantes, pois configuraram uma rede de feixes fibrosos emaranhados, semelhantes a uma teia, entretanto mantendo formatos curvados/arredondados. Mesmo assim, não foi possível para essa condição experimental isolar as nanofibrilas.

Em virtude do emaranhado presente nas estruturas não foi possível obter um feixe fibroso mais isolado para determinar seu comprimento. Segundo levantamento literário, nenhum aspecto similar a esse das NFCBKs, pode ser determinado, especialmente para esse tipo de fonte bacteriana, submetido a todos esses tratamentos químicos e físicos citados. Entretanto, morfologia paralela, pode ser observado por um trabalho de desdobramento induzido por luz e redobragem de nanofibras de polímero supramolecular, que obtiveram aspecto arredondado e curvado para suas amostras (ADHIKARI et al., 2017).

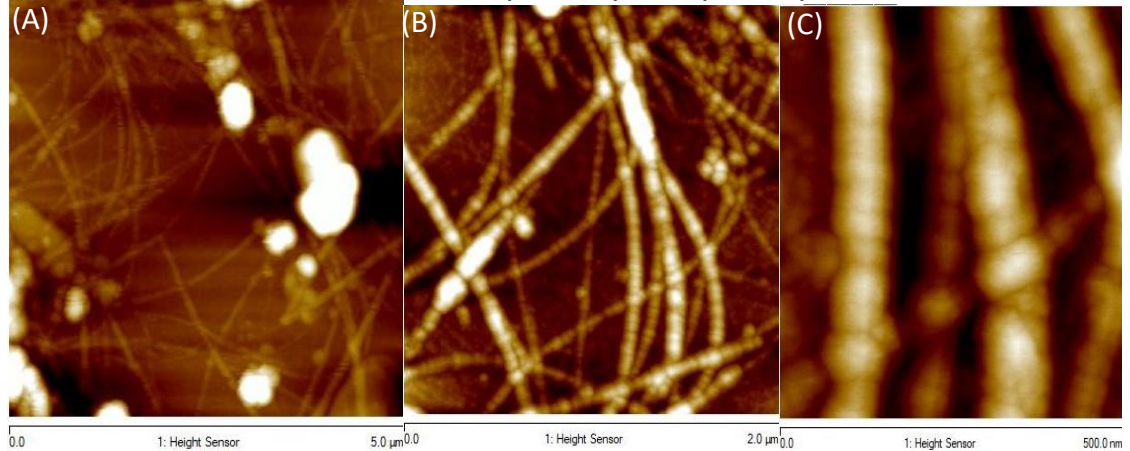


Figura 31 – Imagens das NFCBKs obtidas de 4min (concentração inicial) com (a), (b), (c) nas seguintes escalas:  $5\ \mu\text{m} \times 5\ \mu\text{m}$ ,  $2\ \mu\text{m} \times 2\ \mu\text{m}$  e  $500\text{nm} \times 500\text{nm}$  e diluição de 1:5 figura (d) (e) (f) em:  $10\ \mu\text{m} \times 10\ \mu\text{m}$ ,  $5\ \mu\text{m} \times 5\ \mu\text{m}$  e  $2\ \mu\text{m} \times 2\ \mu\text{m}$ .



Na figura 32 são apresentados os AFM das NCBKs de 10 minutos de hidrólise, fato este que pode influenciar no comportamento dos feixes das nanofibrilas visualizadas, comparada as imagens de 4 minutos. Mesmo com menor entrelaçamento entre elas, é evidente que as nanofibrilas não estão isoladas.

Figura 32 – Imagens das NFCBKs obtidas de 10min (concentração inicial) com (a), (b), (c) nas seguintes escalas: 5  $\mu\text{m}$  x 5  $\mu\text{m}$ , 2  $\mu\text{m}$  x 2  $\mu\text{m}$  e 500nm x 500nm.



Contudo, mesmo as imagens das morfologias para os sobrenadantes não oferecerem formatos de cristais isolados, foi possível obter os valores médios de seus diâmetros, a partir da escala 5x5  $\mu\text{m}$ , para os respectivos tempos de 3, 4 e 10 minutos, os quais foram:  $3,45 \pm 0,55 \text{ nm}$ ;  $2,9 \pm 1,01 \text{ nm}$  e  $2,77 \pm 0,88 \text{ nm}$ . Frente aos resultados, pode-se compreender que os valores diminuíram de acordo com o aumento do tempo de HA, já observado nas etapas anteriores, e mais uma vez, se configuram como nanofibrilas.

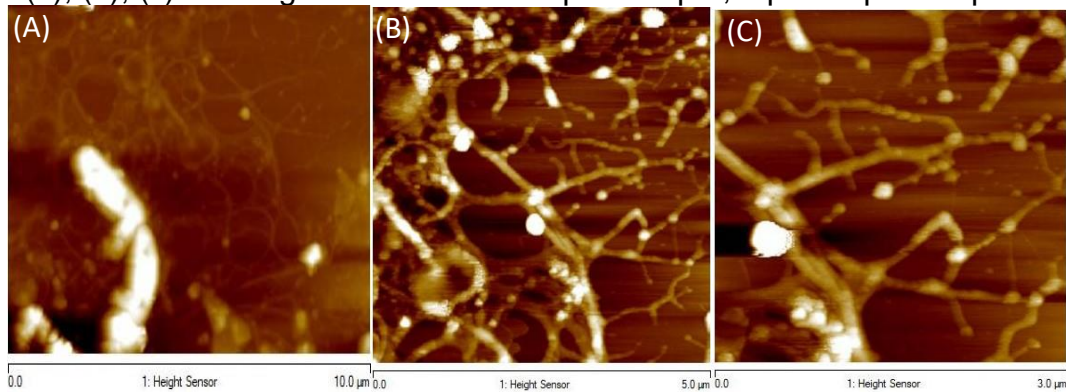
As amostras de NFCBKs diluídas na razão 1:5 para os tempos citados não revelaram resultados morfológicos dentro do aguardado.

### 5.2.7 Análise morfológica das suspensões de NFCBKs<sub>M</sub>

O sobrenadante obtido das etapas anteriores, no caso, das suspensões NFCBKg<sub>M</sub> a 1 molar de NaOH, também foram analisados, onde as etapas (centrifugação, diálise, sonificação) das suspensões foram realizadas anteriormente a caracterização.

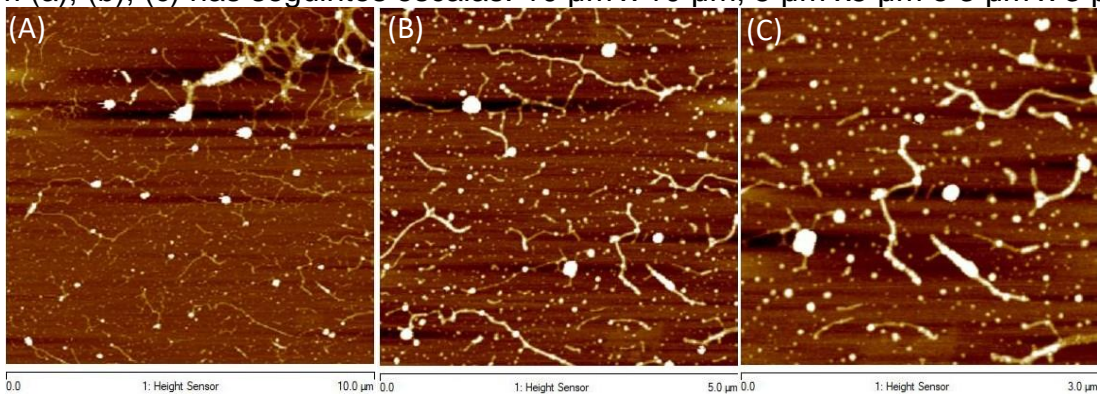
As suspensões NFCBKs<sub>M</sub> de 3,4,5 e 10 minutos foram caracterizados via AFM, no entanto, apenas os tempos de 3,4 e 5 minutos apresentaram suas morfologias segundo as figuras 33,34 e 35. Também, as amostras diluídas (1:5) não ofereceram resultados morfológicos esperados.

Figura 33 – Imagens das NFCBKs<sub>M</sub> obtidas de 3min (concentração inicial) com (a), (b), (c) nas seguintes escalas: 10  $\mu\text{m}$  x 10 $\mu\text{m}$ , 5  $\mu\text{m}$  x 5 $\mu\text{m}$  e 3  $\mu\text{m}$  x 3 $\mu\text{m}$ .



É notável que a figura 37 (a) mesmo com a resolução limitada, apresenta uma região com as nanofibrilas entrelaçadas, enquanto em (b) e (c) pode-se ver com mais nitidez as cadeias fibrosas.

Figura 34 – Imagens das NFCBKs<sub>M</sub> obtidas de 4min (concentração inicial) com (a), (b), (c) nas seguintes escalas: 10  $\mu\text{m}$  x 10  $\mu\text{m}$ , 5  $\mu\text{m}$  x 5  $\mu\text{m}$  e 3  $\mu\text{m}$  x 3  $\mu\text{m}$ .

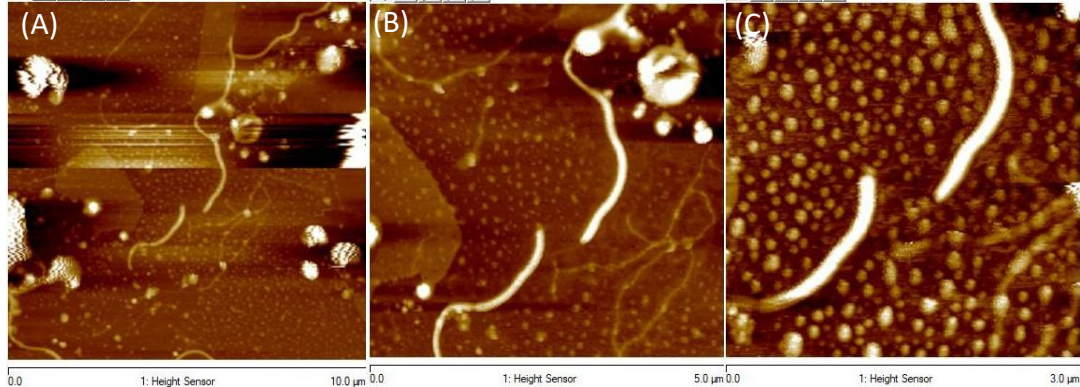


As NFCBKs<sub>M</sub>, figura 34, revelaram nanofibrilas bem isoladas, quando comparada as NFCBKs também de 4 minutos. Especula-se que o aumento da molaridade de 0,1M para 1M pode ter influenciado no comportamento das nanofibrilas, uma vez que o processo de purificação é mais acentuado à altas concentrações. Mesmo apresentando-se de forma isoladas, as nanofibrilas mantiveram o aspecto curvatura, conforme apresentado pelas etapas anteriores.

Especula-se que tais comportamentos curvados, provém de características do tipo de fonte bacteriana, ainda pouco explorada, como sugere elevada resistência à quebra durante HA.



Figura 35 – Imagens das NFCBKs obtidas de 5min (concentração inicial) com (a), (b), (c) nas seguintes escalas: 10  $\mu\text{m}$  x 10  $\mu\text{m}$ , 5  $\mu\text{m}$  x 5  $\mu\text{m}$  e 3  $\mu\text{m}$  x 3  $\mu\text{m}$ .



Confirma-se pela figura 35, a mesma morfologia e aspecto para as NFCBKs<sub>M</sub> de 5 minutos. Assim, pode-se inferir que o tempo de HA é crucial para configurar o comportamento das nanofibrilas mais dispersas, como observados para as figuras 33,34 e 35.

Após as caracterizações morfológicas das nanocelulose calculou-se o valor médio das larguras, como também estimou o comprimento, em especial das NFCBKs<sub>M</sub> de 4 minutos, figura 34 (b), na ordem de micrômetros, o qual dos AFM desta etapa foi a que melhor evidenciou as nanofibrilas separadas.

Assim, as larguras obtidas através das escalas de 5x5  $\mu\text{m}$ , nos respectivos tempos 3,4 e 5 de HA, foram:  $3,08 \pm 0,35 \text{ nm}$ ;  $2,33 \pm 0,18$ ;  $2,28 \pm 0,44 \text{ nm}$ . Como esperado, os valores desta fase como a anterior (NFCBKs 0,1M) foram similares, assim como os obtidos da etapa dos NFCBKg<sub>M</sub>. Novamente, observa-se que o tempo de HA foi determinante para os resultados apresentados, assim conclui-se que quanto menor o tempo de hidrólise pode-se ter tamanhos menores de CNF, como também maiores valores de razão de aspecto.

Por fim, como a Kombucha é uma fonte renovável ainda pouco explorada, pelo pouco volume expresso de trabalhos na área, especificamente sob as condições experimentais descritos durante este trabalho, discute-se que a própria nanofibrila presente na membrana pode possuir alto potencial como uso de reforços em novos nanomateriais, como por exemplo, atuar como agentes de reforços em matrizes poliméricas sintéticas ou naturais, que resultará num produto final biodegradável, reciclável e menos poluente ao meio (Dima et al, 2017).

### 5.2.8 Síntese dos resultados de morfologia


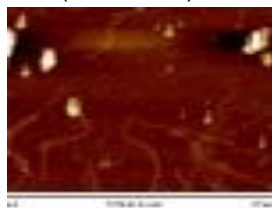
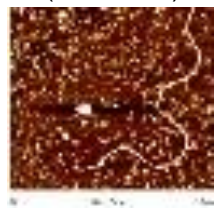

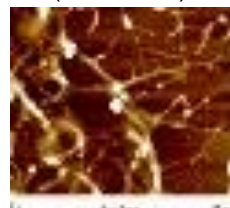

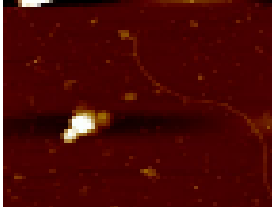
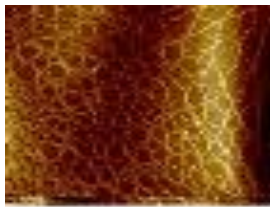


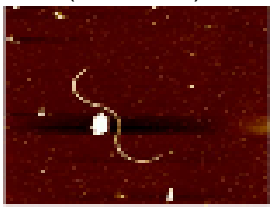


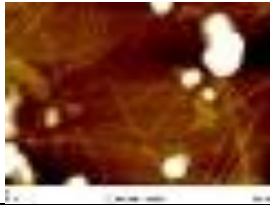
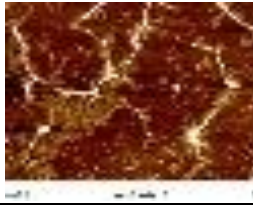
Na tabela 4 estão sistematizados os resultados obtidos pela técnica AFM de maneira geral, a fim de melhor compreendê-los. Já na tabela 5 trata-se de uma tabela comparativa com os tamanhos para os diferentes tratamentos aplicados as NFCBK.

Uma síntese com as principais larguras obtidas para este trabalho pode ser então visualizada na tabela 5, o qual se nota que no primeiro tratamento não foi possível obter nanofibrilas das MCBK purificadas com água. Já no segundo tratamento das NFCBK secas e purificadas com NaOH (0,1M) dentro dos 3 tempos estabelecidos obtivemos resultados dentro da escala nanométrica. Mas, a necessidade de maiores investigações possibilitou explorar a membranas in natura, porém purificadas a 0,1 e 1 molar de NaOH, os quais foram responsáveis pelos menores tamanhos de largura deste trabalho, além de considerar também a influência do tempo de HA.

Em comparativo, os resultados aqui obtidos se aproximam com o observado por de Dima et al (2017) e Lima et al (2015), onde ambos trabalharam com CB, o primeiro com CB de KC e o segundo com CB do gênero *Gluconacetobacter Xylium*, entretanto deve-se reforçar que os métodos de obtenções das CNF diferem para cada trabalho citado, mas que os valores de diâmetro foram expressos na ordem de nanômetros.



**Tabela 4** - Tabela com a síntese dos resultados obtidos nesse trabalho, onde HA é Hidrólise ácida e NR é nenhum resultado obtido.

HA (min)	MCBK seca Água	MCBK seca 0,1 molar NaOH	MCBK <sub>OH</sub> gelatinosa 0,1 molar NaOH		MCBK <sub>OH</sub> gelatinosa 1 molar NaOH	
	Precipitado	precipitado	precipitado	sobrenadante	precipitado	Sobrenadante
3	—	NF entrelaçadas d= (16,77±1,40) nm 	NF dispersas/curvas d= (7,88±0,01) nm 	NF dispersas/curvas d= (3,45±0,55) nm 	NF Isoladas/curvas d= (2,11±0,05) nm 	NF dispersas/cilíndricas d= (3,08±0,35) nm 
4	—	NF dispersas/curvas d= (11,88±1,95) nm 	NF dispersas/curvas d= (7,41±0,40) nm 	emaranhado de NF d=( 2,9±1,01) nm 	NR	NF isoladas/cilíndricas d= (2,33±0,18) nm 
5	NR	NF dispersas/curvas d= (11,57±0,50) nm 	NF isoladas/ curvas d= (7,80±0,40) nm 	NR	NF dispersas/curvas d= (2,33±0,20) nm 	NF isoladas e curvas d= (2,28±0,44) nm 
10	NR	—	NR	NF dispersas/cilíndricas d= (2,77±0,88) nm 	NF Isoladas/cilíndricas d= (1,21±0,04) nm 	NR
15	NR	—	—	—	—	—

**Tabela 5** - tabela comparativa dos tamanhos obtidos das NFCBK

Valores de largura das NFCBK (nm)						
HA (min)	NFCBK seca Água	NFCBK seca 0,1 molar NaOH	NFCBK <sub>OH</sub> gelatinosa 0,1 molar NaOH		NFCBK <sub>OH</sub> gelatinosa 1 molar NaOH	
	Precipitado	precipitado	precipitado	sobrenadante	precipitado	Sobrenadante
3	—	16,77±1,40 nm	7,88±0,01 nm	3,45±0,55 nm	2,11±0,05 nm	3,08±0,35 nm
4	—	11,88±1,95 nm	7,41±0,40 nm	2,9±1,01nm	<b>NR</b>	2,33±0,18 nm
5	<b>NR</b>	11,57±0,50nm	7,80±0,40 nm	<b>NR</b>	2,33±0,20 nm	2,28±0,44 nm
10	<b>NR</b>	—	<b>NR</b>	2,77±0,88 nm	1,21±0,04 nm	<b>NR</b>
15	<b>NR</b>	—	—		—	

## 6. CONCLUSÃO

A membrana de Kombucha utilizada neste trabalho, apresentou-se como uma fonte alternativa para obtenção de celulose bacteriana, de baixo custo, pura e livre de poluentes. As vantagens de adotar MCBK como matéria prima precursora para obtenção de nanofibrilas, deve-se também pela elevada cristalinidade, bom desempenho mecânico e resistência.

As nanofibrilas foram obtidas mediante reação de hidrólise ácida, com ácido sulfúrico 64%, à 50°C, com diferentes tempos reacionais, variando de 3,4,5,10 e 15 minutos para cada etapa específica, onde o melhor tempo observado foi de 10 minutos.

Os resultados de caracterização empregados, evidenciaram inicialmente que as MCBK apresentaram composição química, cristalinidade, morfologia e estrutura designadas de celulose, tipo I, pertencentes às CB.

Entretanto, as caracterizações morfológicas para as nanocelulose (NFCBK<sub>OH</sub>) oriundas das membranas secas a 0,1M de NaOH, confirmaram que as NC obtidas são nanofibrilas, com valores médios de largura, variando entre (16,77±1,44nm a 11,57±0,50nm); já as NC purificadas a 0,1M e 1M (NFCBK<sub>g</sub>, NFCBK<sub>gM</sub>, NFCBK<sub>s</sub> e NFCBK<sub>sM</sub>) apresentaram largura média entre (1,21±0,04 a 7,88±0,01nm).

Conclui-se que com o aumento do tempo de HA, os valores de largura diminuíram, em destaque para as nanofibrilas obtidas a partir da membrana purificada a 1M de NaOH, revelando o menor tamanho apresentado neste trabalho, na ordem de 1,21nm, cujo tempo de HA foi 10minutos.

As nanofibrilas apresentaram comprimento na ordem de micrômetros, embora não foi possível estabelecer uma média, devido às limitações da organização da mesma nas etapas.

Por meio das análises de AFM foi identificado um padrão de organização das nanofibrilas, com aspecto arredondado e curvado, que sugere elevada resistência mecânica do material, especialmente ao ataque ácido, pois não são capazes de se converterem em nanocristais ou whiskers.

Contudo, foi possível verificar a partir das imagens de AFM que as nanofibrilas obtidas mediante membrana purificada com 1M de NaOH, denominadas NFCBK<sub>gM</sub> e NFCBK<sub>sM</sub>, revelaram-se mais isoladas e como morfologia muito próxima das CNC, embora suas dimensões a classifiquem como nanofibrilas.

Enfatiza-se que a Kombucha ainda é uma fonte renovável pouco explorada de alto valor e interesse ambiental, o que a categoriza como uma alternativa em potencial para estudos científicos nesse campo nanotecnológico. Em especial, este trabalho aponta que tanto as nanofibrilas de CB como a própria membrana original de Kombucha (sem submissão a tratamentos ácidos), apresentam alto potencial de reforço tanto em matrizes poliméricas convencionais e/ou biopolímeros para produção de plásticos biodegradáveis.

## REFERÊNCIAS

- ABE, K.; IWAMOTO, S.; YANO, H. *Obtaining cellulose nanofibers with a uniform width of 15 nm from wood*. *Biomacromolecules*, 8, 3276-3278, 5, set. 2007.
- ADHIKARI, B. et al. *Light-induced unfolding and refolding of supramolecular polymer nanofibres*. *Nature Communications*, v. 8, n. May, p. 1–10, 2017.
- ALESSANDRINI, A.; FACCI, P. *AFM: a versatile tool in biophysics*. *Measurement Science and Technology*, v.16, p.65-92, jun. 2005.
- ALMAGRO, V.L. *Síntese de celulose bacteriana utilizando bagaço de laranja como fonte de carbono alternativa*. 2019. 61f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de São Carlos, 2019.
- ANTÔNIO, R. V. et al. *Produção De Celulose Bacteriana a Partir De Diferentes Substratos*. *Revista Técnico Científica*, v.3, n.1, p.176–182, 2012.
- AUGIMERI, Richard V.; VARLEY, Andrew J.; STRAP, Janice L. *Establishing a Role for Bacterial Cellulose in Environmental Interactions: Lessons Learned from Diverse Biofilm Producing Proteobacteria*. 17 nov. 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2015.01282>. Acesso em: 19 jul. 2019
- AYDIN, Y.A.; AKSOV, N.D. *Appl. Biochem. Biotechnol.* V.98, n.3, p.1065-75, 2014.
- BARREIRO, A. M. et a. *Sand dollar skeleton as templates for bacterial cellulose coating and apatite precipitation*. *Journal of Materials Science*, v. 45, p. 5252-5256, 2010.
- DEDAVID, B.A.; GOMES, C.I.; MACHADO, G. *Microscopia eletrônica de varredura: aplicações e preparação de amostras*. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2007.60p. Disponível em: <http://www.pucrs.br/edipucrs/online/microscopia.pdf>. Acesso em: 20 jul. 2019
- BARKER, S. A.; DOSS, S. H.; GRAY, C. J.; KENNEDY, J. F.; STACEY, M.; YEO, T. H.  *$\beta$ -d-glucosidase chemically bound to microcrystalline cellulose*. *Carbohydrate Research*. v. 20, n. 1, p. 1-7, 1971.
- BIELECKI, Stanislaw et al. *Bacterial Cellulose*. *Biopolymers Online*, [s.l.], p.40-85, 15 jan. 2005. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1002/3527600035.bpol5003>. Acesso em: 22 jul. 2019
- BEVILACQUA, N. S.; PEDREIRA, D. A. L. *Fetoscopy for meningomyelocele repair: past, present and future*. *Einstein (São Paulo)*, v. 13, n. 2, p. 283–289, jun. 2015.
- BHAT, A. H. et al. *Cellulose an ageless renewable green nanomaterial for medical applications: An overview of ionic liquids in extraction, separation and dissolution of cellulose*. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 129, p. 750–777, 2019.

BRANDES, R. et al. *Preparation and Characterization of Bacterial Cellulose/TiO<sub>2</sub> Hydrogel Nanocomposite*. JOURNAL OF NANO RESEARCH (ONLINE), v. 43, p. 73-80, 2016.

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

BONDESON, D.; MATHEW, A.; OKSMAN, K. *Optimization of the isolation of nanocrystals from microcrystalline cellulose by acid hydrolysis*. Cellulose, 13, 171-180. Abr. 2006.

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

BROWN, R. M.; SAXENA, I. M.; KUDLICKA, K. *Cellulose biosynthesis in higher plants*. Trends in Plant Science., v.1, n.5, p.149-156. 1996.

BROWN JR., M. R. *Microbial Cellulose: a new resource for wood, paper, textiles, food and specialty products*. Position Paper, 1998a. Disponível em: [www.botany.utexas.edu/facstaff/facpages/mbrown](http://www.botany.utexas.edu/facstaff/facpages/mbrown). Acesso em: 22 jul. 2019  
Cai, Z., Kim, J. Cellulose, v.17, n.1, p. 83-91, 2010.

CAMARGO, J.S.G. *Modificação da Molhabilidade da Celulose por Processos Combinados de Ablação e Deposição a Plasma*. 2016.91f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Materiais) – Universidade Federal de São Carlos, 2016.

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

CÉSAR, N.R.; et al. *Cellulose nanocrystals from natural fiber of the macrophyte Typha domingensis: extraction and characterization*. Cellulose, v. 22, p. 449-460, 2015.

CHEN, Lin et al. *Biotransformation of wheat straw to bacterial cellulose and its mechanism*. Bioresource Technology, [s.l.], v. 135, p.464-468, 2013. Elsevier BV. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2012.10.029>. Acesso: 22 jul. 2019

CZAJA, W., KRYSZYNOWICZ, A., BIELECKI, S., & BROWN, R. M. *Microbial cellulose - The natural power to heal wounds*. Biomaterials, 27(2), 145–151. 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.07.035>. Acesso em: 22 jul. 2019

DA COSTA, J. F. et al. *Bacterial cellulose nanocrystals: From obtaining, under different hydrolysis conditions, the incorporation as reinforcement in poly(L-lactic acid)*. Revista Matéria, v. 22, n. Janeiro, 2017.

DEDA, D.K. et al. *Atomic Force Microscopy-Based Molecular Recognition: A Promising Alternative to Environmental Contaminants Detection*. Current Microscopy Contributions to Advance in Sciences and Technology., p.1337-1348, 2012.

- DIMA, S.O. et al. *Bacterial Nanocellulose from Side-Streams of Kombucha Beverages Production: Preparation and Physical-Chemical Properties*. *Polymers*, 1-24, ago. 2017.
- DONINI, Í. A. N. et al. *Biossíntese e recentes avanços na produção de celulose bacteriana*. *Ecletica Química*, v.35, n.4, p.165–178, 2010.
- EICHHORN, S.J. et al. *Review: current international research into cellulose nanofibres and nanocomposites*. *J Mater Sci.*, 262, p.89-96, 2008.
- ESA, Faezah; TASIRIN, Siti Masrinda; RAHMAN, Norliza Abd. *Overview of Bacterial Cellulose Production and Application*. *Agriculture And Agricultural Science Procedia*, [s.l.], v. 2, p.113-119, 2014. Elsevier BV. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aaspro.2014.11.017>. Acesso em: 26 jul. 2019.
- FLAUZINO NETO, W.P; Silvério, H.A; Dantas, N.O; Pasquini, D. *Extraction and characterization of cellulose nanocrystals from agro-industrial residue – Soy hulls*. *Industrial Crops and Products*. 42, 480-488, mar. 2013.
- FERNANDES, M. C,S.; Filho,P,I.P.; Morelli,M.R. *Análise da superfície de grês porcelanato por microscopia de força atômica*. *Cerâmica*,57, p.173-179, 2011.
- FERRER, A.; PAL, L.; HUBBE, M. *Nanocellulose in Packaging: Advances in Barrier Layer Technologies*. *Industrial Crops and Products*, v. 95, p.574–582, 2017.
- GAGGIÀ, F. et al. *Kombucha beverage from green, black and rooibos teas: A comparative study looking at microbiology, chemistry and antioxidant activity*. *Nutrients*, v. 11, n. 1, p. 1–22, dez. 2018.
- GINDL, W.; KECKES, J. *Tensile properties of cellulose acetate butyrate composites reinforced with bacterial cellulose*. *Composites Science and Technology*, 64, 2407-2413, nov. 2004.
- GONÇALVES, M. T. *Caracterização de Filmes Finos Obtidos por Deposição de Vapor Químico Assistido a Plasma (PECVD) e Deposição e Implantação Iônica por Imersão em Plasma (PIID)*.2012.174f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Materiais) – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Sorocaba, SP, 2012.
- GOLDSTEIN, J. et al. *Scanning Electron Microscopy and X-ray Microanalysis*. 3 ed. New York: Springer, 689 p., 2003.
- GONG, J. et al. *Research on cellulose nanocrystals produced from cellulose sources with various polymorphs*. *RSC Advances*, 7(53), p.33486–33493, 2017.
- HAYASAH, N.; KONDO, T.; ISHIHARA, M.. *Enzymatically produced nano-ordered short elements containing cellulose I beta crystalline domains*. *Carbohydrate Polymers*, 61, 191-197. Abr. 2005.
- HERMANN, P. S. P. *Microscopia de varredura por força: uma ferramenta poderosa no estudo de polímeros*. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*. p. 51-61, dez. 1997.

HOMMEL, R.k. Acetobacter. Encyclopedia Of Food Microbiology, [s.l.], p.3-10, 2014. Elsevier. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-384730-0.00001-x>. Acesso em: 29 jul. 2019.

ISO Technical Specification ISO/TS 27687, Nanotechnologies – Terminology and definitions for nano - objects – Nanoparticle, nanofiber and nanoplate. p. 1–6, 2011.

JAYABALAN, R. et al. *Biochemical characteristics of tea fungus produced during kombucha fermentation*. Food Science and Biotechnology, v. 19, n. 3, p. 843–847, jun. 2010.

JAYABALAN, Rasu et al. *A Review on Kombucha Tea-Microbiology, Composition, Fermentation, Beneficial Effects, Toxicity, and Tea Fungus*. Comprehensive Reviews In Food Science And Food Safety, [s.l.], v. 13, n. 4, p.538-550, 21 jun. 2014. Wiley. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1111/1541-4337.12073>. Acesso em: ago. 2019.

JAYABALAN, Rasu; MALBAŁA, Radomir V.; SATHISHKUMAR, Muthuswamy. *Kombucha*. Reference Module In Food Science, [s.l.], p.1-8, 2016. Elsevier. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-08-100596-5.03032-8>. Acesso: ago. 2019

JOZALA, Angela Faustino et al. *Bacterial nanocellulose production and application: a 10- year overview*. Applied Microbiology And Biotechnology, [s.l.], v. 100, n. 5, p.2063-2072, 8 jan. 2016. Springer Science and Business Media LLC. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-015- 7243-4>. Acesso: ago. 2019

KABOORANI, A. et al. *Nanocrystalline cellulose (NCC): A renewable nano-material for Polyvinyl acetate (PVA) adhesive*. European Polymer Journal.,v.48,p.1829-1837, ago. 2012.

KESTENBAC, H.J.; BOTA FILHO W.J. *Microscopia eletrônica transmissão e varredura*. São Paulo: ABM, 1994.

KESHK, S.; SAMESHIMA, K. *Enzym. Microb. Technol.* V.40, n.1, p. 4-8, 2006.

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

KLEMM, D. et al. *Comprehensive cellulose chemistry*, v.1,1998.

KUPTSOV, A. H.; ZHIZHIN, G. N. *Handbook of Fourier Transform Raman and Infrared Spectra of Polymers*. *Bioseparation*, p. 536, 1998.

KONDAGESKI, C. *Compósito Polimérico de Nanocelulose Bacteriana Epoli (ácido L-Lático- Trimetileno Carbonato) para Aplicações Biomédicas*. 2016.134f.Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina, 2016.



- LAHIJI, R.R. et al. *Atomic Force Microscopy Characterization of Cellulose Nanocrystals*. Langmuir., v.26(6),p. 4480-4488, 2010.
- LASZKIEWICZ, B. J. Appl. Polym. Sci. v.67, p.1871-1876,1997.
- LEITE, D. DE O.; PRADO, R. J. *Espectroscopia no infravermelho: uma apresentação para o Ensino Médio*. Revista Brasileira de Ensino de Física, v. 34, n. 2, 2012.
- LENGOWSKI, E. C. *Cellulose acquirement evaluation methods with different degrees of crystallinity*. Scientia Forestalis/Forest Sciences, v. 41, n. 98, p. 185–194, 2013.
- LEUNG, W.C.A. et al. *Reinforced Plastics and Aerogels by Nanocrystalline Cellulose*. J.Nanopart. Res.,v.15, p.1636, 2013.
- LI, J. et al. *Production of high crystallinity type-I cellulose from Komagataeibacter hansenii JR-02 isolated from Kombucha tea*. Biotechnology and Applied Biochemistry, v. 66, n. 1, p. 108–118, 2019.
- Lima, H. L., Nascimento, E. S., Barros, M. de O., & Santiago, M. I. A. Celulose bacteriana obtida por diferentes fontes agroindustriais. 2015. Natal. **Anais Do 13º Congresso Brasileiro de Polímeros**, Natal, 2015.
- LIMA, R.L. et al. *Nanocristsais de cellulose a partir de cellulose bacteriana*. Química Nova, 1-8, 2015.
- LILLARD, J. W. JR. et al. *The haemin storage (Hms+) phenotype of Yersinia pestis is not essential for the pathogenesis of bubonic plague in mammals*. Microbiology, v.145 (Pt 1), p.197- 209, jan. 1999.
- MACHADO, Rachel T.a. et al. *Komagataeibacter rhaeticus grown in sugarcane molassessupplemented culture medium as a strategy for enhancing bacterial cellulose production*. Industrial Crops And Products, [s.l.], v. 122, p.637-646, out. 2018. Elsevier BV. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.06.048>. Acesso: ago. 2019
- MAHMOUD, K. A.; LAM, E.; HRAPOVIC, S.; LUONG, J. H. T. *Preparation of WellDispersed Gold/Magnetite Nanoparticles Embedded on Cellulose Nanocrystals for Efficient Immobilization of Papain Enzyme*. ACS Applied Materials & Interfaces. v. 5, n. 11, p. 4978-4985, maio 2013.
- MELLO, L. R. et al. *Duraplasty with biosynthetic cellulose: an experimental study*. Journal of neurosurgery, v. 86, n. 1, p. 143–150, 1997.
- MENEZES, A. J. De. *Preparação e Caracterização de Sistema Bifásico Mono-componente (SBM) a partir da Reação de Oxipropilação de Fibras Celulósicas e Amido*. Tese (Doutorado em Ciências – Físico- Química). Universidade de São Paulo – USP, São Carlos, 2007.

MOHARRAM, M. A.; MAHMOUD, O. M. J. Appl. Polym. Sci.V.107, n.1, P.30-36, 2008.

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

NETO, W.P.F. et al. *Extraction and characterization of cellulose nanocrystals from agro-industrial residue – Soy hulls*. Industrial Crops and Products .,v.42,p. 480– 488, 2013.

NGUYEN, V. T. et al. *Characterization of cellulose production by a Gluconacetobacter xylinus strain from Kombucha*. Current Microbiology, v. 57, n. 5, p. 449–453, 2008.

ORELMA, H. *CMC-Modified Cellulose Biointerface for Antibody Conjugation*. Biomacromolecules. v. 13, n. 4, p. 1051-1058, 2012.

PEDREIRA, D. A. L. et al. *Neoskin development in the fetus with the use of a three-layer graft: an animal model for in utero closure of large skin defects*. Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine, v. 24, n. 10, p. 1243–1248, 2011.

PEREIRA, A.S.S. et al. *Improvement of polyvinyl alcohol properties by adding nanocrystalline cellulose isolated from banana pseudostems*. Carbohydrate Polymers v. 112, p. 165-172, 2014.

PIRICH, C.L. *Nanocristais de Celulose Bacteriana Carboxilados para Imobilização de Anticorpos e Desenvolvimento de Biossensores Pizoelétricos*. 2017.144f. Tese (Doutorado em Bioquímica). Universidade Federal do Paraná, Paraná, 2017.

PRADO, K. S., GONZALES, D., & SPINACÉ, M. A. S. *Recycling of viscose yarn waste through one-step extraction of nanocellulose*. International Journal of Biological Macromolecules, 136, 729–737, 2019.

RANGASWAMY, B. E.; VANITHA, K. P.; HUNGUND, Basavaraj S. *Microbial Cellulose Production from Bacteria Isolated from Rotten Fruit*. International Journal Of Polymer Science, [s.l.], v. 2015, p.1-8, 2015. Hindawi Limited. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1155/2015/280784>. Acesso: ago. 2019

RECOUVREUX, D.O.S. *Desenvolvimento de Novos Biomateriais Baseados em Celulose Bacteriana para Aplicações Biomédicas e de Engenharia de Tecidos*. 145f.Tese. (Doutorado em Engenharia Química) Universidade Federal de Santa Catarina, 2008.

SANCHEZ E OLIVEIRA, R. D. C. et al. *Biosynthetic cellulose induces the formation of a neoduramater following pre-natal correction of meningomyelocele in fetal sheep*. Acta cirúrgica brasileira / Sociedade Brasileira para Desenvolvimento Pesquisa em Cirurgia, v. 22, n. 3, p. 174–181, 2007.

SAMIR, A.S.A.; Alloin, F.; Dufresne, A. *Review of recent research into cellulosic whiskers, their properties and their application in nanocomposite field*. *Biomacromolecules*, 6, p.612-626, 2005.

SANTOS, D.B. *Propriedades Ópticas de suspensões coloidais e filmes à base de nanocelulose*. 2012. 83f. Dissertação (Mestrado em Química). Universidade Estadual Paulista, Araraquara-SP, 2012.

SANTOS, R.M. et al. *Cellulose nanocrystals from pineapple leaf, a new approach for the reuse of this agro-waste*. *Industrial Crops and Products*, v.50, p.707– 714, 2013.

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

SHEYKHNAZARI, S. et al. *Bacterial synthesized cellulose nanofibers; Effects of growth times and culture mediums on the structural characteristics*. *Carbohydrate Polymers*. v. 86, n. 3, p. 1187-1191, 2011.

SKOOG, D. A.; HOLLER F. J.; NIEMAN T. A. *Princípios de análise instrumental*. 5ed. 836 p. Porto Alegre: Bookman, 2002.

SIQUEIRA, G., BRAS, J., & DUFRESNE, A. (2009). *Cellulose whiskers versus microfibrils: Influence of the nature of the nanoparticle and its surface functionalization on the thermal and mechanical properties of nanocomposites*. *Biomacromolecules*, 10(2), 425–432, 2009.

SIQUEIRA, G.; Bras J.; Dufresne A. *Cellulosic Bionanocomposites: A Review of Preparation Properties and Applications*. *Polymer*, v.2, p. 728-765, 2013.

SMITH, K. D. *Metals Handbook: diffraction Methods*. London: John Willey, v.10, p.326-355, 1981.

SOUZA, L.; RECOUVREUX, D.O.S. *Nanocristais de celulose bacteriana a partir de hidrólise enzimática*. (Trabalho de Conclusão de Curso). Universidade Federal de Santa Catarina. Joinville- SC, 2016.

SILVA, D.; Almeida, M.L.O. *Nanocristais de Celulose*. *O Papel*, v.70(7), p.34-52, 2009.

SILVA, R. et al. *Aplicações de fibras lignocelulósicas na química de polímeros e em compósitos*. *Quim. Nova*, v.32, p.661-671, 2009.

ULLMAN, L. M. A. *Isolamento e visualização por AFM de microfibras do bagaço processado de Saccharum officinarum*. 2010. 54 fls. Relatório Técnico-Científico (Estágio) Universidade Federal de Pelotas, Campinas, 2010.

VILLARREAL-SOTO, S. A. et al. *Understanding Kombucha Tea Fermentation: A Review*. Journal of Food Science, v. 83, n. 3, p. 580–588, 2018.

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

YADAV, C.; MAJI, P. K. *Synergistic effect of cellulose nanofibres and bio- extracts for fabricating high strength sodium alginate based composite bio-sponges with antibacterial properties*. Carbohydrate Polymers, v. 203, p. 396–408, 2019.

YAMADA, Y.; HOSHINO, K.; ISHIKAWA, T. *The phylogeny of acetic acid bacteria based on the partial sequences of 16S ribosomal RNA: the elevation of the subgenus Gluconoacetobacter to the generic level*. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, v.61, n.8, p.1244-51, 1997.

YIM, Su Min; SONG, Ji Eun; KIM, Hye Rim. *Production and characterization of bacterial cellulose fabrics by nitrogen sources of tea and carbon sources of sugar*. Process Biochemistry, [s.l.], v. 59, p.26-36, ago. 2017. Elsevier BV. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2016.07.001>. Acesso: ago. 2019

WANG, Jing; TAVAKOLI, Javad; TANG, Youhong. *Bacterial cellulose production, properties and applications with different culture methods – A review*. Carbohydrate Polymers, [s.l.], v. 219, p.63-76, set. 2019. Elsevier BV. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.05.008>. Acesso: ago. 2019

WANG, J.; ZHU, Y.; DU, J. *Bacterial cellulose: a natural nanomaterial for biomedical applications*. Journal of Mechanics in Medicine and Biology, v. 11, n. 2, p. 285-306, 2011

WOEHL, M.F. *Bionanocompositos de Amido Plastificado com Glicerol reforçados com Nanofibras de Celulose Bacteriana*. 99f. Dissertação (Mestrado em Química). Universidade Federal do Paraná, Paraná, 2009.

WOEHL, M. A. et al. *Bionanocomposites of thermoplastic starch reinforced with bacterial cellulose nanofibres: Effect of enzymatic treatment on mechanical properties*. Carbohydrate Polymers, v. 80, p. 866-873, 2010.

ZUGENMAIER, P. *Conformation and packing of various crystalline cellulose fibers*. Progress in Polymer Science, v.26, p.1341-1417, 2001.

## **ANEXO**

### **Técnicas de caracterização**

#### **1.0 Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier - (FTIR)**

O conjunto de ondas eletromagnéticas que compreende todas as faixas de frequências é conhecido pelo espectro de radiação eletromagnética. Entende-se por ondas eletromagnéticas as oscilações provenientes de campos elétricos e magnéticos. Dessa forma, as frequências ou comprimento de ondas, explica as diferentes faixas correspondentes ao espectro eletromagnético (LEITE, PADRO, 2012)

Logo, um tipo de onda eletromagnética convencional, trata-se da luz visível, ou seja, identificada a olho nu. A luz visível, por sua vez, corresponde ao comprimento de onda numa faixa entre 400-730 nanômetros (nm) aproximadamente (LEITE, PRADRO, 2012)

Há, entretanto, outros tipos de ondas eletromagnéticas que não correspondem a faixa do visível, porém, podem ser determinados por outros instrumentos específicos. Como, por exemplo, a radiação no infravermelho, invisível a olho humano, que corresponde a comprimentos de onda entre 730-1.000.000 nm (LEITE, PADRO, 2012)

A formação das ondas eletromagnéticas ocorre pela mobilidade de cargas elétricas aceleradas, ou através de transições entre níveis discretos de energia, que podem ser de diferentes origens atômicas/moleculares: nucleares, eletrônicas, vibracionais e rotacionais. Desse modo, o espectro de emissão ou absorção para cada elemento químico apresenta um padrão específico, e utiliza-se esses espectros de emissão/absorção para identificar e mensurar os tipos de elementos químicos presentes em cada substância, análogo a uma impressão digital do elemento (LEITE, PADRO, 2012).

Segundo Prado e Leite (2012), as cargas elétricas existentes nos materiais podem sofrer oscilação, em virtude da radiação eletromagnética. Assim, um material é capaz de absorver ondas eletromagnéticas, quando esta perde energia ao mesmo.

Nesse sentido, destaca-se a técnica de espectroscopia de absorção no infravermelho com transformada de Fourier – FTIR, capaz de produzir espectros de absorção e/ou transmissão. Sua funcionalidade se dá pela incidência de um feixe de luz na região do infravermelho sobre a substância de interesse, determinando assim, a frequência ou comprimento de onda da radiação eletromagnética incidente absorvido (ou transmitido) pela mesma (LEITE, PRADO, 2012).

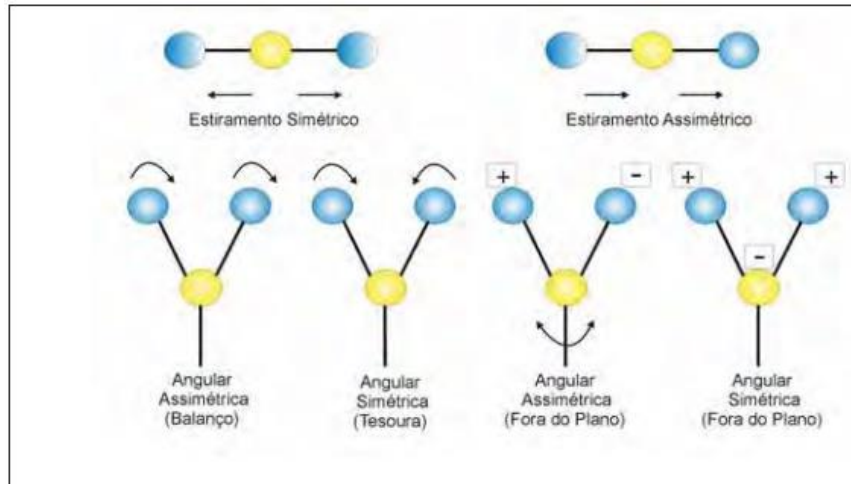
A técnica de FTIR é muito adotada para caracterizações, especialmente de compostos orgânicos e inorgânicos, nas quais utiliza-se a região do infravermelho médio  $4000\text{-}200\text{ cm}^{-1}$ , para análises (CAMARGO, 2016).

A absorção da radiação eletromagnética pelas amostras, permite que as moléculas constituintes apresentem movimentos vibracionais e rotacionais, direcionadas a um maior nível de energia. Apenas se a molécula em questão, sofrer variação de seu momento dipolar. Como há alguns compostos que não sofrem variações do momento dipolar, como  $\text{O}_2$ ,  $\text{Cl}_2$ ,  $\text{N}_2$ , estas são incapazes de absorver radiação infravermelho (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002; CAMARGO, 2016).

Nas moléculas diatômicas, as vibrações moleculares são classificadas como: vibrações axiais ou de estiramentos e vibrações angulares (CAMARGO, 2016).

Determina-se por vibração axial toda variação no comprimento do eixo de ligação nos átomos, que resulta num distanciamento interatômico. As vibrações angulares, por sua vez, estão associadas às alterações no ângulo de ligação da molécula. Tais vibrações axiais, apresentam-se no plano, ou fora do plano. Tanto o estiramento quanto as vibrações angulares podem ser classificadas como simétricas ou assimétricas (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002; CAMARGO, 2016), conforme a figura 36 abaixo

**Figura 36-** Modos vibracionais simétricos e assimétricos de uma molécula.



Fonte: Gonçalves, 2012.

Assim, através da técnica de FTIR pode-se obter a identificação dos principais grupos funcionais que compõe a amostra de interesse, por meio da verificação das frequências em que o material absorve radiação, variando a radiação incidente na faixa da radiação IR. Cada frequência em que ocorrer uma absorção irá corresponder a uma mudança de nível vibracional de uma molécula que compõe o material. (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002; CAMARGO, 2016; GOLÇALVES, 2012).

## 1.2 Difração de Raios X (DRX)

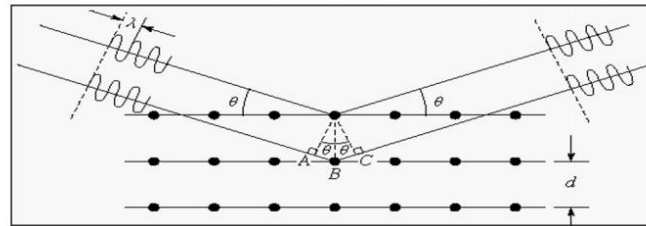
Outra técnica baseada na interação com a radiação eletromagnética é a difração de raios X.

Entende-se por difração, o fenômeno capaz de espalhar radiação eletromagnética a partir de centros de espalhamento, com comportamento periódico, os quais devem possuir espaçamentos de igual ordem de magnitude ao de comprimento de onda incidente. (SMITH, 1981 apud PIRICH, 2017).

A radiação eletromagnética quando difratada num material sólido, interfere com as ondas difratadas pelos diferentes centros espalhadores, comportando-se de forma construtiva e destrutiva em diferentes direções. As direções de ocorrência da interferência construtiva irão depender da estrutura cristalina da amostra. Mediante observação destes ângulos pode-se obter informações como o arranjo atômico e geometria interatômica do material. (PIRICH, 2017)

Tais informações, são cruciais para determinar quantitativamente dados a respeito da cristalinidade de materiais, assim como, dimensões dos cristalinos e/ou índice de cristalinidade da amostra. A figura 37, esquematiza o princípio de difração de raios-X sobre uma amostra com planos cristalinos (PIRICH, 2017).

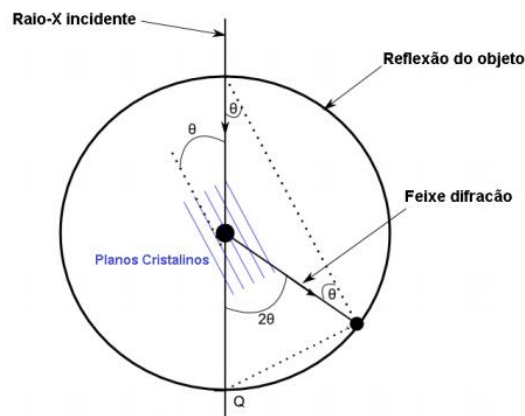
**Figura 37** Esquema de difração de raios-X em materiais com plano cristalino.



Fonte: Smith, 1981 apud Pirich, 2017.

O difratômetro de raios X é o equipamento responsável pela medida, que é formado por uma fonte de emissão de raio X e um detector posicionado sobre um braço giratório, capaz de indicar a sua posição (em graus) em relação à direção de incidência de um feixe de elétrons, que difratará ao incidir na amostra de interesse, fornecendo informações estruturais sobre a mesma (LENGOWSKI, 2013; SMITH, 1981; apud PIRICH, 2017). Um esquema está indicado na Figura 38.

**Figura 38-** Esquema operacional de um difratômetro na geometria Bragg-Brentano.



Fonte: Smith (1981) apud Pirich, 2017.

### 1.3 Microscopia de Força Atômica (AFM)

A técnica AFM destaca-se por envolver aplicações de estudos morfológicos da superfície de materiais, até suas propriedades estruturais e moleculares em escala nanométrica. Em 1986 os pesquisadores Binnig, Quate e Gerber inventaram o AFM,

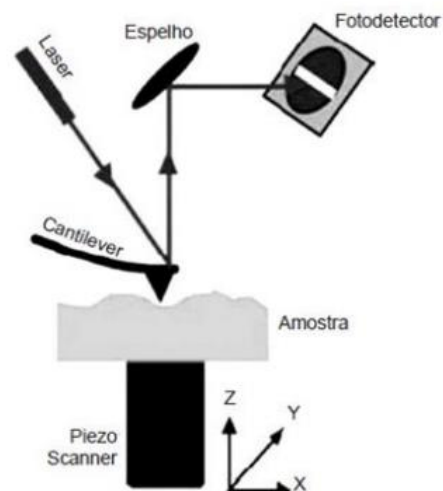


mas somente em 1989 foi comercialmente conhecido (DEDA et al., 2012; HERRMANN et al., 1997).

O microscópio de força atômica é um instrumento que detém ferramentas investigativas tanto de superfícies condutoras quanto isolantes em escala atômica, permitindo um preparo mais simples da amostra. Trata-se de uma técnica não destrutiva, ou seja, que não altera a morfologia nem as propriedades físico-químicas das amostras, sendo possível, inclusive, avaliar amostras em meio líquido. Essa técnica proporciona a varredura nas três dimensões (x, y e z) gerando a formação de imagens tridimensionais da superfície analisada. A profundidade de campo tem resolução no plano x-y entre 0,1 e 1,0 nm e no eixo z até 0,01 nm, o que determina uma resolução de ordem atômica (BRINCHI et al., 2013).

A obtenção das imagens morfológicas, ocorre por intermédio da varredura sobre a amostra, com o mecanismo representado na Figura 39. O microscópio dispõe de um sistema de posicionamento, com cerâmicas piezoelétricas, capazes de percorrerem a amostra nas três dimensões, x,y,z, com precisão de ângstrons. Nessa mesma varredura, há um sistema de alinhamento com feixe de laser que refletirá sobre o cantilever, sendo o sinal refletido captado por um fotodetector, que por sua vez enviará as informações de localização ao sistema de realimentação e controle, de modo a corrigir a posição do cantilever, garantindo assim, tanto seu contato com a amostra quanto a obtenção das imagens morfológicas (FERNANDES, FILHO, MORELLI, 2011).

**Figura 39-** Diagrama de funcionamento do AFM.



Fonte: Fernandes, Filho, Morelli, 2011.

A classificação dos tipos de modo que o AFM opera deve-se ao tipo de força que atua entre a ponta e a amostra. Se a força atuante é repulsiva (exclusão de Pauli) trata-se: modo contato; se for atrativa (van der Waals): modo não - contato. Caso o regime mantenha as forças repulsivas e atrativas, chama-se modo intermitente (ALESSANDRINI, FACCI, 2005).

#### **1.4 Microscopia de Varredura (MEV)**

Segundo a literatura, sabe-se que uma das formas convencionais mais antiga de se examinar algum material refere-se a microscopia ótica, com resolução máxima determinada pelo limite de difração do comprimento de onda da radiação incidente, com aumento máximo de 2000 vezes (DEDAVID, GOMES, MACHADO, 2007).

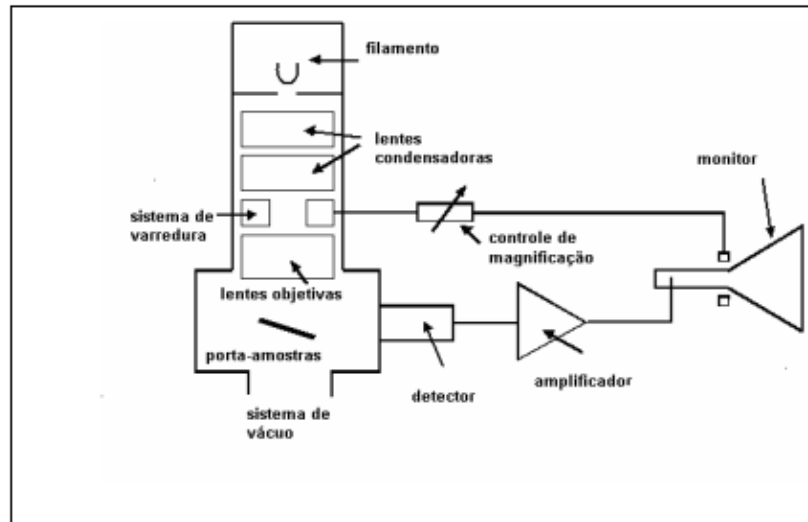
Nesse sentido, destaca-se a necessidade de técnicas que sejam capazes de apresentar maiores resoluções, os quais apresentem radiação cujo comprimento de onda deve ser menor que a luz visível para iluminação do material (KESTENBAC, 1994 apud DEDAVID, GOMES, MACHADO, 2007).

É nesse campo, que a microscopia eletrônica de varredura (MEV) se apresenta, como uma técnica versátil e de alta resolução (com valores de ordem 2 - 5nm), além de considerada profundidade de campo, capaz de traduzir informações morfológicas e composicionais de materiais em imagens microscópicas tridimensionais (NAGATANI et al., 1987; DEDAVID, GOMES, MACHADO, 2007).

A MEV tem sido amplamente empregada em diferentes áreas, como odontologia, ciência exatas e biológicas, geologia para análises de composições químicas, como também morfológica, especialmente para amostras sólidas. (DEDAVID, GOMES, MACHADO, 2007).

O funcionamento do microscópio ocorre mediante aplicação de um feixe elétrons com diâmetro pequeno, de modo a avaliar a superfície do material, ponto a ponto, e pelas repetições em linha, transmitindo o sinal do detector à tela catódica, cuja varredura se encontra em sincronia com o feixe incidente. O feixe deve ser direcionado para analisar a superfície da amostra, por uma malha retangular, pelo sistema de bobinas de deflexão, conforme esquematizado na Figura 40.

**Figura 40-** Desenho ilustrativo dos componentes básicos do MEV.



Fonte: Kestenbac, 1994 apud Dedavid, Gomes, Machado, 2007.

Assim, o sinal de imagem é resultante do contato do feixe de elétrons com a superfície da amostra. Logo, o sinal obtido do detector tem a função de controlar o brilho do monitor, permitindo a análise. A fonte de elétrons, normalmente utilizada, consiste em um filamento de tungstênio (W) aquecido, que trabalha com uma faixa de tensão entre 1 a 50kV. Com isso, devido à alta tensão existente entre o filamento e o ânodo, o feixe é acelerado.

Em seguida, o feixe é delineado sobre o material através de três lentes eletromagnéticas, com tamanho menor que 4 nm. Em contato com a amostra, o feixe é capaz de produzir elétrons e fótons, que são recebidos pelos detectores específicos e traduzidos num sinal de vídeo. Por fim, ao incidir sobre a amostra, há formação de um volume de interação do feixe primário que depende especificamente da tensão de aceleração e do número atômico, quando parte dos elétrons são separados. Por meio desse volume, os elétrons e ondas eletromagnéticas formados são responsáveis pela formação de imagens ou informações físico-químicas do material (DEDAVID, GOMES, MACHADO, 2007).

Embora, esta técnica proporcione análises minuciosas dos materiais, com menores comprimento de ondas, invisíveis a olho nu, ela requer certos tratamentos de superfícies da amostra, especialmente em amostras de caráter biológicas ou poliméricas, para de fato revelar as informações. O tratamento de superfície consiste transformar estas amostras em condutoras, impedindo que se acumule elétrons sobre a superfície, para evitar que estes dificultem a resolução das imagens. Com isso, o

tratamento ocorre pelo recobrimento da superfície, pela deposição de íons metálicos, ouro e platina, por exemplo, conhecido como metalização (CAMARGO, 2016).

### **1.5 Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS)**

A determinação quantitativa da composição química de um material, como interpretar quais elementos químicos ali se encontram presentes, pode ser obtida pela técnica de espectroscopia de energia dispersiva (EDS). O EDS tem sua funcionalidade por meio da medição de raios X específicos, sendo estes emitidos através de um substrato, que é bombardeado por feixes de elétrons.

A análise da técnica ocorre mediante formação dos espectrômetros de energia dispersiva, estes, recebem os raios-X enviados de dispositivos sólidos, geralmente, detectores de silício dopado com lítio, ou por detectores de germânio dopado com lítio. A determinação acontece devido os fótons atingirem o detector e ao promoverem a passagem dos elétrons de Si ou Ge, presentes na banda de valência para a banda de condução, resultam em alta condutividade. Logo, a carga elétrica é direcionada ao pré-amplificador, transformando-se em pulsos, onde são amplificados e por fim enviados a um analisador de multicanais, os quais formam espectros de energia. Há alguns elementos, como hidrogênio, lítio e berílio, que não são identificados pela técnica, em virtude de seu pequeno número atômico (GOLDSTEIN, 2003; CAMARGO, 2016).