

MARCO AURELIO WOEHL

BIONANOCOMPÓSITOS DE AMIDO PLASTIFICADO COM GLICEROL  
REFORÇADOS COM NANOFIBRAS DE CELULOSE BACTERIANA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. Fernando Wypych

Co-orientador: Prof. Dr. Luiz Pereira Ramos

CURITIBA

2009

*Para Édna e Lucas, que fazem tudo valer a pena.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pela oportunidade de viver aqui e agora.

Aos professores Fernando Wypych e Luiz Pereira Ramos, pela amizade, orientação e confiança.

Aos colegas do Laboratório de Química do Estado Sólido: Gregório, Rafael, Fábio, Leandro, Vanderléia, Ana, Antônio, Guimarães, Swami e Rubiane, pela amizade e sugestões preciosas.

Aos colegas do Laboratório de Fitobiomassa, em especial Ana Paula, Thiago, Fabiano, Arion e Claudiney pela amizade e auxílio nas análises.

A Alexandre Mikowski, pelo auxílio no processamento e interpretação dos ensaios mecânicos.

Ao Dr. João Carlos Moreschi, por me apresentar à celulose bacteriana, e à Membracel Produtos Tecnológicos Ltda. por fornecê-la.

A Profa. Dra. Maria Rita Sierakowski pelo fornecimento das amostras de amidos e pelas valiosas sugestões de utilização das mesmas.

A todos os professores do Departamento de Química que de uma maneira ou outra contribuíram para minha formação e para desenvolvimento deste trabalho.

À Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Química da UFPR e a todos os demais colaboradores do Programa.

A Carla Canestraro, pelas imagens de microscopia de força atômica.

A Valcineide Tanobe, pelo auxílio nas estimativas de cristalinidade da celulose.

À Capes, pelo auxílio financeiro.

A Julio, Patrícia, Nathália e Sophia, por me acolherem e me suportarem nesses dois anos; toda minha gratidão não é suficiente.

E finalmente, aos meus pais, Matias e Ivete, pelo apoio, incentivo, compreensão e amor depositados em mim desde sempre.

## RESUMO

Os nanocompósitos apresentam características muito distintas dos compósitos comuns. Vários tipos de materiais têm sido testados na produção de nanocompósitos. A procura por biodegradabilidade e redução de danos ambientais levou ao conceito de bionanocompósitos, nos quais tanto a matriz quanto o reforço nanoestruturado são de origem biológica. O objetivo deste trabalho é estudar amidos plastificados com glicerol e reforçados com nanofibras de celulose bacteriana visando a produção de bionanocompósitos com potenciais aplicações para substituição de polímeros de origem fóssil. Foram utilizadas celulose bacteriana obtida a partir de culturas de *Acetobacter xylinum*, amido de mandioca e glicerol P. A. Experimentos de desagregação mecânica da celulose foram conduzidos a fim de produzir nanofibras, mas não tiveram resultados satisfatórios. Partiu-se então para a desagregação por hidrólise enzimática parcial. Foram utilizadas preparações enzimáticas comerciais - com atividade enzimática completa - e provenientes de cepas recombinantes de *Trichoderma reesei* - com atividade endoglucanásica. A evolução das hidrólises foi acompanhada pela determinação dos açúcares redutores totais - método de Somogyi-Nelson - e por cromatografia líquida de alta eficiência. As nanofibras obtidas foram caracterizadas por difratometria de raios X, cromatografia de permeação em gel, microscopia eletrônica de varredura e microscopia de força atômica. Filmes de amido plastificado foram produzidos pelo processo de *casting*, com a incorporação de 2,5% de celulose não tratada e tratada por diferentes preparações enzimáticas e diferentes tempos de hidrólise. Os filmes obtidos foram acondicionados por 10 dias em umidade relativa de 43% e suas propriedades mecânicas, módulo de elasticidade e limite de resistência à tração, foram caracterizadas por ensaios de tração. Foi observada uma elevação em ambas as propriedades quando da incorporação da celulose bacteriana aos filmes. O melhor resultado foi obtido com celulose tratada com endoglucanases por 60 min, com aumento de quatro vezes do módulo de elasticidade e de duas vezes do limite de resistência à tração em relação ao filme com celulose não tratada. Foi observado, através de difratometria de raios X, que a presença de fibras induziu a formação de cristalinidade nos filmes, o que pode contribuir para a melhoria nas propriedades mecânicas. Micrografias eletrônicas de varredura dos filmes rompidos em ensaios de tração mostraram uma grande compatibilidade entre matriz e fibras e uma boa dispersão das mesmas. Micrografias eletrônicas das fibras mostraram alterações na sua morfologia que podem explicar a melhor dispersão das fibras parcialmente hidrolisadas na matriz polimérica, o que foi confirmado por microscopia de força atômica. As alterações no grau de polimerização das fibras durante as hidrólises sugerem um mecanismo de desagregação baseado no ataque às regiões menos organizadas entre as nanofibrilas da celulose.

Palavras-chave: bionanocompósitos. Celulose bacteriana. Amido plastificado.

## ABSTRACT

Nanocomposites show properties very different from ordinary composites. A great variety of materials has been tested for production of nanocomposites. The search for biodegradability and reduction of environmental impact lead to the concept of bionanocomposites, on which all components are from renewable source. The aim of this work is to study bionanocomposites based on thermoplastic starch and bacterial cellulose nanofibers. The bacterial cellulose was obtained from *Acetobacter xylinum* cultures. Cassava starch and glicerol were used for the production of thermoplastic starch films. Experiments involving mechanical disruption of the bacterial cellulose did not lead to satisfactory results. Instead, partial enzymatic hydrolysis of the cellulose was used in order to produce the nanofibers. Commercial cellulases – with complete enzymatic activity – and endoglucanases from recombinant strains of *Trichoderma reesei* were used in the hydrolysis. The thermoplastic starch films were combined with 2,5% of cellulose nanofibers (non treated and treated with different enzymes and varied hydrolysis periods).The films were conditioned for 10 days at 43% relative humidity and their mechanical properties – Young's modulus and tensile strength – where determined by tensile testing. Both mechanical properties where improved with the incorporation of fibers. The best results were obtained with nanofibers treated with endoglucanases for 60 min, the modulus increasing fourfold and the tensile strength doubling in relation to untreated fiber. X ray diffractometry of the films showed the development of starch crystallinity induced by the fibers, which may contribute to improve mechanical properties. Electron scanning microscopy of the disrupted films showed good adhesion between fiber and matrix and good dispersion of the nanofibers. Changes in fiber morphology, observed by means of electron scanning and atomic force microscopy, may also have contributed for that. Variations in the degree of polymerization in treated cellulose suggest a hydrolysis mechanism based on the attack of less organized regions between cellulose nanofibers.

Key words: Bionanocomposites. Bacterial cellulose. Thermoplastic starch.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 2.1 - MUTARROTAÇÃO DA GLUCOSE .....	17
FIGURA 2.2 - CELOBIOSE (a) E UDP-GLUCOSE (b).....	18
FIGURA 2.3 - BIOSÍNTESE DA CELULOSE .....	18
FIGURA 2.4 - ESTRUTURA DA CELULOSE. AS LINHAS PONTILHADAS REPRESENTAM LIGAÇÕES HIDROGÊNIO. (a) CADEIA MOLECULAR E LIGAÇÕES HIDROGÊNIO INTRAMOLECULARES. (b) LIGAÇÕES HIDROGÊNIO INTERMOLECULARES. (c) VISTA DA ESTRUTURA CRISTALINA AO LONGO DA CADEIA MOLECULAR.....	19
FIGURA 2.5 - ORGANIZAÇÃO DA CELULOSE EM VEGETAIS SUPERIORES: (a) FIBRILA ELEMENTAR; (b) CRISTALITO; (c) MICROFIBRILA; (d) PAREDE CELULAR (adaptado de RAMOS, 2003).....	20
FIGURA 2.6 - FORMAS ALOMÓRFICAS DA CELULOSE I (ZUGENMAIER, 2001).....	21
FIGURA 2.7 - MICROGRAFIA DA CELULOSE BACTERIANA OBTIDA POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO.....	21
FIGURA 2.8 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ESTRUTURA DA CELULOSE BACTERIANA (IGUCHI <i>et al.</i> , 2000).....	22
FIGURA 2.9 - MICROGRAFIAS ELETRÔNICAS DE VARREDURA DE (a) <i>WHISKERS</i> DE CELULOSE DE TUNICADO (SAMIR <i>et al.</i> , 2005) E (b) CELULOSE MICROFIBRILADA (ABE <i>et al.</i> , 2007).....	24
FIGURA 2.10 - MECANISMOS DE REAÇÃO DAS $\beta$ -1,4-GLUCANASES COM (A) RETENÇÃO E (B) INVERSÃO DA CONFIGURAÇÃO ANOMÉRICA. EM VERDE E AZUL, OS TERMINAIS DOS SÍTIOS CATALÍTICOS.....	26
FIGURA 2.11 - ESTRUTURA DE UMA CELOBIOHIDROLASE. EM DESTAQUE, À ESQUERDA, O DOMÍNIO CATALÍTICO, MOSTRANDO UMA CADEIA DE CELULOSE NO SEU INTERIOR. À DIREITA, ADSORÇÃO A UM CRISTALITO DE CELULOSE DO DOMÍNIO DE LIGAÇÃO AO SUBSTRATO, ATRAVÉS DOS TRÊS RESÍDUOS DE TIROSINA (SETAS).....	28
FIGURA 2.12 - ESTRUTURA DE UMA ENDOGLUCANASE, MOSTRANDO O DOMÍNIO CATALÍTICO EM FORMA DE FENDA (SETAS).....	28
FIGURA 2.13 - AÇÃO SINERGÍSTICA DO COMPLEXO CELULÁSICO DE <i>Trichoderma sp.</i> NA HIDRÓLISE DA CELULOSE.....	29
FIGURA 2.14 - ORGANIZAÇÃO ESTRUTURAL DO AMIDO. (A) AMIOSE; (B) AMILOPECTINA; (C), (D) E (E) EMPACOTAMENTO DAS CADEIAS DE AMILOPECTINA; (F) GRÂNULO DE AMIDO; (G) DUPLA HÉLICE DE AMILOPECTINA.....	32
FIGURA 2.15 - APLICAÇÕES DO AMIDO DE MANDIOCA (MATTOS e CARDOSO, 2003).....	33

FIGURA 2.16 - INTERAÇÕES ENTRE OS COMPONENTES DOS FILMES – (a) EFEITO ANTIPLASTIFICANTE DO GLICEROL EM BAIXA CONCENTRAÇÃO; (b) EFEITO PLASTIFICANTE DO GLICEROL E INTERAÇÃO COM AS CADEIAS DO AMIDO; (c) SEGREGAÇÃO DO GLICEROL EM EXCESSO; (d) RETROGRADAÇÃO DA AMILOSE DURANTE O ENVELHECIMENTO DO FILME; (e) TRANSCRISTALINIDADE DA AMILOPECTINA, INDUZIDA PELA PRESENÇA DE NANOFIBRAS DE CELULOSE; (f) ACÚMULO DE GLICEROL EM EXCESSO NA INTERFACE ENTRE AMIDO E NANOFIBRAS.....	37
FIGURA 2.17 - FORMAÇÃO DE REDE DE NANOFIBRAS EM COMPÓSITOS PREPARADOS POR <i>CASTING</i> (SAMIR <i>et al.</i> , 2005).....	38
FIGURA 2.18 - DISCORDÂNCIA E CONTORNO DE GRÃO EM UM MATERIAL POLICRISTALINO (CALLISTER, 2006).....	39
FIGURA 2.19 - PROPAGAÇÃO DE FRATURAS EM UM NANOCOMPÓSITO. $\sigma$ INDICA O SENTIDO DA TENSÃO APLICADA (TJONG, 2006).....	41
FIGURA 2.20 - ENSAIO DE FLEXÃO REALIZADO NO COMPÓSITO CELULOSE-RESINA EPÓXI E ESPECTRO RAMAN ANTES (LINHA CONTÍNUA) E DURANTE A FLEXÃO (LINHA PONTILHADA) A FLEXÃO (STURCOVA <i>et al.</i> , 2005).....	42
FIGURA 3.1 - REAÇÃO DE AÇÚCARES REDUTORES COM O DNS (MARTINS, 2005).....	46
FIGURA 3.2 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA OBTENÇÃO DAS FIBRAS POR HIDRÓLISE ENZIMÁTICA.....	49
FIGURA 3.3 - REAÇÃO DE CARBANILAÇÃO DA CELULOSE.....	52
FIGURA 3.4 - OBTENÇÃO DOS FILMES DE NANOCOMPÓSITO POR <i>CASTING</i> .....	54
FIGURA 4.1 - PERFIL CROMATOGRÁFICO DO HIDROLISADO DE KLASON DA CELULOSE BACTERIANA, COM DETECÇÃO POR REFRACTOMETRIA DIFERENCIAL E ABSORÇÃO NO UV EM 280 nm.....	58
FIGURA 4.2 - REAÇÃO DE HIDRÓLISE ÁCIDA DA CELULOSE.....	58
FIGURA 4.3 - REAÇÃO DE DESIDRATAÇÃO DA GLUCOSE.....	58
FIGURA 4.4 - DIFRATOGRAMAS DE RAIOS X DO AMIDO MANDIOCA NATIVO (a) E PRÉ-GELATINIZADO INDUSTRIALMENTE (b).....	59
FIGURA 4.5 - SUSPENSÃO RESULTANTE DA MOAGEM DA CELULOSE BACTERIANA EM MOINHO DE BOLAS. (a) PRIMEIRA MOAGEM; (b) SEGUNDA MOAGEM	62
FIGURA 4.6 - PROCESSO DE SECAGEM DA CELULOSE. EM CINZA: INTERIOR DAS FIBRAS. EM VERMELHO: LIGAÇÕES HIDROGÊNIO (adaptado de FENGEL e WEGENER, 1989).....	63
FIGURA 4.7 - AÇÃO DAS ENZIMAS SOBRE A CELULOSE BACTERIANA.....	64
FIGURA 4.8 - AÇÚCARES REDUTORES TOTAIS (ART) GERADOS PELA HIDRÓLISE DA CELULOSE.....	65
FIGURA 4.9 - PERFIS CROMATOGRÁFICOS DAS PREPARAÇÕES ENZIMÁTICAS E DA SOLUÇÃO-TAMPÃO UTILIZADA NAS HIDRÓLISES.....	65
FIGURA 4.10 - PERFIS CROMATOGRÁFICOS DOS HIDROLISADOS OBTIDOS PELA AÇÃO DA MISTURA CN SOBRE A CELULOSE BACTERIANA. (a) CELOBIOSE; (b) ÁCIDO CÍTRICO; (c) GLUCOSE; (d) CONSERVANTE DA ENZIMA.....	67
FIGURA 4.11 - PERFIS CROMATOGRÁFICOS DOS HIDROLISADOS OBTIDOS PELA AÇÃO DA CBH I/II- SOBRE A CELULOSE BACTERIANA. (a) CELOBIOSE; (b) ÁCIDO CÍTRICO; (c) GLUCOSE; (d) CONSERVANTE DA ENZIMA.....	67
FIGURA 4.12 - FILMES DE AMIDO DE (a) MANDIOCA E (b) MILHO, PLASTIFICADOS COM GLICEROL.....	69
FIGURA 4.13 - FILMES DE AMIDO DE MANDIOCA MODIFICADO PLASTIFICADOS COM 30% DE GLICEROL A FRIO (a) E A QUENTE (b).....	70

- FIGURA 4.14 - DIFRATOGRAMAS DE RAIOS X DO AMIDO DE MANDIOCA E DE SEUS FILMES. (a) AMIDO DE MANDIOCA. (b) FILME PLASTIFICADO COM 30% DE GLICEROL. (c) MESMO FILME APÓS ACONDICIONAMENTO EM UMIDADE RELATIVA DE 43%. (d) A (f): FILMES REFORÇADOS COM 2,5% DE CELULOSE BACTERIANA (d) TRATADA COM CBH I/II- POR 60 min, (e) SEM TRATAMENTO ENZIMÁTICO E (f) TRATADA COM MISTURA CN POR 20 min. AS LINHAS PONTILHADAS REPRESENTAM PICOS DE CRISTALINIDADE ASSOCIADOS AO AMIDO; AS LINHAS TRACEJADAS (\*)72 INDICAM PICOS CARACTERÍSTICOS DA CELULOSE.....
- FIGURA 4.15 - INTERAÇÕES ENTRE OS COMPONENTES DOS FILMES..... 73
- FIGURA 4.16 - CURVAS TENSÃO/DEFORMAÇÃO TÍPICAS DOS FILMES DE AMIDO PLASTIFICADO SEM REFORÇO E REFORÇADOS COM CELULOSE74 BACTERIANA.....
- FIGURA 4.17 - PROPRIEDADES MECÂNICAS DE FILMES REFORÇADOS COM CELULOSE74 TRATADA COM MISTURA CN ( $\Delta$ ) E COM CBH I/II- ( $\square$ ).....
- FIGURA 4.18 - CURVAS TÍPICAS DE TENSÃO X DEFORMAÇÃO DOS COMPOSTOS75 ACONDICIONADOS POR 10 DIAS EM UMIDADE RELATIVA DE 43%.....
- FIGURA 4.19 - PROPRIEDADES MECÂNICAS DE FILMES REFORÇADOS COM 2,5% DE CELULOSE TRATADA COM ENDOGLUCANASE, ACONDICIONADOS EM76 UMIDADE RELATIVA DE 43%.....
- FIGURA 4.20 - CORPOS DE PROVA SUBMETIDOS A ENSAIO DE TRAÇÃO ATÉ A RUPTURA. FILMES DE AMIDO PLASTIFICADO COM 30% DE GLICEROL: (a) SEM REFORÇO; (b) COM 2,5% DE CELULOSE NÃO TRATADA; (b) E (c): COM 2,5% DE CELULOSE TRATADA COM CBH I/II- POR 60 E 120 min,77 RESPECTIVAMENTE.....
- FIGURA 4.21 - FOTOMICROGRAFIAS DE FILMES (a) SEM REFORÇO, (b) COM CELULOSE NÃO TRATADA E (c) COM CELULOSE TRATADA COM ENDOGLUCANASE POR 60 MINUTOS. AS SETAS INDICAM A DIREÇÃO DA TENSÃO77 APLICADA. AMPLIAÇÃO DE 50x.....
- FIGURA 4.22 - MICROGRAFIAS ELETRÔNICAS DE VARREDURA DA REGIÃO DE RUPTURA DOS FILMES SEM REFORÇO (a, b), COM REFORÇO DE CELULOSE NÃO HIDROLISADA (c, d) E HIDROLISADA COM CBHI/II- POR 60 MINUTOS (e, f). AS SETAS INDICAM PROJEÇÕES DOS FILMES79 RESULTANTES DA TRAÇÃO.....
- FIGURA 4.23 - (a) DIFRATOGRAMA DA CELULOSE BACTERIANA NÃO-TRATADA. A ÁREA HACHURADA CORRESPONDE AO HALO AMORFO. (b) PICOS RESULTANTES DA DECONVOLUÇÃO DO MESMO DIFRATOGRAMA. A INDEXAÇÃO DOS PICOS SEGUE ELAZZOUI-HAFRAOUI *et al.* (2008) e81 KLECHKOVSKAYA *et al.* (2003).....
- FIGURA 4.24 - DIFRATOGRAMAS DE RAIOS X DE CELULOSE (a) NÃO TRATADA E81 TRATADA COM (b) MISTURA CN E (c) CBHI/II-.....
- FIGURA 4.25 - IMAGENS DE MEV DAS FIBRAS DE CELULOSE BACTERIANA NÃO TRATADA (a,b), TRATADA COM CBHI/II- POR 60 MINUTOS (c,d) E COM84 MISTURA CN POR 80 MINUTOS (e,f).....
- FIGURA 4.26 - MICROGRAFIAS DE FORÇA ATÔMICA DA CELULOSE BACTERIANA NÃO85 TRATADA (a) E TRATADA COM CBH I/II- POR 60 MINUTOS (b).....
- FIGURA 4.27 - MICROGRAFIAS DE FORÇA ATÔMICA DE CELULOSE NÃO TRATADA (ACIMA) E TRATADA COM CBH I/II- POR 60 min (ABAIXO), ACOMPANHADAS DE SEUS RESPECTIVOS PERFIS..... 86
- FIGURA 4.28 - MICROGRAFIA DE FORÇA ATÔMICA DA CELULOSE BACTERIANA NÃO86 TRATADA, PROCESSADA DE FORMA A MOSTRAR SEU RELEVO.....
- FIGURA 4.29 - CROMATOGRAMAS DE PERMEAÇÃO EM GEL DOS TRICARBANILATOS DE CELULOSE OBTIDOS A PARTIR DE AMOSTRAS PARCIALMENTE88 HIDROLISADAS COM MISTURA CN.....
- FIGURA 4.30 - CROMATOGRAMAS DE PERMEAÇÃO EM GEL DOS TRICARBANILATOS89 DE CELULOSE OBTIDOS A PARTIR DE AMOSTRAS PARCIALMENTE

HIDROLISADAS COM CBH I/II-.....

## LISTA DE TABELAS

- TABELA 2.1 - COMPOSIÇÃO DA RAIZ DE MANDIOCA E DO AMIDO RESULTANTE DA33  
MESMA, EXPRESSA EM % DE MATÉRIA SECA (FRANCO *et al.*, 2002) .....
- TABELA 4.1 - TEOR DE CELULOSE DAS MANTAS, EXPRESSO EM RELAÇÃO À MASSA58  
SECA TOTAL .....
- TABELA 4.2 - TEOR DE CELOBIOSE E GLUCOSE PRESENTES NOS HIDROLISADOS E68  
CONVERSÃO DA CELULOSE BACTERIANA .....
- TABELA 4.3 - ÍNDICE DE CRISTALINIDADE ( $I_c$ ) DA CELULOSE NÃO TRATADA82  
(CONTROLE), TRATADA COM MISTURA CN E COM CBH I/II-.....
- TABELA 4.4 - ESTIMATIVA DAS DIMENSÕES DOS CRISTALITOS DE CELULOSE82  
SUBMETIDA A DIFERENTES TRATAMENTOS ENZIMÁTICOS .....
- TABELA 4.5 - MÉDIA PONDERADA DO GRAU DE POLIMERIZAÇÃO ( $DP_w$ ), MÉDIA  
ARITMÉTICA DO GRAU DE POLIMERIZAÇÃO ( $DP_n$ ) E PÓLIDISPERSIVIDADE87  
( $DP_w/DP_n$ ) DA CELULOSE TRATADA COM MISTURA CN .....
- TABELA 4.6 - MÉDIA PONDERADA DO GRAU DE POLIMERIZAÇÃO ( $DP_w$ ), MÉDIA  
ARITMÉTICA DO GRAU DE POLIMERIZAÇÃO ( $DP_n$ ) E PÓLIDISPERSIVIDADE88  
( $DP_w/DP_n$ ) DA CELULOSE TRATADA COM CBH I/II- .....

## LISTA DE SIGLAS

- AFM - microscopia de força atômica
- CBH - celobiohidrolase
- CMC - carboximetilcelulose
- DNS - ácido 3,5-dinitro-salicílico
- DP - grau de polimerização
- EG - endoglucanase
- HMF - hidroximetilfurfural
- HPLC - cromatografia líquida de alta eficiência
- SEM - microscopia eletrônica de varredura
- TC - complexo terminal
- THF - tetrahidrofurano
- UDP - uridina-difosfato
- UFP - unidades de papel de filtro
- UV - espectrofotometria de absorção no ultravioleta
- XRD - difratometria de raios X

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	14
1.1 OBJETIVO GERAL .....	15
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	15
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	16
2.1 CELULOSE E AMIDO .....	16
2.1.1 Celulose .....	17
2.1.1.1 Celulose bacteriana .....	21
2.1.1.2 Celulose microfibrilada e nanocristais de celulose .....	23
2.1.1.3 Hidrólise ácida da celulose .....	24
2.1.1.4 Hidrólise enzimática da celulose .....	25
2.1.1.5 Complexo celulásico de <i>Trichoderma reesei</i> .....	27
2.1.1.6 Vantagens da hidrólise enzimática sobre a hidrólise ácida.....	29
2.1.2 Amido .....	31
2.1.2.1 Amido de mandioca .....	33
2.1.2.2 Amido termoplástico .....	34
2.1.3 Bionanocompósitos de amido e celulose .....	35
2.1.4 Efeitos de escala nas propriedades mecânicas.....	38
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	43
3.1 CELULOSE BACTERIANA .....	43
3.1.1 Determinação do teor de matéria seca da celulose .....	43
3.1.2 Determinação do teor de celulose no material seco .....	43
3.2 AMIDOS .....	44
3.3 PREPARAÇÕES ENZIMÁTICAS .....	45
3.3.1 Determinação das atividades das preparações enzimáticas .....	45
3.3.2 Teor de proteínas das preparações enzimáticas .....	47
3.4 DESAGREGAÇÃO MECÂNICA DA CELULOSE .....	46
3.5 DESAGREGAÇÃO ENZIMÁTICA DA CELULOSE .....	48
3.5.1 Acompanhamento da evolução das hidrólises .....	49
3.5.1.1 Determinação do poder redutor total dos hidrolisados .....	49
3.5.1.2 Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) .....	50
3.6 CARACTERIZAÇÃO DAS FIBRAS OBTIDAS .....	50
3.6.1 Difractometria de raios X (XRD) .....	50
3.6.2 Determinação da distribuição de massas moleculares da celulose .....	51
3.6.3 Microscopia eletrônica de varredura .....	53
3.6.4 Microscopia de força atômica .....	53
3.7 OBTENÇÃO DOS FILMES DE AMIDO PLASTIFICADO .....	53
3.8 CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES OBTIDOS .....	55
3.8.1 Preparo e acondicionamento dos corpos de prova .....	55
3.8.2 Ensaio de tração .....	55
3.8.3 Difractometria de raios X .....	55
3.8.4 Microscopia óptica e eletrônica de varredura .....	56
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	56
4.1 CARACTERIZAÇÃO DOS MATERIAIS UTILIZADOS .....	57
4.1.1 Celulose bacteriana .....	57
4.1.2 Amidos .....	59
4.1.3 Preparações enzimáticas .....	59
4.2 DESAGREGAÇÃO DA CELULOSE BACTERIANA .....	61
4.2.1 Desagregação mecânica .....	61
4.2.2 Desagregação enzimática .....	63
4.3 FILMES DE AMIDO PLASTIFICADO .....	68
4.4 PRODUÇÃO DOS COMPÓSITOS .....	70
4.5 PROPRIEDADES MECÂNICAS DOS COMPÓSITOS .....	73

4.6 MORFOLOGIA DOS FILMES .....	76
4.7 ALTERAÇÕES NA CELULOSE APÓS A HIDRÓLISE ENZIMÁTICA .....	80
4.7.1 Índice de cristalinidade .....	80
4.7.2 Micrografias eletrônicas de varredura .....	82
4.7.3 Micrografias de força atômica .....	83
4.7.4 Grau de polimerização .....	87
<b>5 CONCLUSÃO .....</b>	<b>90</b>
<b>6 TRABALHOS FUTUROS.....</b>	<b>92</b>
<b>7 TRABALHOS PUBLICADOS OU EM ELABORAÇÃO.....</b>	<b>93</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>94</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Desde a descoberta, no início da década de 1990, de que a dispersão de nanopartículas de um argilomineral em uma matriz polimérica melhora significativamente as propriedades mecânicas do material (USUKI *et al.*, 1990), teve início uma grande procura pelos chamados nanocompósitos, ou seja, compósitos nos quais ao menos uma das fases apresenta-se com pelo menos uma das dimensões nanométrica. A presença de uma fase constituída de nanopartículas ou nanofibras confere a esses materiais características muito distintas daquelas dos compósitos em que os componentes se apresentam em dimensões da ordem de micrômetros ou maiores.

Vários tipos de materiais, tanto orgânicos quanto inorgânicos, têm sido testados na produção de nanocompósitos. Entre eles, podemos citar os argilominerais (USUKI *et al.*, 1990; WILHELM *et al.*, 2003; CHEN *et al.*, 2005) e as fibras celulósicas obtidas a partir de vegetais (STAEL *et al.*, 2001; ORTS *et al.*, 2005; MALAININE *et al.*, 2005). Estas últimas recebem atenção especial por serem biodegradáveis e renováveis, tendo menor impacto no ambiente do que suas contrapartidas sintéticas (YU *et al.*, 2006).

A procura por biodegradabilidade e redução dos danos ambientais provocados por polímeros de origem fóssil levou a reconsiderações sobre as próprias matrizes poliméricas utilizadas naqueles compósitos. O conceito de bionanocompósito – material no qual tanto a matriz quanto o reforço nanoestruturado são de origem biológica (SIMONSEN, 2007) – levou à pesquisa com polímeros como os polilactatos e o poli(hidroxibutirato) (YU *et al.*, 2006). Outro polímero que despertou um interesse considerável como matriz de biocompósitos é o amido, devido a sua facilidade de obtenção a baixo custo e à possibilidade de ser plastificado e processado através de métodos convencionais, aplicados a polímeros sintéticos (CHEN e EVANS, 2005; ÀNGLES e DUFRESNE, 2000, 2001; AVÉROUS *et al.*, 2001; MATHEW e DUFRESNE, 2002).

O presente trabalho segue a linha apresentada acima. São investigadas formas de se produzir nanofibras de celulose e de agregá-las a uma matriz polimérica de amido plastificado. Atenção especial foi dada às propriedades mecânicas dos compósitos obtidos, uma vez que uma das barreiras à utilização do

amido em substituição aos polímeros de origem fóssil é justamente seu baixo desempenho mecânico. A opção pela celulose bacteriana em conjunto com amido de mandioca dá ao trabalho características diferenciadas dos demais citados acima.

O uso de hidrólise enzimática na produção de nanofibras de celulose tem sido muito menos explorado do que a hidrólise ácida. Além disso, o Departamento de Química da UFPR possui *know how* tanto em hidrólise enzimática (ZANDONÁ Filho, 2001; MARTINS, 2005) quanto em produção de nanocompósitos (WILHELM *et al.*, 2003). Não apenas as propriedades mecânicas das nanofibras obtidas foram consideradas importantes, mas também a investigação dos motivos pelos quais essas nanofibras apresentam um desempenho mecânico superior quando comparado às fibras celulósicas não submetidas a tratamentos enzimáticos.

## 1.1 OBJETIVO GERAL

Estudar amidos plastificados com glicerol e reforçados com nanofibras de celulose no intuito de gerar materiais bionanocompósitos com potenciais aplicações na substituição de polímeros de origem fóssil.

## 1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- i) Obter nanofibras de celulose a partir de celulose bacteriana; caracterizar as nanofibras obtidas.
- ii) Obter bionanocompósitos – filmes poliméricos de amido plastificado glicerol, reforçados com as nanofibras de celulose.
- iii) Caracterizar e realizar ensaios mecânicos nos filmes obtidos.
- iv) Investigar a relação entre os tratamentos a que a celulose foi submetida e as propriedades mecânicas dos filmes.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 CELULOSE E AMIDO

A celulose e o amido estão entre os biopolímeros mais importantes tanto em abundância quanto em possibilidades de utilização. Apesar de serem ambos polímeros de condensação da D-glucose, diferenças estruturais fazem com que suas propriedades sejam muito diferentes.

A principal função da celulose, em organismos pluricelulares, é estrutural. É o biopolímero de maior ocorrência natural, sendo produzida por uma grande variedade de organismos, como bactérias, algas, animais marinhos (tunicados) e vegetais superiores (MATHEW e DUFRESNE, 2002; RAMOS, 2000). Estima-se que sua disponibilidade total na biosfera seja da ordem de 20 a  $30 \cdot 10^{10}$  t (FENGEL e WEGENER, 1989). O amido é, depois da celulose, a substância produzida em maior quantidade pelas plantas, possuindo função de reserva. É responsável por 70 a 80% das calorias consumidas por humanos em todo o mundo (FREITAS, 2003).

O fato de a glucose originar duas das mais importantes substâncias de origem biológica não é fortuito. Resulta da conformação excepcionalmente estável assumida pela D-glucose em sua forma cíclica, a D-glucopiranosose. As hidroxilas ligadas ao anel hemiacetálico encontram-se em posição equatorial em relação ao plano do anel (Fig. 2.1, esquerda). Substituintes em posição axial geram tensões que podem constituir fatores de instabilidade conformacional (SOLOMONS, 1996).

O carbono que possui propriedades redutoras em um carboidrato é denominado **carbono anomérico**. Em meio aquoso, o anel hemiacetálico pode abrir e fechar na posição do carbono anomérico (C-1), gerando dois isômeros de posição (anômeros). O **anômero  $\alpha$**  apresenta um grupamento hidroxílico axial em C-1, enquanto a hidroxila do **anômero  $\beta$**  é equatorial. O equilíbrio dessas duas formas em solução é denominado **mutarrotação** (Fig. 2.1).

As duas conformações da forma cíclica da glucose são fundamentais para compreender as diferenças estruturais entre o amido e a celulose. A ligação química resultante da condensação de duas moléculas de monossacarídeo é denominada **ligação glicosídica** e ocorre pela reação entre os grupos hidroxila das duas moléculas, com eliminação de uma molécula de água. A conformação original dos

grupos hidroxila envolvidos na reação determinará a estereoquímica da ligação glicosídica e, conseqüentemente, de toda a molécula.

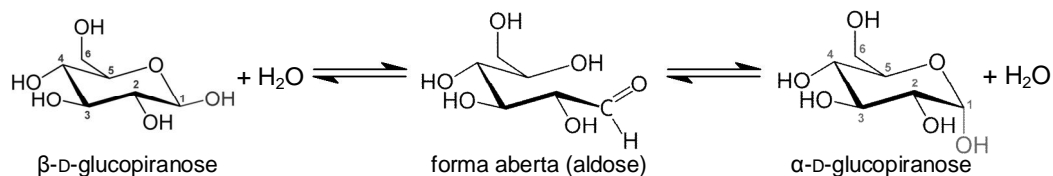


FIGURA 2.1 – MUTARROTAÇÃO DA GLUCOSE

### 2.1.1 Celulose

A celulose é um homopolissacarídeo linear que consiste em unidades de glicose (D-glicopiranosose) ligadas por ligações glicosídicas  $\beta(1-4)$ . Nesta ligação, a hidroxila em C-1 (o carbono anomérico) de uma molécula de glicose está na conformação  $\beta$  e reage com a hidroxila em C-4 da segunda molécula.

O tamanho da molécula de celulose é normalmente expresso em termos do seu grau de polimerização (DP), ou seja, o número de unidades de anidroglicose presentes numa cadeia. No entanto, a análise conformacional da celulose indica que a celobiose (4-O- $\alpha$ -D-glicopiranosil- $\alpha$ -D-glicopiranosose, Fig. 2.2a) é sua unidade estrutural básica (FENGEL e WEGENER, 1989).

A conformação da unidade de repetição da celulose pode ser explicada se levarmos em conta o modelo de biossíntese da glicose proposto por KOYAMA *et al.* (1997). O sítio ativo da enzima celulose sintase, responsável pela síntese da celulose, contém dois sítios consecutivos de ligação ao precursor uridina-difosfato-glicose (UDP-glicose, Fig. 2.2b), posicionados a  $180^\circ$  um do outro, além de um sítio de ligação à extremidade não-redutora da  $\beta$ -glucana (Fig. 2.3). As hidroxilas em C-5 dos resíduos de glicose ligados a esses sítios são ativadas por um mecanismo de catálise básica geral, promovendo a defosforilação das unidades de UDP-glicose e o estabelecimento de novas ligações  $\beta(1-4)$ . A  $\beta$ -glucana resultante, tendo pouca afinidade com os sítios de ligação à UDP-glicose, desloca-se para uma região mais favorável, o sítio de ligação à  $\beta$ -glucana. Duas novas unidades de UDP-glicose podem então ser adicionadas, prosseguindo a síntese.

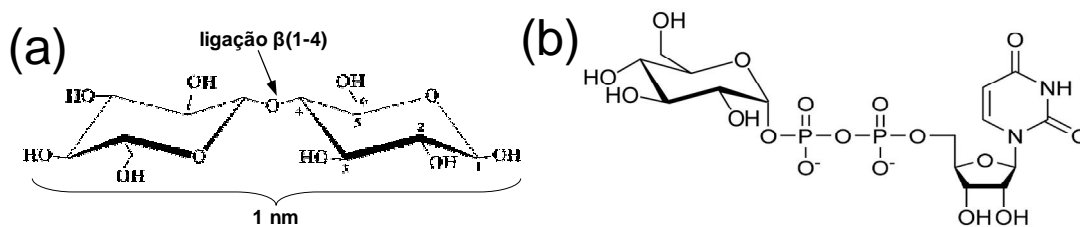


FIGURA 2.2 – CELOBIOSE (a) E UDP-GLUCOSE (b)

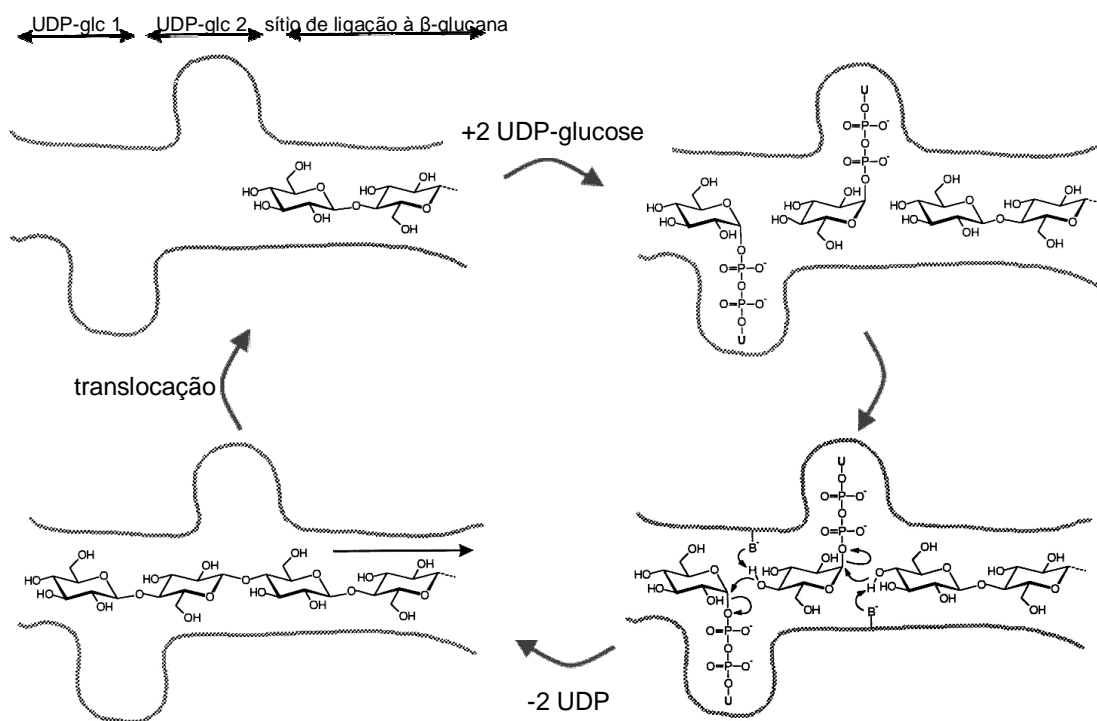


FIGURA 2.3 – BIODISSÍNTESE DA CELULOSE (adaptado de KOYAMA *et al.*, 1997)

As hidroxilas presentes na estrutura da celulose encontram-se distribuídas equatorialmente, numa disposição *quasi*-planar que permite a formação de uma cadeia linear (Fig. 2.4a), na qual as cadeias adjacentes encontram-se alinhadas formando estruturas cristalinas estabilizadas por ligações de hidrogênio inter e intramoleculares (Fig. 2.4a, b) (ZUGENMAIER, 2001; RAMOS, 2000; FENGEL e WEGENER, 1989). Essas ligações resultam numa estrutura cristalina compacta e extremamente estável (Fig. 2.4c), possuindo caráter hidrofílico em sua superfície, porém hidrofóbico no seu interior, o que torna a celulose insolúvel em água. Limitações termodinâmicas no crescimento dessas estruturas fazem com que

ocorram, alternadas a essas regiões cristalinas, regiões amorfas onde as moléculas encontram-se distribuídas ao acaso (RAMOS, 2000).

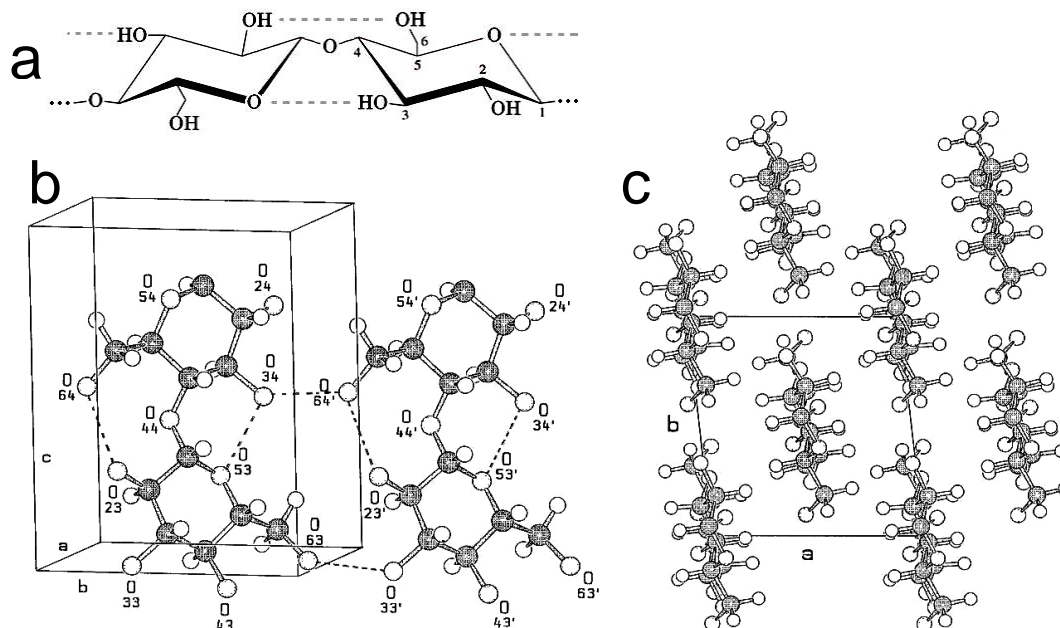


FIGURA 2.4 – ESTRUTURA DA CELULOSE. AS LINHAS PONTILHADAS REPRESENTAM LIGAÇÕES HIDROGÊNIO. (a) CADEIA MOLECULAR E LIGAÇÕES HIDROGÊNIO INTRAMOLECULARES. (b) LIGAÇÕES HIDROGÊNIO INTERMOLECULARES. (c) VISTA DA ESTRUTURA CRISTALINA AO LONGO DA CADEIA MOLECULAR (adaptado de ZUGENMAIER, 2001)

A estrutura cristalina da celulose pode ser representada esquematicamente pela associação ordenada de **fibrilas elementares** (Fig. 2.5a), cuja espessura varia de 2 a 6 nm dependendo de sua origem e da metodologia usada para sua extração. Essas fibrilas associam-se em **cristalitos** (Fig. 2.5b) cuja seção transversal pode chegar a 12 nm. Nos vegetais superiores, tais cristalitos encontram-se envoltos numa matriz de lignina, sendo que hemiceluloses compatibilizam as duas fases dessa estrutura conhecida como **microfibrila** (Fig. 2.5c) (RAMOS, 2003).

A celulose pode se apresentar em várias formas alomórficas. Na celulose nativa, denominada celulose I, as cadeias encontram-se arranjadas em um empacotamento paralelo. Já na celulose mercerizada (celulose II), regenerada a partir de um tratamento alcalino, o arranjo das cadeias é antiparalelo. O tratamento com amônia líquida origina a celulose III. O tratamento térmico da celulose III dá origem à celulose IV, que pode ser convertida na celulose original (ZUGENMAIER, 2001). Em 1984, Atalla e Vanderhart, a partir de estudos de ressonância magnética nuclear de

carbono-13 ( $^{13}\text{C}$  NMR), identificaram na celulose nativa dois alomorfos, as celulosas  $I_{\alpha}$ , de empacotamento triclínico, e a  $I_{\beta}$ , monoclínica (Fig. 2.6). A diferença entre as duas é explicada em termos das ligações hidrogênio intermoleculares. A forma  $I_{\alpha}$  predomina em algas e bactérias e é menos estável termodinamicamente, podendo ser convertida em  $I_{\beta}$  por tratamento térmico a alta pressão. Nos vegetais superiores, predomina a celulose  $I_{\beta}$ . A tunicina (celulose de tunicados) é celulose  $I_{\beta}$  praticamente pura (HORII, 2001).

O DP da celulose varia amplamente, indo de 2.400 em algumas plantas, como o equiseto (*Equisetum arvense*), até 15.300 na fibra de algodão (*Gossypium*) não tratada. Processos industriais de tratamento reduzem esses valores: a celulose de madeira pode ter um DP em torno de 10.000, enquanto o DP a polpa kraft branqueada fica abaixo de 1.000 (FENGEL e WEGENER, 1989; RAMOS, 2003; SJÖSTRÖM, 1993).

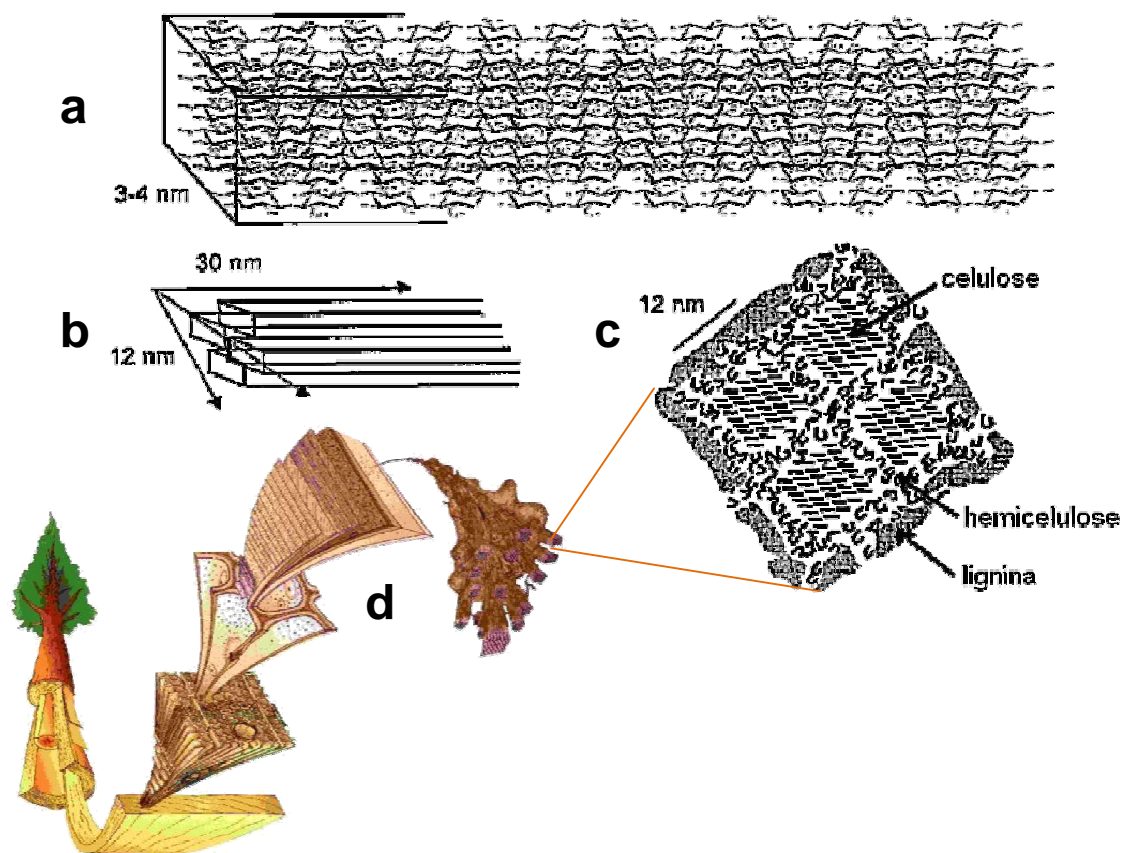


FIGURA 2.5 – ORGANIZAÇÃO DA CELULOSE EM VEGETAIS SUPERIORES: (a) FIBRILA ELEMENTAR; (b) CRISTALITO; (c) MICROFIBRILA; (d) PAREDE CELULAR (adaptado de RAMOS, 2003)

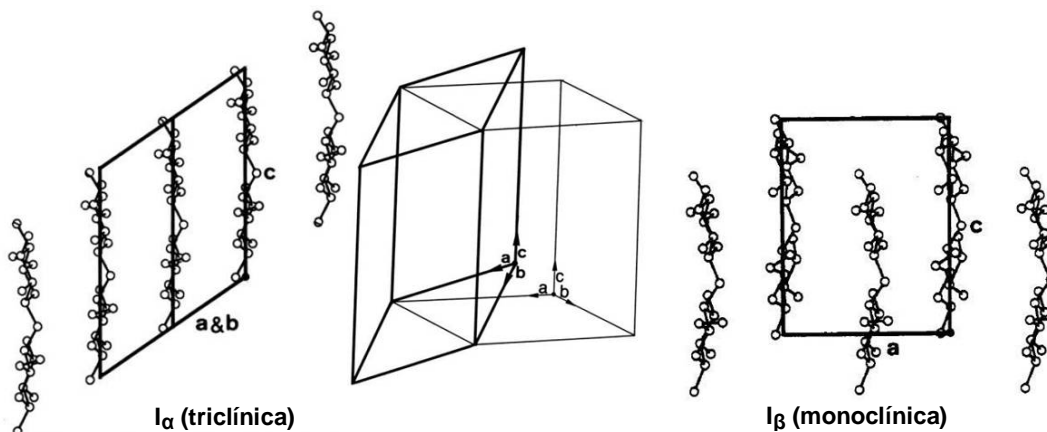


FIGURA 2.6 – FORMAS ALOMÓRFICAS DA CELULOSE I (ZUGENMAIER, 2001).

### 2.1.1.1 Celulose bacteriana

Uma variedade particular de celulose tem atraído a atenção dos pesquisadores em biocompósitos: a celulose bacteriana. Conhecida desde longa data pelos produtores de vinagre como “mãe” ou “planta” do vinagre, consiste numa película gelatinosa e translúcida que se forma na superfície de culturas de bactérias do gênero *Acetobacter*. Uma micrografia eletrônica de transmissão dessa película (Fig. 1.3) revela-a formada por uma rede aleatória de microfibrilas de menos de 100 nm de diâmetro (Fig. 2.7). Sua estrutura consiste em longas cadeias de celulose alinhadas paralelas, entremeadas de regiões amorfas onde as cadeias não apresentam orientação definida. Segundo KOIZUMI *et al.* (2008), a região amorfa dos feixes de microfibrilas ocupa quase 90% de seu volume; no entanto, como é composta de até 99% de água, contribui muito pouco para a massa total de celulose.

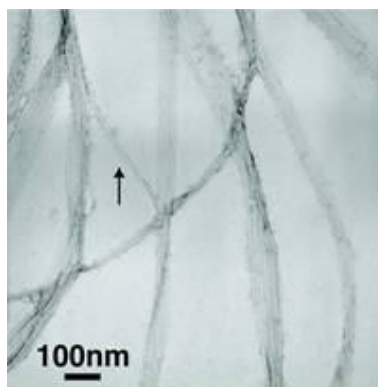


FIGURA 2.7 – MICROGRAFIA DA CELULOSE BACTERIANA OBTIDA POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (IGUCHI *et al.*, 2000).

A síntese das microfibrilas envolve um complexo protéico denominado *complexo terminal* (TC), situado na superfície externa da membrana celular da bactéria. Fileiras de até 60 TCs sintetizam cadeias de celulose que se agrupam em microfibrilas, que por sua vez formam feixes em forma de fita (Fig. 2.8) com 80 x 4 nm e vários  $\mu\text{m}$  de comprimento (IGUCHI *et al.*, 2000; KOIZUMI *et al.*, 2008).

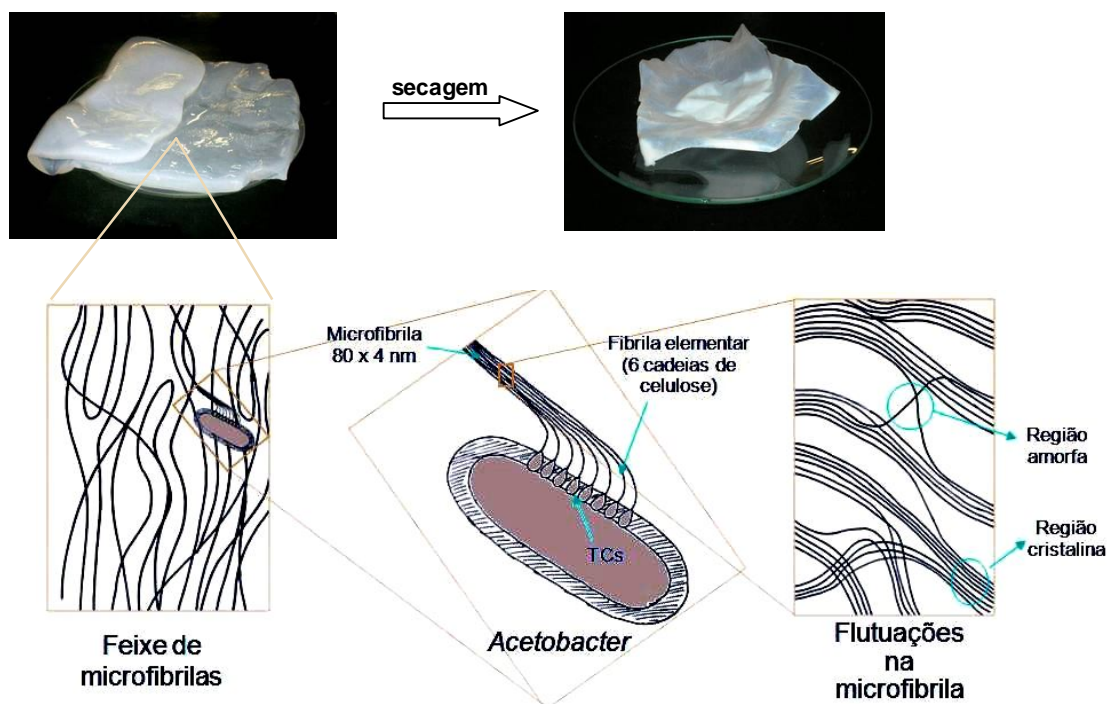


FIGURA 2.8 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ESTRUTURA DA CELULOSE BACTERIANA

A celulose bacteriana consiste numa combinação das formas alomórficas Ia e Ib (SUGIYAMA *et al.*, 1991). HAYASHI *et al.* (1998) estimaram a fração de celulose Ia em 44%, muito superior à encontrada nas fibras de vegetais superiores e comparável à celulose obtida de algas como a *Cladophora*. O aumento da fração de celulose Ib após hidrólise enzimática parcial indica que o alomorfo Ia é mais suscetível ao ataque por celulases.

O módulo de Young (módulo elástico ou de elasticidade) das películas de celulose bacteriana, com valores entre 16 e 18 GPa isotropicamente ao longo da superfície do plano, é extraordinariamente alto para materiais biológicos bidimensionais, o que torna o material adequado para reforço de polpas de papel e outras aplicações, como a confecção de diafragmas acústicos para alto-falantes de alta fidelidade (IGUCHI *et al.*, 2000). HSIEH *et al.* (2008) estimaram em 114 GPa o

módulo elástico das fibrilas de celulose bacteriana. Tal resultado foi obtido a partir do desvio da banda em  $1095\text{ cm}^{-1}$  espectro Raman ao submeterem-se películas de celulose bacteriana a esforços de tração, de forma semelhante ao já citado trabalho de STURCOVA *et al.* (2005).

Recentemente, vários estudos têm procurado utilizar a celulose bacteriana como reforço estrutural em compósitos. As fibrilas podem ser incorporadas a uma matriz polimérica (GINDL e KECKES, 2004) ou, ao contrário, o polímero pode ser adicionado ao meio de cultura (BROWN e LABORIE, 2007). Outra alternativa é a adição ao meio de cultura de nanopartículas minerais como a sílica (YANO *et al.*, 2008).

As excepcionais propriedades mecânicas da celulose bacteriana são freqüentemente atribuídas na literatura à sua elevada cristalinidade. No entanto, estimativas do índice de cristalinidade a partir dos dados de difração de raios X são de 63% para celulose obtida em meio de cultura agitado e de 71% em meio estático, o que não é particularmente alto (HSIEH *et al.*, 2008).

#### 2.1.1.2 Celulose microfibrilada e nanocristais de celulose

As fibrilas de celulose apresentam um módulo de elasticidade elevado, comparável ao de metais como o cobre (110 GPa) e o aço (207 GPa). No entanto, em materiais naturais como a madeira o módulo de elasticidade é em torno dos 10 GPa (SIMONSEN, 2007). Isso significa que para aproveitar as propriedades mecânicas excepcionais da celulose, há a necessidade de se isolar os cristalitos de celulose ou mesmo de separá-los em suas fibrilas elementares. Tem-se procurado alcançar esses objetivos de várias maneiras: ação mecânica intensa (ABE *et al.*, 2007), hidrólise ácida (BONDESON *et al.*, 2006) hidrólise enzimática (HAYASHI *et al.*, 2005) e combinações dos métodos anteriores (PÄÄKÖ *et al.*, 2007). Os fragmentos isolados de celulose resultantes da sua desagregação são referidos na literatura como **nanocristais** ou **whiskers** de celulose (Fig. 2.9a). Como o rompimento da celulose, tanto por meios mecânicos como químicos ou enzimáticos, dá-se preferencialmente nas regiões amorfas, esses *whiskers* apresentam alta cristalinidade (SAMIR *et al.*, 2005). A desagregação parcial da celulose por meio exclusivamente da ação mecânica (ABE *et al.*, 2007) ou por combinação desta com hidrólise enzimática leve (BONDESON *et al.*, 2006; PÄÄKÖ *et al.*, 2007) dá origem a

uma rede de fibrilas muito finas, da ordem de 10 a 20 nm de espessura, denominada de **celulose microfibrilada** (Fig. 2.9b). Este material apresenta-se como um gel de elevada viscosidade e alto teor de água, características semelhantes às da celulose bacteriana.

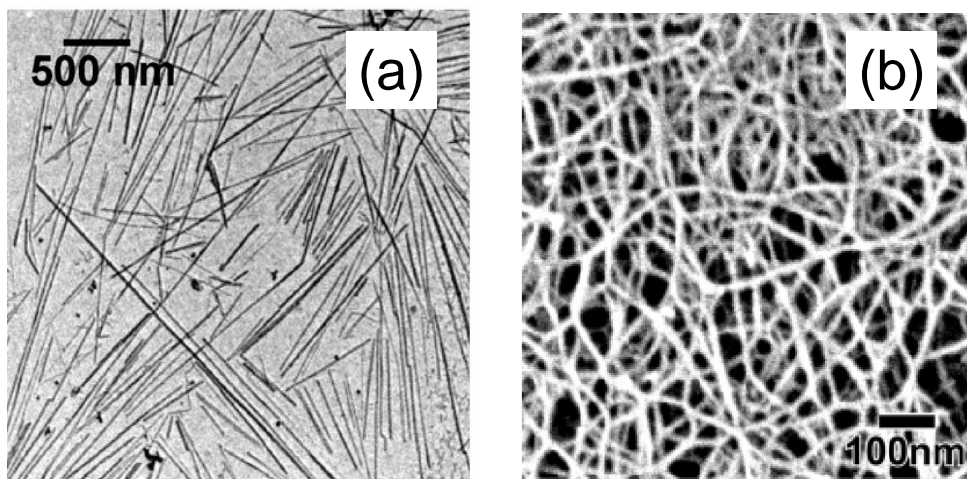


FIGURA 2.9 – MICROGRAFIAS ELETRÔNICAS DE VARREDURA DE (a) *WHISKERS* DE CELULOSE DE TUNICADO (SAMIR *et al.*, 2005) E (b) CELULOSE MICROFIBRILADA (ABE *et al.*, 2007)

### 2.1.1.3 Hidrólise ácida da celulose

A celulose pode ser hidrolisada em cadeias menores (oligossacarídeos, dissacarídeo – celobiose ou monossacarídeo – glucose). Essa hidrólise pode ser realizada quimicamente, pela ação de ácidos fortes (usualmente ácido sulfúrico ou ácido clorídrico) ou através da ação de enzimas (celulases) produzidas por uma grande variedade de fungos e bactérias (RAMOS, 2003; PÄÄKÖ *et al.*, 2007).

A hidrólise da celulose com o uso de ácido sulfúrico é um processo extensivamente estudado. No entanto, o procedimento pouco mudou desde os trabalhos pioneiros na área: ainda são citados os artigos de MUKHERJEE e WOODS (1953) e de MARCHESSAULT *et al.* (1959) como referências importantes. No entanto, apenas na última década deu-se maior atenção à possibilidade de utilização dos *whiskers* resultantes desse processo como reforço estrutural de polímeros.

BONDESON *et al.* (2006) estudaram a produção de *whiskers* por hidrólise ácida de celulose microcristalina derivada de madeira de *spruce*. As condições

otimizadas foram as seguintes: ácido sulfúrico na concentração de 63,5% (em massa); temperatura de 44°C; 10,2 g/mL de celulose microcristalina, previamente submetida ao ultrassom por 29,6 min; 130 min de hidrólise. Nessas condições, foram produzidos *whiskers* com comprimento entre 15 nm e 569 nm. Os *whiskers* de celulose obtidos dispersam-se facilmente em água, sendo que a dispersão apresenta birrefringência. Essas características são atribuídas à formação de cargas negativas na superfície dos nanocristais devido à sulfatação, o que leva a um alinhamento por repulsão dos cristais em suspensão (ORTS *et al.*, 2005; BONDESON *et al.*, 2006). Nanocristais produzidos por hidrólise com HCl não apresentam esse comportamento.

Um dos limitantes à utilização extensiva dos *whiskers* é o baixo rendimento obtido na reação. Os trabalhos acima citados obtiveram em torno de 40% de nanocristais em relação à massa inicial de fibras celulósicas. O restante da celulose é convertido em produtos solúveis de hidrólise (mono e oligossacarídeos) e em compostos resultantes da oxidação ou desidratação desses produtos promovida pelo ácido sulfúrico. Além disso, a comparação de compósitos contendo como reforço nanocristais ou celulose microfibrilada revela melhores resultados destes últimos em termos de propriedades mecânicas (ÀNGLES e DUFRESNE, 2001), provavelmente devido à ausência do entrelaçamento verificado nas microfibrilas, entre os *whiskers*.

#### 2.1.1.4 Hidrólise enzimática da celulose

A hidrólise enzimática da celulose depende da ação conjunta de enzimas conhecidas como coletivamente como **celulases**, excretadas extracelularmente por bactérias e fungos. Os complexos enzimáticos produzidos por fungos são compostos por três componentes majoritários: endoglucanases, celobiohidrolases e  $\beta$ -glucosidases. As **endoglucanases** caracterizam-se por agirem geralmente sobre a celulose amorfa e derivados solúveis como a carboximetilcelulose (CMC). Sua ação produz uma quebra aleatória das ligações glicosídicas  $\beta(1-4)$ , com pouca liberação de açúcares redutores. As **exoglucanases** ou **celobiohidrolases** atacam as extremidades dessas cadeias produzindo celobiose. Finalmente, as  **$\beta$ -glucosidases**, embora não possam ser consideradas celulases, completam o processo hidrolítico catalisando a hidrólise da celobiose em glucose ou removendo

resíduos glucosil das extremidades não redutoras dos oligossacarídeos solúveis (RAMOS, 1992).

A ação das celulasas sobre as ligações  $\beta(1-4)$  da celulose pode ocorrer por dois mecanismos distintos. No mecanismo com **inversão de configuração anomérica** (Fig. 2.10b), o sítio ativo da enzima tem entre 0,65 e 0,95 nm. O nucleófilo promove a ionização de uma molécula de água que ataca o centro anomérico diretamente, numa reação de catálise ácido-base (TOMME, 1995). O produto dessa reação possui a hidroxila do carbono anomérico na configuração  $\alpha$ . No mecanismo com **retenção de configuração anomérica** (Fig. 2.10a), o sítio ativo de 0,55 nm não permite a adsorção da molécula de água. O nucleófilo carboxilato ataca o carbono anomérico, enquanto o par de elétrons da ligação glicosídica remove um próton do grupo carboxila. Nesta etapa forma-se um intermediário glicosil-enzima. O aminoácido desprotonado ataca uma molécula de água do meio, formando uma hidroxila que ataca o carbono anomérico e libera o carboidrato com a configuração original (anômero  $\beta$ ) (RÄTTÖ, 1997; TOMME, 1995).

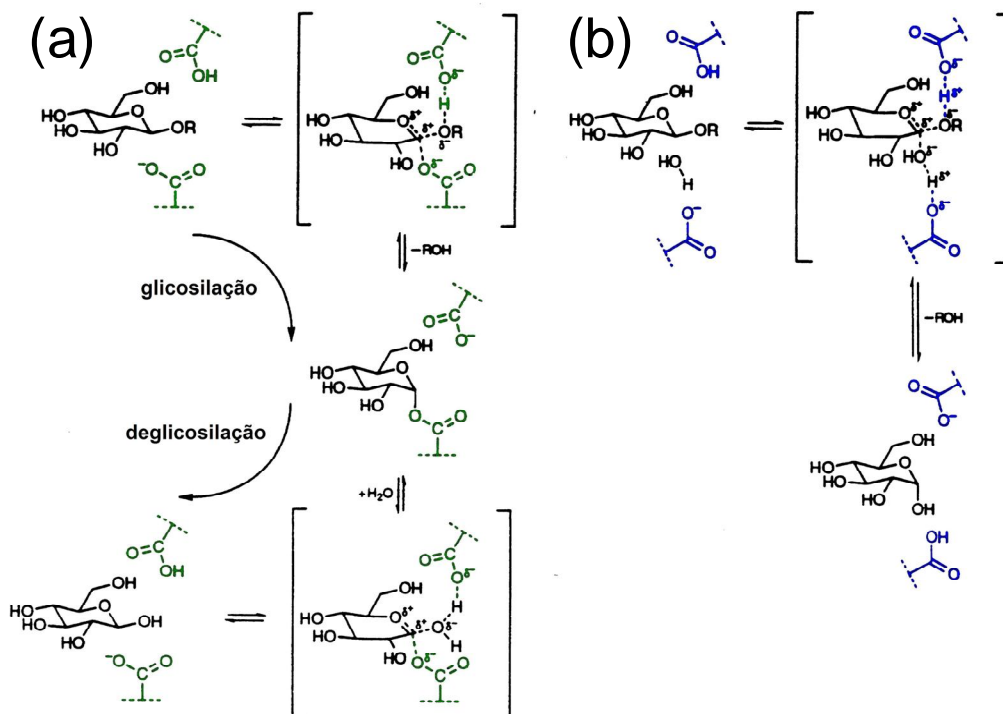


FIGURA 2.10 - MECANISMOS DE REAÇÃO DAS  $\beta(1-4)$ -GLUCANASES COM (a) RETENÇÃO E (b) INVERSÃO DA CONFIGURAÇÃO ANOMÉRICA. EM VERDE E AZUL, OS TERMINAIS DOS SÍTIOS CATALÍTICOS (TOMME, 1995)

### 2.1.1.5 Complexo celulásico de *Trichoderma reesei*

O complexo enzimático extracelular produzido pelo fungo filamentosso *Trichoderma reesei* é o mais amplamente estudado, sendo composto por duas celobiohidrolases (CBH I e CBH II) e ao menos quatro endoglucanases (EG I, EG II, EG III e EG V). Essas enzimas atuam sinergisticamente, sendo que a ação de combinações dessas enzimas é muito mais efetiva que a soma de suas ações individuais (RAMOS, 1992, 2000; ZANDONÁ Filho, 2001; TEERI, 1997).

As celobiohidrolases constituem a maior fração do complexo enzimático de *T. reesei*, sendo que a CBH I corresponde a 60% da massa total de proteína celulolítica e a CBH II, a 20% (TEERI, 1997). Ambas possuem um domínio de ligação à celulose (CBD), ligado ao domínio catalítico por um peptídico de ligação ou *linker* em forma de “pescoço”. Três resíduos de tirosina dispostos coplanarmente no CBD são fortemente adsorvidos à superfície dos cristalitos, enfraquecendo a interação entre cadeias de celulose adjacentes. Isso permite que as celobiohidrolases ajam sobre as regiões cristalinas da celulose. No entanto, seu sítio catalítico tem forma de túnel, o que exige que a cadeia seja introduzida no mesmo, limitando sua ação às extremidades das cadeias (Fig. 2.11). As enzimas do complexo celulásico de *Trichoderma*, CBHI e EGI mantém a configuração anomérica dos glicosídeos, enquanto CBH II a inverte (TEERI, 1997; ZANDONÁ Filho, 2001; GILBERT *et al.*, 2008).

O sítio catalítico das endoglucanases tem forma de fenda (Fig. 2.12). Tal conformação permite que elas ajam sobre qualquer ponto da cadeia de celulose, embora sua ação seja mais efetiva sobre as regiões amorfas das fibras, devido à maior facilidade de adsorção.

Embora as celobiohidrolases sejam capazes de, sozinhas, hidrolisarem lentamente a celulose (TEERI, 1997), é a ação conjunta delas com as endoglucanases que resulta numa hidrólise mais eficiente, como esquematizado na Fig. 2.13. As endoglucanases atuam rompendo ligações  $\beta(1-4)$  de forma aleatória nas regiões menos organizadas da celulose. As celobiohidrolases, por sua vez, atacam as extremidades de cadeia formadas nesse processo, liberando celobiose no meio. Acredita-se que a enzima CBH I atue sobre as extremidades redutoras das cadeias, enquanto a CBH II ataca os terminais não-redutores (GILBERT *et al.*, 2008; TEERI, 1997).

A celobiose liberada no meio reacional atua como um inibidor da atividade enzimática, como seria de se esperar de um produto da reação. Para que a hidrólise prossiga é necessário que essa celobiose seja retirada do meio. Para tanto, conta-se com a ação das  $\beta$ -glucosidases, enzimas capazes de hidrolisar as ligações  $\beta(1-4)$  da celobiose e dos terminais não-redutores de oligossacarídeos solúveis. Esta ação converte os açúcares solúveis em glucose, completando o processo de hidrólise.

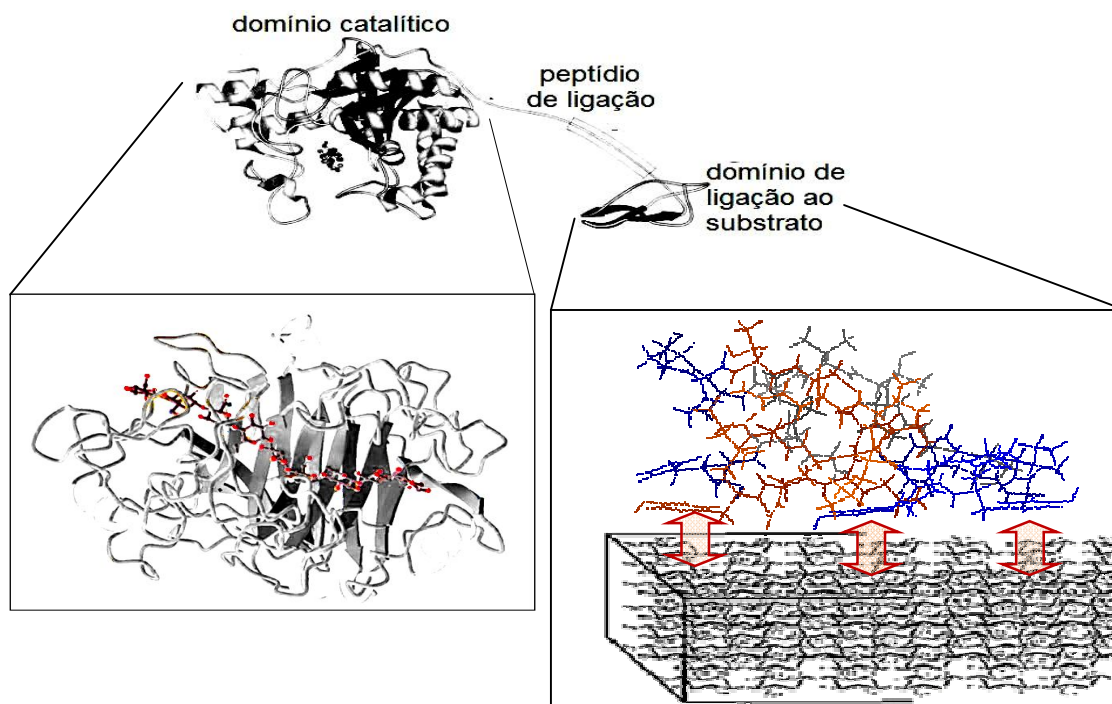


FIGURA 2.11 – ESTRUTURA DE UMA CELOBIOHIDROLASE. EM DESTAQUE, À ESQUERDA, O DOMÍNIO CATALÍTICO, MOSTRANDO UMA CADEIA DE CELULOSE NO SEU INTERIOR. À DIREITA, ADSORÇÃO A UM CRISTALITO DE CELULOSE DO DOMÍNIO DE LIGAÇÃO AO SUBSTRATO, ATRAVÉS DOS TRÊS RESÍDUOS DE TIROSINA (SETAS)

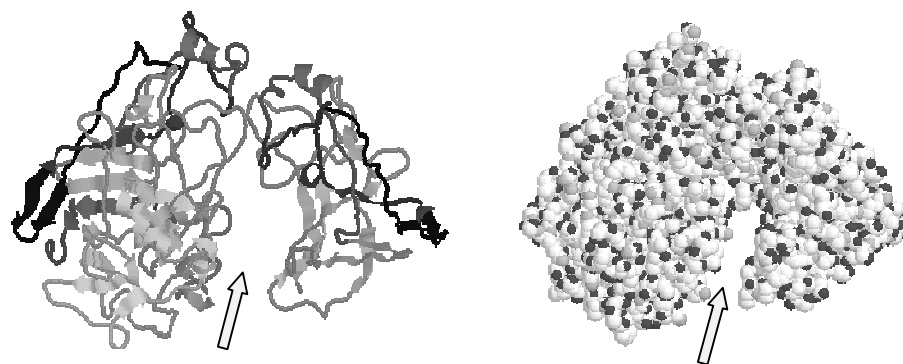


FIGURA 2.12 – ESTRUTURA DE UMA ENDOGLUCANASE, MOSTRANDO O DOMÍNIO CATALÍTICO EM FORMA DE FENDA (SETAS)

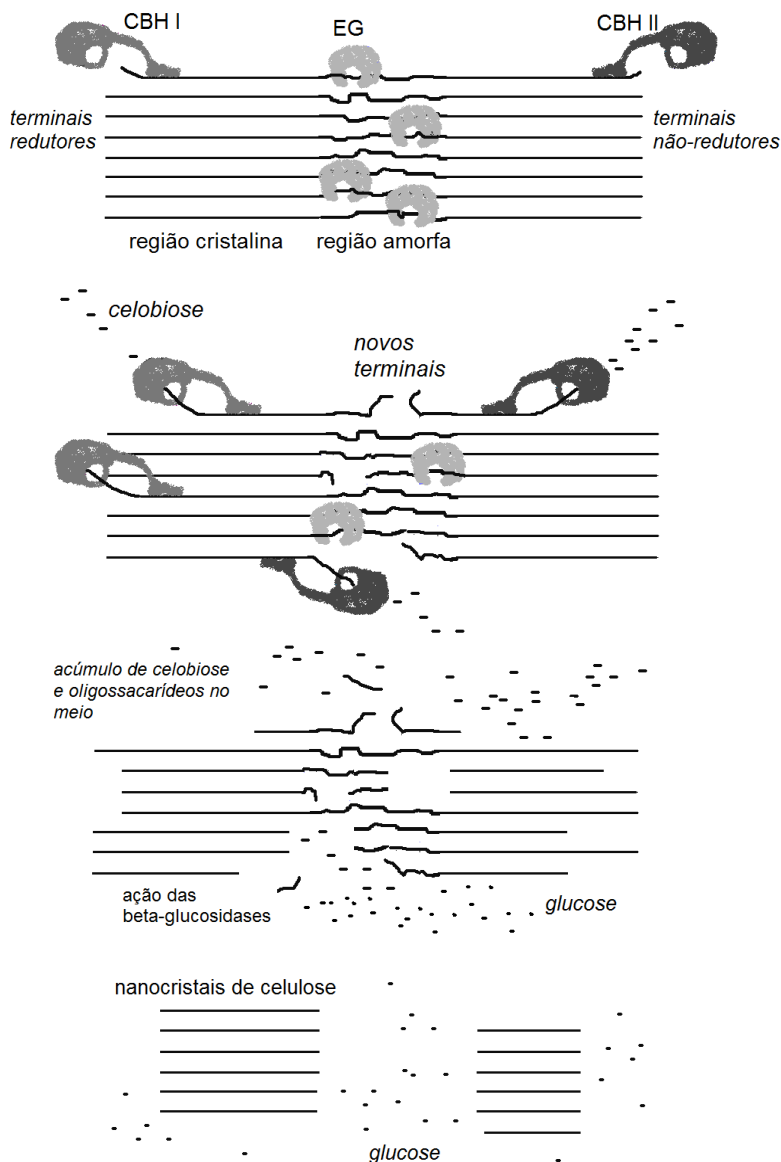


FIGURA 2.13 – AÇÃO SINERGÍSTICA DO COMPLEXO CELULÁSICO DE *Trichoderma sp.* NA HIDRÓLISE DA CELULOSE

#### 2.1.1.6 Vantagens da hidrólise enzimática sobre a hidrólise ácida

Alguns fatores contribuem para a adoção da hidrólise enzimática da celulose em lugar da hidrólise ácida. Entre eles, está o baixo rendimento de nanofibras obtidas a partir da hidrólise ácida: BONDESON *et al.* (2006) relata um rendimento em torno de 40% para as condições ótimas de hidrólise com  $H_2SO_4$ , o que significa que cerca de 60% da celulose inicial é convertida em mono ou oligossacarídeos. No caso específico da celulose bacteriana, um fator importante é a sua suscetibilidade à

hidrólise enzimática: segundo HAYASHI *et al.* (1998) a celulose do tipo  $I_{\alpha}$  é mais facilmente hidrolisada pelas enzimas que a celulose  $I_{\beta}$ , fato confirmado por HAYASHI *et al.* (2005). Uma vez que a celulose bacteriana é composta majoritariamente por celulose  $I_{\beta}$  (IGUCHI *et al.*, 2000), sua hidrólise seria facilitada. No entanto, há controvérsias quanto a esse ponto: SAMEJIMA *et al.* (1998) afirmam não ter verificado alteração significativa na razão  $I_{\alpha}/I_{\beta}$  após hidrólise enzimática. A hidrólise ácida tende também a produzir *nanowhiskers* cuja capacidade de reforço estrutural em polímeros é inferior ao das nanofibras, devido à menor capacidade de interação entre os elementos de reforço (ÀNGLES e DUFRESNE, 2001). Por último, temos a possibilidade de utilização de preparações enzimáticas com modos de atividade diferentes. Preparações enzimáticas comerciais possuem atividade celulásica total (ação combinada de endoglucanases e exoglucanases). Preparações obtidas de cepas modificadas de *Trichoderma* sp. Podem apresentar atividade predominantemente endoglucanásica ou exoglucanásica.

Preparações enzimáticas com atividade exo e endoglucanásica foram investigadas por RAMOS *et al.* (1999), tendo como substrato diferente a polpa *Kraft* branqueada. Preparações em que predominam celobiohidrolases reduziram a massa total de celulose, pouco alterando a distribuição do grau de polimerização (DP) das cadeias, enquanto preparações endoglucanásicas levaram a uma perda de massa menor, porém reduziram a DP média da celulose remanescente. Tais resultados sugerem que as endoglucanases são capazes de cortar as regiões amorfas da celulose. Se tal comportamento se repetir na celulose bacteriana, seria possível desentrelaçar os feixes de nanofibrilas pelo rompimento das cadeias que se situam na região amorfa, aumentando assim a dispersibilidade e a área superficial do material, o que contribuiria para sua capacidade de reforço estrutural. Como as regiões amorfas, de acordo com KOIZUMI *et al.* (2008), correspondem a um considerável volume da celulose bacteriana, porém a uma parte reduzida de sua massa, devem ser muito mais acessíveis ao ataque enzimático e, portanto, mesmo tempos de hidrólise muito curtos e teores de enzima baixos devem ser suficientes para uma ação efetiva sobre essas regiões.

### 2.1.2 Amido

O amido consiste numa mistura de dois polissacarídeos: a **amilose** (Fig. 2.14a), polímero essencialmente linear composto de unidades de  $\alpha$ -D-glucopiranosose unidas principalmente por ligações  $\alpha(1-4)$ , com pequeno grau de ligações  $\alpha(1-6)$ , correspondendo a 0,3-0,5% do total de ligações. O teor de amilose em amidos está relacionado com a viscosidade da pasta formada. Amidos com alto teor de amilose formam géis relativamente rígidos e elásticos. Já a **amilopectina** (Fig. 2.14b) é um polímero altamente ramificado, possuindo 5-6% de ligações  $\alpha(1-6)$ . Os amidos nativos geralmente contêm em torno de 75% de amilopectina. As moléculas de amido têm a forma de hélice, sendo que as hidroxilas estão voltadas para o exterior, sendo responsáveis pelo caráter hidrofílico do amido, devido à orientação dos átomos de hidrogênio para o interior da hélice, o mesmo é lipofílico [28].

Na maioria dos amidos de endospermas de cereais, a amilopectina compõe de 72 a 82% da massa e a amilose, de 18 a 33%. No entanto, alguns genótipos de trigo mutantes contêm mais de 70% de amilose, enquanto outros, os chamados amidos “cerosos” ou “waxy” são constituídos quase completamente de amilopectina, contendo menos de 1% de amilose (FREITAS, 2003; ROMERO-BASTIDA *et al.*, 2005).

O amido organiza-se nas células vegetais em grânulos (Fig. 2.14f), nos quais se alternam regiões amorfas, constituídas predominantemente de amilose, e regiões cristalinas (Fig. 2.14e), nas quais o principal componente, amilopectina, organiza-se em duplas hélices, paralelas e empacotadas antiparalelamente a outras duplas hélices (Fig. 2.14d e Fig. 2.14g). (FREITAS, 2003; ROMERO-BASTIDA *et al.*, 2005). O empacotamento das duplas hélices pode ocorrer de duas formas: a chamada **cristalinidade do tipo A**, predominante nos amidos de cereais, e a **cristalinidade do tipo B**, mais comum em raízes e tubérculos.

Os cristais do tipo A são mais compactos, possuindo 8 moléculas de água por célula unitária; o empacotamento do tipo B é mais aberto, tendo 36 moléculas de água por célula unitária, num arranjo hexagonal (Fig. 2.14c). O chamado amido **tipo C**, presente em leguminosas e em alguns tubérculos como a mandioca, é considerado uma mistura das formas alomórficas A e B. Cada um desses tipos é facilmente caracterizado pelo seu padrão de difração de raios X. (FREITAS, 2003; CHEETHAM e TAO, 1998).

Ao serem aquecidos na presença de água, os grânulos de amido se hidratam, gerando um aumento temporário de viscosidade. Esse processo, conhecido como **gelatinização**, inicialmente gera um inchamento do grânulo do amido e perda de cristalinidade. Posteriormente, as cadeias de amido são liberadas no meio, gerando um gel. Tais géis, ao resfriarem, sofrem um processo de **retrogradação**, no qual as cadeias colidem e formam ligações intermoleculares, formando uma rede tridimensional compacta. O alinhamento de cadeias de amilose adjacentes leva a um novo arranjo cristalino, a **cristalinidade do tipo V<sub>H</sub>**, no qual as cadeias formam hélices simples (FREITAS, 2003; CHEETHAM e TAO, 1998; TALJA *et al.*, 2007).

As fontes de amido mais importantes comercialmente são os grãos de cereais, que contém de 40 e 90% de amido em peso seco, os grãos de leguminosas, com 30 a 70% e as tuberosas, com 65 a 85%. As espécies mais cultivadas mundialmente para a produção de amido são o milho, trigo, arroz, batata e mandioca (FRANCO *et al.*, 2002).

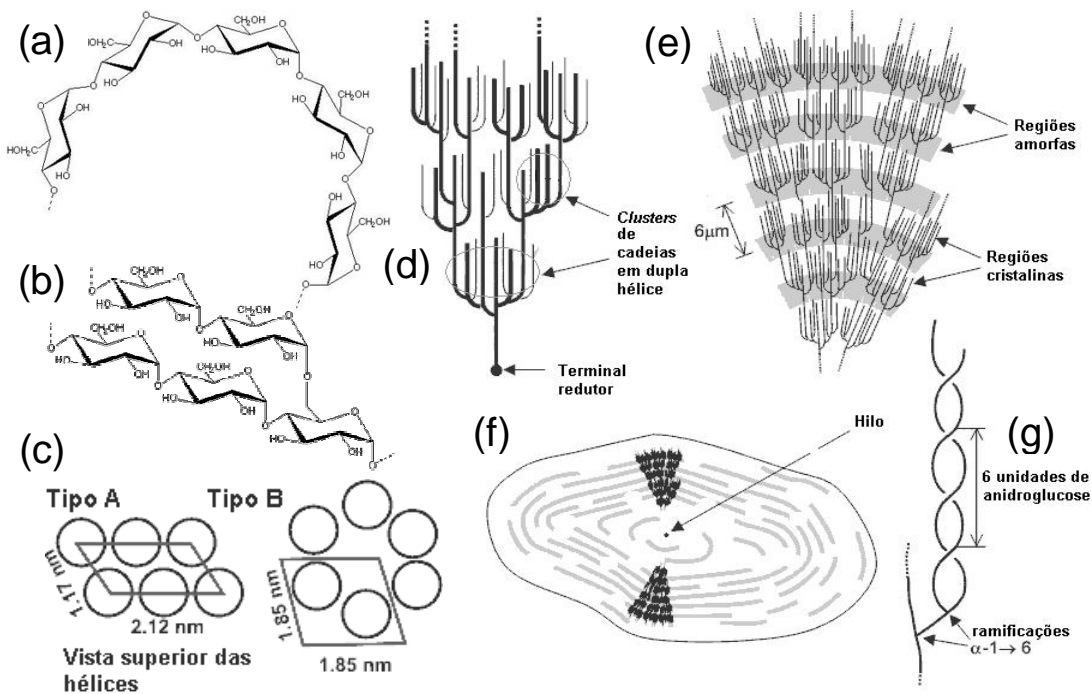


FIGURA 2.14 - ORGANIZAÇÃO ESTRUTURAL DO AMIDO. (a) AMILOSE; (b) AMILOPECTINA; (c), (d) E (e) EMPACOTAMENTO DAS CADEIAS DE AMILOPECTINA; (f) GRÂNULO DE AMIDO; (g) DUPLA HÉLICE DE AMILOPECTINA

### 2.1.2.1 Amido de mandioca

A mandioca (*Manihot esculenta*) é cultivada em todas as regiões do Brasil, tendo papel importante na alimentação humana e animal, além de ser utilizada como matéria-prima em inúmeros produtos industriais (Fig. 2.15). A produção brasileira do tubérculo corresponde a 12,7% do total mundial (MATTOS e CARDOSO, 2003).

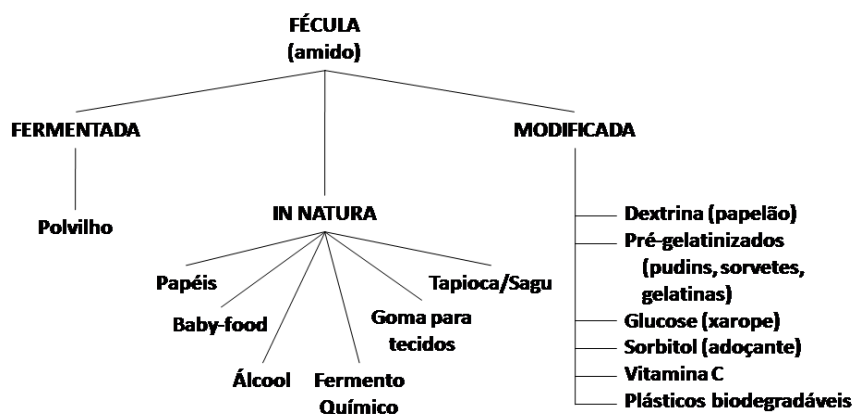


FIG. 2.15 – APLICAÇÕES DO AMIDO DE MANDIOCA (MATTOS e CARDOSO, 2003)

Embora a raiz da mandioca possua um teor de amido superior a 80% (base seca), o rendimento de extração pelos métodos tradicionalmente utilizados é muito baixo, de 22 a 27%. Ainda assim, o amido de mandioca apresenta vantagens em relação às demais alternativas por ter menor teor de impurezas, principalmente corantes. Os grânulos de mandioca apresentam também uma densidade mais elevada que os de outras culturas, o que acelera a etapa de decantação na sua extração do vegetal (FRANCO *et al.*, 2002). A Tab. 2.1 mostra a composição típica da raiz de mandioca e de seu amido.

TABELA 2.1 – COMPOSIÇÃO DA RAIZ DE MANDIOCA E DO AMIDO RESULTANTE DA MESMA, EXPRESSA EM % DE MATÉRIA SECA (FRANCO *et al.*, 2002)

COMPONENTE	MANDIOCA	AMIDO DE MANDIOCA COMERCIAL
Carboidratos totais	91,70	98,20
Amido	83,50	98,20
Amilose		17,65
Outros carboidratos	8,20	---
Proteína (N x 6,25)	3,00	0,90
Matéria graxa	0,30	0,78
Fibras	2,40	0,60
cinzas	2,40	0,23

### 2.1.2.2 Amido termoplástico

O amido, em sua forma granular, não é um polímero termoplástico. Para que adquira características tais que permitam sua utilização em equipamentos de extrusão, injeção e sopro, faz-se necessária sua desestruturação por ação do calor e adição de plastificantes. O material resultante é denominado **amido plastificado** ou **amido termoplástico** (TEIXEIRA, 2007). A rede macromolecular formada durante a gelatinização do amido pode originar filmes por evaporação da água, num processo denominado *casting*. As ligações intermoleculares nessa rede ocorrem predominantemente nos domínios cristalinos de amilose formados durante a retrogradação. Quanto mais domínios cristalinos aparecem no filme de amido, maior será seu módulo de elasticidade e resistência à tração. A produção de filmes sob elevada temperatura e baixa umidade relativa resulta em baixo grau de cristalinidade da amilose e amilopectina. O grau de cristalinidade dos filmes aumenta com o aumento do teor de amilose (TALJA *et al.*, 2007), sendo que filmes de amilose tem ductilidade e propriedades de barreira um pouco melhores que os de amilopectina (LÓPEZ-RUBIO *et al.*, 2007). Filmes formados exclusivamente por amido tendem a ser quebradiços, o que torna necessária a adição de plastificantes. Estes são geralmente substâncias não-voláteis que interagem com as cadeias do polímero, diminuindo as interações entre cadeias poliméricas adjacentes e assim aumentando a flexibilidade dos filmes (ROMERO-BASTIDA *et al.*, 2005). No entanto, a adição de plastificantes reduz o grau de cristalinidade dos filmes (TALJA *et al.*, 2007), além de aumentar a permeabilidade a gases, vapores e líquidos (LÓPEZ-RUBIO *et al.*, 2007).

O efeito dos plastificantes pode ser explicado pelas teorias da lubricidade, do gel e do volume livre (CARRAHER, 1996). A primeira afirma que o plastificante age como um lubrificante interno e permite o deslizamento das cadeias poliméricas umas em relação às outras. A teoria do gel, aplicável a polímeros amorfos, assume que a presença do plastificante enfraquece a atração intermolecular entre as cadeias do polímero. Na teoria do volume livre, considera-se que o plastificante gera regiões de volume livre que permitem a mobilidade de segmentos das cadeias poliméricas, o que leva a um abaixamento da temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ). Isso é desejável, pois a trabalhabilidade de um polímero está relacionada com sua  $T_g$ ; abaixo dela, o polímero é excessivamente rígido para ser trabalhado.

Para que possa atuar como plastificante, uma substância deve ser quimicamente semelhante ao polímero, de forma que possa interagir com o mesmo (CARRAHER, 1996; MUNK, 1989; BILLMEYER, 1971). No caso do amido, tal condição é satisfeita por polióis como o glicerol ou o sorbitol, cujas hidroxilas estabelecem ligações hidrogênio com as hidroxilas do amido (ROMERO-BASTIDA *et al.*, 2005). O glicerol é o plastificante mais utilizado na produção de amido termoplástico devido à sua disponibilidade, biodegradabilidade e afinidade com o amido (figura 2.16b) (WILHELM *et al.*, 2003; ÀNGLES e DUFRESNE, 2000, 2001; AVÉROUS *et al.*, 2001; TALJA *et al.*, 2007; LÓPEZ-RUBIO *et al.*, 2007). O teor de glicerol utilizado influencia nas propriedades do compósito. Teores baixos resultam em um material muito quebradiço (figura 2.16a); teores mais altos levam à segregação de uma fase rica em glicerol (figura 2.16c) (RODRIGUEZ-GONZALEZ *et al.*, 2004), ou ao acúmulo de plastificante na interface reforço-matriz (figura 2.16f), diminuindo a aderência entre as fases (ÀNGLES e DUFRESNE, 2000).

A água também age como plastificante do amido; no entanto, sua elevada mobilidade na matriz impede que seja utilizada para esse fim, a não ser em pequenas proporções (TALJA *et al.*, 2007; LÓPEZ-RUBIO *et al.*, 2007). MATVEEV *et al.* (2000) propõe um mecanismo de plastificação de biopolímeros pela água baseado na blindagem de ligações hidrogênio e na redução das interações dipolo-dipolo resultantes da alteração da constante dielétrica do meio, além da já citada queda na  $T_g$ .

### 2.1.3 Bionanocompósitos de amido e celulose

Devido a sua elevada cristalinidade, alto módulo de elasticidade e elevada razão de aspecto (comprimento/espessura), os *whiskers* de celulose têm sido amplamente pesquisados como reforço estrutural em nanocompósitos (YU *et al.*, 2006; BHATNAGAR e SAIN, 2005; LU *et al.*, 2006; PETERSON e OKSMAN, 2006). Em particular, a combinação de reforço celulósico nanocristalino com amido plastificado (ÀNGLES e DUFRESNE, 2000, 2001; MATHEW e DUFRESNE, 2002) é uma alternativa importante por se tratar de compósitos cujos principais componentes são ambos de fonte renovável e biodegradável, abundantes e baratos. Como em outros compósitos reforçados por fibras, a melhora das propriedades mecânicas é a principal razão de reforçar o amido plastificado com celulose (YU *et al.*, 2006).

SAMIR *et al.* (2005) destacam outras vantagens da celulose em relação a cargas inorgânicas: grande variedade de fontes de celulose baseadas em culturas não alimentícias; baixo consumo de energia; baixa densidade; grande atenuação sonora; processamento facilitado devido à natureza não-abrasiva das fibras; superfície relativamente reativa, o que pode ser usado para ancorar grupos funcionais reativos; reciclagem por combustão mais fácil em comparação com sistemas com reforço mineral.

ANGLÉS e DUFRESNE (2001) reportaram que, em nanocompósitos de amido plastificado com glicerol e reforçados com *whiskers* de celulose, há um declínio da estabilidade térmica da matriz polimérica com o aumento do conteúdo de umidade. Foi também observado um efeito de reforço menos pronunciado que o esperado, atribuído à interação competitiva entre os componentes e ao acúmulo de plastificante na interface celulose/amilopectina (Fig. 2.16f). Este fenômeno, aumentado em condições de maior umidade, pode ser causado também pela formação de uma região cristalina em torno dos *whiskers*, originada das cadeias de amilopectina localizadas nos domínios ricos em glicerol (Fig. 2.16e).

SAMIR *et al.* (2005) destacam que materiais produzidos por evaporação da água apresentam propriedades mecânicas superiores aos produzidos por outras técnicas, com *freeze-drying*/moldagem e *freeze-drying*/extrusão. Foi sugerido que essa diferença se deva à predominância de interações *whisker/whisker*, sendo que a ciência de compósitos clássica tende a privilegiar as interações matriz/reforço. Nos compósitos baseados em nanofibras de celulose, ocorreria o oposto: interações por ligações hidrogênio entre as nanofibras (Fig. 2.16b) formariam uma rede responsável pelo efeito de reforço estrutural (Fig. 2.17).

NAKAGAITO e YANO (2004) observaram um súbito aumento do módulo de elasticidade em compósitos de resina fenólica reforçados com polpa *kraft* microfibrilada, quando o número de passagens por um fibrilador ultrapassa 30. Tal resultado é atribuído à necessidade de total fibrilação das fibras originais, o que levaria à eliminação de defeitos no interior das mesmas que agem como propagadores de fraturas.

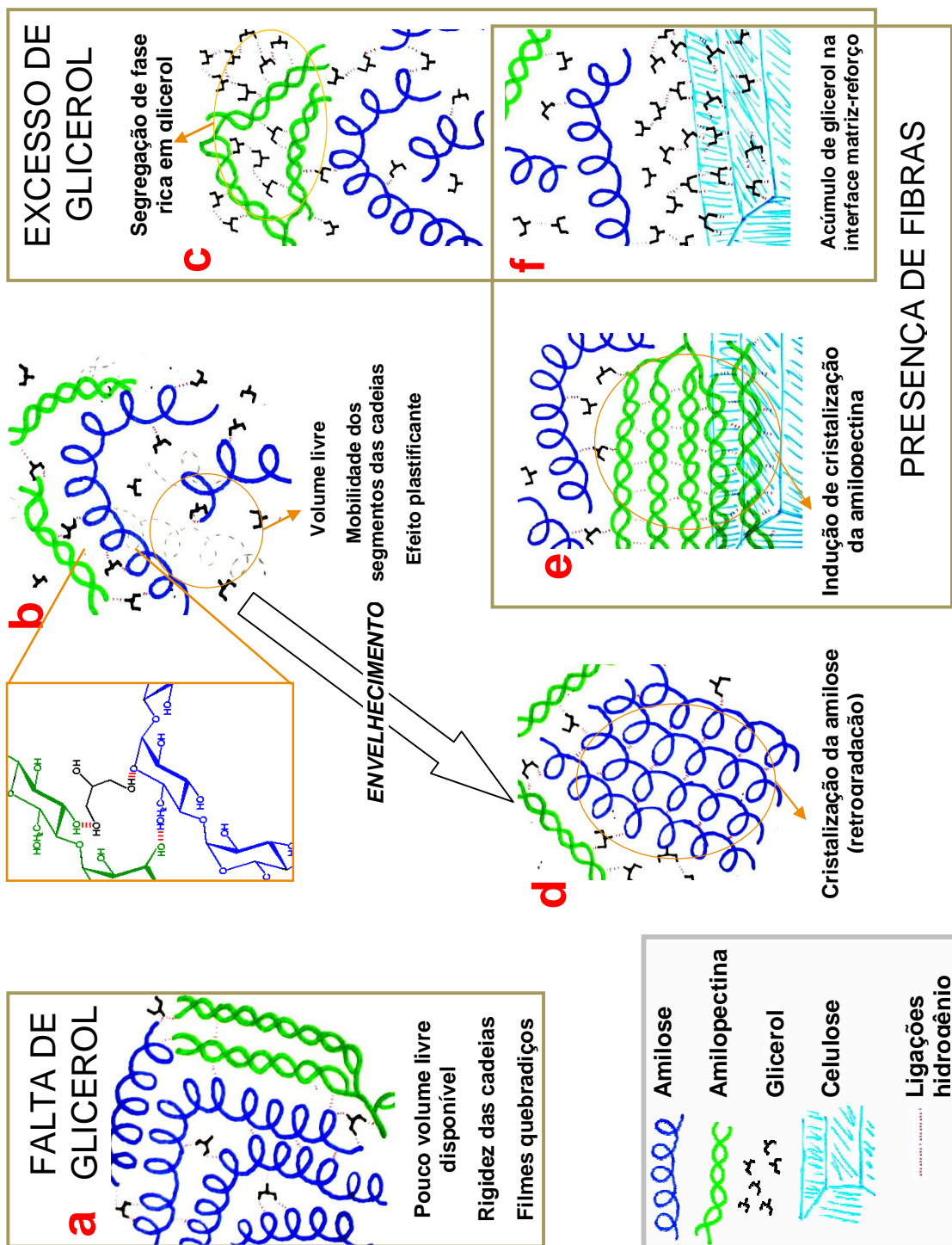


FIGURA 2.16 - INTERAÇÕES ENTRE OS COMPONENTES DOS FILMES - (a) EFEITO ANTIPLASTIFICANTE DO GLICEROL EM BAIXA CONCENTRAÇÃO; (b) EFEITO PLASTIFICANTE DO GLICEROL E INTERAÇÃO COM AS CADEIAS DO AMIDO; (c) SEGREGAÇÃO DO GLICEROL EM EXCESSO; (d) RETROGRADAÇÃO DA AMILOSE DURANTE O ENVELHECIMENTO DO FILME; (e) TRANSCRISTALINIDADE DA AMILOPECTINA, INDUZIDA PELA PRESENÇA DE NANOFIBRAS DE CELULOSE; (f) ACÚMULO DE GLICEROL EM EXCESSO NA INTERFACE ENTRE AMIDO E NANOFIBRAS

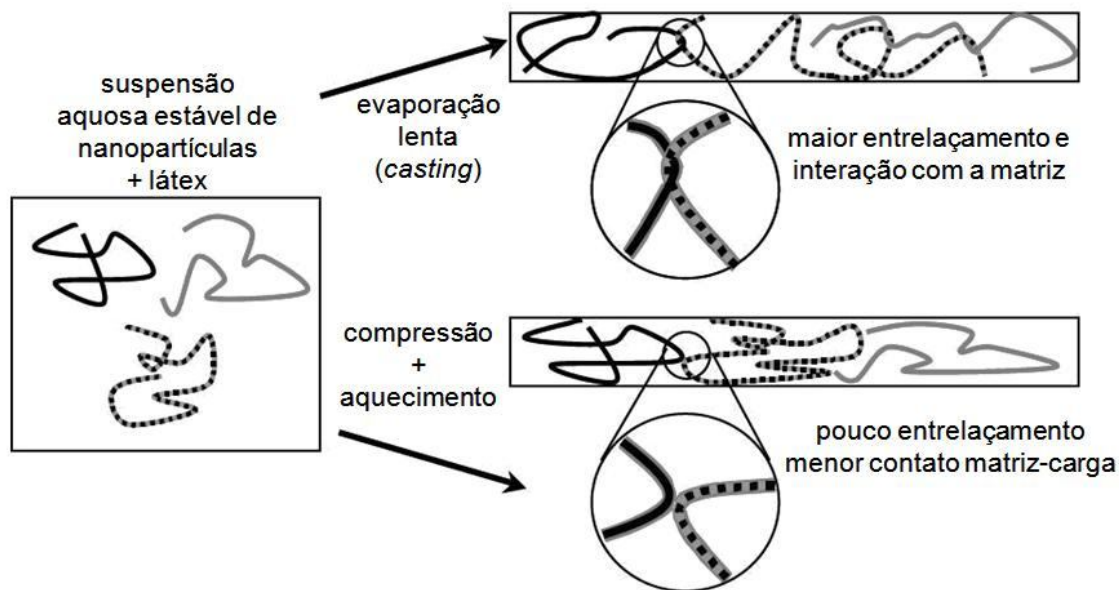


FIGURA 2.17 – FORMAÇÃO DE REDE DE NANOFIBRAS EM COMPÓSITOS PREPARADOS POR CASTING (SAMIR *et al.*, 2005)

#### 2.1.4 Efeitos de escala nas propriedades mecânicas

Para verificar de que forma a organização da matéria em estruturas nanométricas influencia nessas propriedades, é preciso primeiro compreender que características estruturais conferem a um material maior ou menor resistência mecânica. Considere-se, por exemplo, um material monocristalino perfeito. Nele, todos os átomos ocupam posições bem determinadas no retículo cristalino. No entanto, materiais reais não costumam ser cristais perfeitos, nem são constituídos de apenas um domínio cristalino (com raras exceções).

Num cristal perfeito, os planos cristalinos repetem-se monotonamente por toda a extensão do cristal. No entanto, pode ocorrer que parte dos átomos de um determinado plano esteja ausente. Os átomos dos planos adjacentes irão se acomodar para ocupar o espaço resultante, gerando uma **discordância**, representada pelo símbolo  $\perp$  na Fig. 2.18 (CALLISTER, 2006).

Essas discordâncias formam-se geralmente durante o processo de solidificação de um material e são um “ponto fraco” na estrutura do mesmo: ao ser submetido a uma tensão, a discordância migra no interior do material, levando a uma deformação plástica.

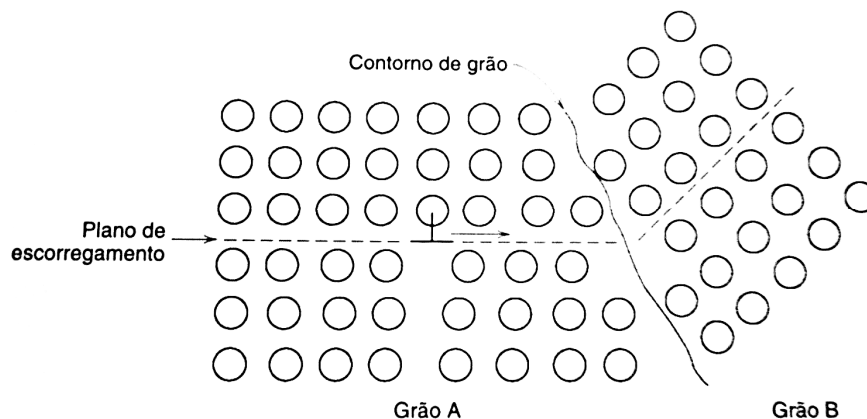


FIGURA 2.18 – DISCORDÂNCIA E CONTOURO DE GRÃO EM UM MATERIAL POLICRISTALINO (CALLISTER, 2006)

A deformação plástica produzida pela migração de uma discordância é limitada à distância que a mesma pode percorrer ao longo de um **plano de escorregamento**. Caso esse plano encontre uma região de fronteira entre dois domínios cristalinos – um **contorno de grão** – o avanço da discordância será dificultado, devido à mudança de direção no seu deslocamento. Quanto maior o ângulo dessa mudança, maior a dificuldade de propagação da deformação (MANN, 2007; CALLISTER, 2006).

Materiais com domínios cristalinos menores possuem uma maior proporção de contornos de grão. Portanto, o caminho médio percorrido pelas discordâncias é menor, sendo necessária uma maior tensão para provocar o rompimento do material, ou seja, o limite de resistência à tração é maior. Materiais **nanocristalinos**, cujos domínios cristalinos apresentam dimensões nanométricas, são, portanto, muito mais resistentes do que os materiais comuns. Há uma relação entre o limite de escoamento  $Y$  e o diâmetro médio dos grãos  $d_g$  conhecida como **relação de Hall-Pertch** ((MANN, 2007):

$$Y = Y_0 + k_{HP}d_g^{-1/2} \quad (5)$$

onde  $Y_0$  é o limite de escoamento de um monocristal e  $K_{HP}$  é uma constante.

Num sólido real, alguns átomos da estrutura cristalina podem estar fora de suas posições ideais. Pode haver uma **lacuna** na estrutura, ou seja, um espaço não ocupado pelo átomo correspondente. Um átomo pode também estar deslocado de sua posição, ocupando um espaço no qual deveria haver um vazio; temos então um

**intersticial** (CALLISTER, 2006). Tais defeitos na estrutura cristalina também reduzem a resistência do material.

As propriedades de uma nanocompósito dependem não só das características de seus componentes, mas também de sua morfologia e características interfaciais. A transição de micropartículas para nanopartículas leva à mudanças dramáticas nas propriedades físicas. Materiais em escala nanométrica têm alta área superficial para um dado volume; uma vez que interações químicas e físicas importantes são governadas por propriedades superficiais, um material nanoestruturado pode ter propriedades muito diferentes de um material macroscópico com a mesma composição (HUSSAIN *et al.*, 2006). A presença de um material de reforço nanoestruturado pode aumentar consideravelmente o módulo de elasticidade e a tensão máxima suportada por um compósito. O mecanismo responsável por tal aumento está relacionado, segundo TJONG (2006), à maior dificuldade de propagação de fraturas no material. As fraturas localizam-se preferencialmente na interface matriz-reforço. Como a área superficial do reforço é muito elevada, tais fraturas diminutas ajudam a redistribuir as tensões no interior do material, dificultando sua ruptura (fig. 2.19).

Isso também explica por que são necessárias quantidades muito menores de reforço nanométrico para atribuir ao material propriedades equivalentes ao de um compósito com reforço micrométrico (TJONG, 2006).

No caso da utilização de nanofibrilas de celulose como reforço em compósitos, além do aumento do módulo e da tensão máxima é também observado um aumento na temperatura de fluência. Esse efeito é explicado pela formação de uma rede rígida de nanofibrilas estabilizada por ligações hidrogênio, que impede a fluência da matriz polimérica e leva a um reforço mecânico pronunciado (DALMAS *et al.*, 2006). O entrelaçamento das nanofibrilas também desempenha um papel importante nesse reforço (SAMIR *et al.*, 2005).

Embora os métodos de determinação de propriedades mecânicas estejam bem estabelecidos para materiais macroscópicos, poucos desses métodos podem ser aplicados diretamente a situações que envolvam nanoestruturas, por uma série de motivos. A necessidade de se manipular objetos com dimensões com várias ordens de grandeza menores do que os corpos de prova utilizados em equipamentos, ou de realizar indentações que penetrem apenas um filme superficial

de alguns nanômetros de espessura, são apenas dois exemplos de como os ensaios mecânicos convencionais precisam ser modificados.

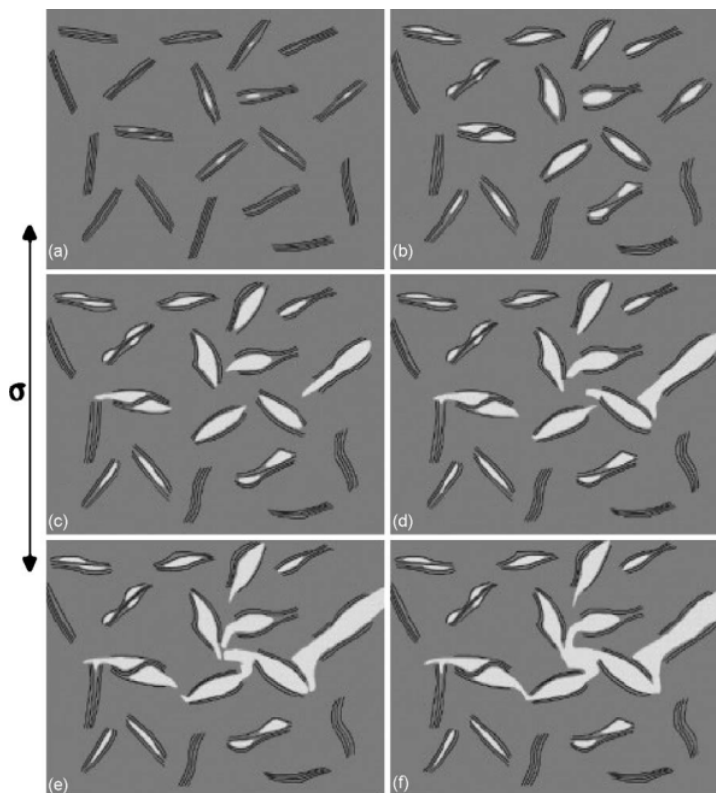


FIGURA 2.19 – PROPAGAÇÃO DE FRATURAS EM UM NANOCOMPÓSITO.  $\sigma$  INDICA O SENTIDO DA TENSÃO APLICADA (TJONG, 2006)

Uma das técnicas utilizadas para determinar as propriedades mecânicas de nanofibras é a espectroscopia Raman. STURCOVA *et al.* (2005) utilizaram o espectro Raman para estimar o módulo de elasticidade de nanofibrilas (*nanowhiskers*) de celulose utilizadas como reforço estrutural num compósito celulose-resina epóxi. Uma amostra do compósito foi submetida a um ensaio de flexão e o espectro Raman da amostra foi obtido antes e durante a flexão, na região da banda de  $1095\text{ cm}^{-1}$  (fig. 2.20), que corresponde ao alongamento das ligações C-O na cadeia da celulose, que é praticamente paralelo ao eixo da cadeia e é o mais sensível aos efeitos de deformação da cadeia.

Ao deformar a amostra, a banda de  $1095\text{ cm}^{-1}$  desloca-se para valores menores de número de onda. Esse deslocamento é linearmente proporcional à deformação da fibra até 0,8%. De acordo com a modelagem matemática apresentada por Krenschel (STURCOVA *et al.*, 2005), a taxa com que a banda varia

com a deformação ( $d(\Delta v)/d\epsilon$ ) é proporcional ao módulo de elasticidade da fibra de acordo com a equação

$$E = (d\sigma/d\Delta v) \times (d\Delta v/d\epsilon) \quad (6)$$

A partir desse modelo, pode-se estimar o módulo de uma única nanofibrila de celulose em 143 GPa (STURCOVA *et al.*, 2005).

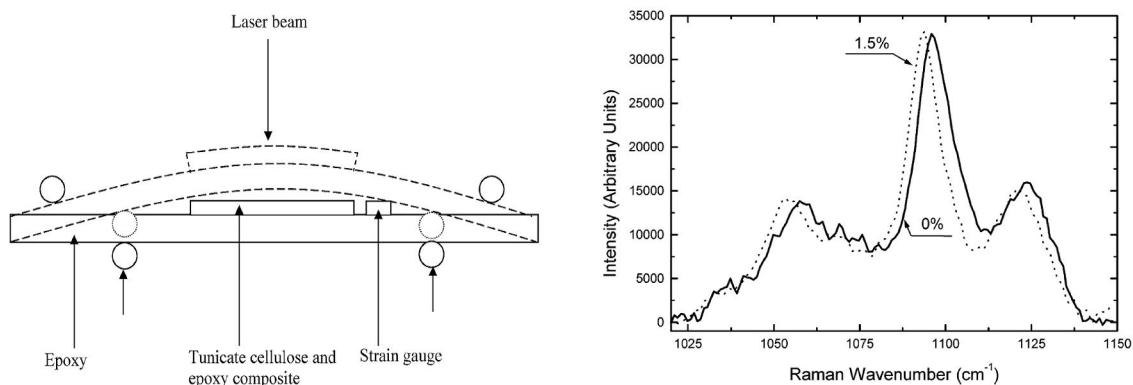


FIGURA 2.20 – ENSAIO DE FLEXÃO REALIZADO NO COMPÓSITO CELULOSE-RESINA EPÓXI E ESPECTRO RAMAN ANTES (LINHA CONTÍNUA) E DURANTE (LINHA PONTILHADA) A FLEXÃO (STURCOVA *et al.*, 2005)

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 CELULOSE BACTERIANA

A celulose bacteriana foi fornecida pela Membracel Produtos Tecnológicos Ltda., empresa com sede em Almirante Tamandaré, PR. Apresenta-se em mantas translúcidas com espessura de cerca de 1 cm. A água retida no interior das mantas é eliminada facilmente por prensagem das mesmas entre dois pedaços de tecido ou papel-toalha, reduzindo muito o seu volume. Após secagem, a manta resulta em uma película muito resistente à tração, porém pouco plástica e pouco resistente ao rasgo.

As mantas de celulose foram recebidas com seu conteúdo de umidade original. Segundo o fabricante, o material passa por um processo de lavagem em solução diluída de hidróxido de sódio para eliminação das bactérias, seguido de branqueamento com hipoclorito e lavagem até neutralização. Para eliminar totalmente resíduos do hipoclorito utilizado no processo de purificação da celulose, a mesma foi imersa em água destilada ao ser recebida. Trocas diárias da água foram realizadas até pH constante, o que corresponde em média a cinco lavagens.

##### 3.1.1 Determinação do teor de matéria seca da celulose

A massa seca das mantas de celulose foi determinada adicionando-se uma massa conhecida de amostra a cadinho previamente tarado e colocando-a em estufa aquecida a 105°C por duas horas. A amostra foi então resfriada em dessecador a vácuo e pesada. A operação foi repetida até massa constante. A massa seca é a razão entre a massa final e a massa inicial da amostra, expressa em porcentagem.

##### 3.1.2 Determinação do teor de celulose no material seco

O teor de celulose das mantas foi estimado através da hidrólise ácida da celulose por ácido sulfúrico método de Klason, seguida da determinação dos produtos de hidrólise por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). O procedimento adotado foi o mesmo de PITARELO (2007).

Uma quantidade conhecida de manta de celulose, previamente seca em estufa a 105°C, foi tratada com ácido sulfúrico a 72% por um período de 1 h sob agitação constante. Após este tempo, a mistura foi diluída até uma concentração de 3% de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e aquecida em autoclave (118°C) por 1 h para promover a hidrólise total de oligo e polissacarídeos. O hidrolisado foi centrifugado a 14000 rpm por 20 min, filtrado em membrana de nylon de 0,45 µm e analisado em sistema cromatográfico Shimadzu modelo LC10AD, provido de um amostrador automático SIL10A, degaseificador de fase móvel DGU 14A, forno de aquecimento de coluna CTO 10A, detectores RI10A para índice de refração e SPD-M10Zvp para espectrofotometria no ultravioleta. A coluna utilizada foi uma Aminex HPX-87H (Bio-Rad) a 65°C, precedida de pré-coluna Cation-H. A fase móvel, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 8 mMol L<sup>-1</sup> foi eluída a uma vazão de 0,6 mL min<sup>-1</sup>. A quantificação foi efetuada por padronização externa, com base em curvas de calibração obtidas para cada componente monitorado: celobiose, glucose, xilose, arabinose, hidroximetilfurfural e furfural. Os teores obtidos de glucose e furfural foram multiplicados por seus fatores de hidrólise (0,90 e 0,70 respectivamente) visando obter seus equivalentes em anidrogucose. Estes foram somados e expressos em relação ao peso seco do material original.

### 3.2 AMIDOS

Amidos comerciais da Corn Products Brasil – amido de milho nativo Amidex 3001 e amido de milho ceroso (alto teor de amilopectina) Amidex 4001 foram usados para testes preliminares. Posteriormente, foram testadas outras amostras de amido, também fornecidas pela Corn Products. O **amido I** é um amido de mandioca nativo, ou seja, não submetido a nenhum processo de modificação, contendo 17% de amilose. O **amido I<sub>m</sub>** é resultante da modificação física do amido I por pré-gelatinização. O **amido II** é um amido de milho nativo com 27% de amilose e o **amido II<sub>m</sub>**, a modificação química do amido II por hidrólise ácida.

O teor de umidade dos amidos foi determinado pelo mesmo procedimento citado no Item 3.1.1. Difractogramas de raios X dos amidos foram obtidos em difratômetro Shimadzu XRD 6000 com radiação de Cu Kα (λ = 0,15418 nm), 40 kV e 40 mA, velocidade de varredura 0,5° min<sup>-1</sup>.

### 3.3 PREPARAÇÕES ENZIMÁTICAS

Para a desagregação da celulose bacteriana por hidrólise enzimática, foi investigado o uso de duas preparações enzimáticas. A primeira, uma mistura da celulase comercial Celluclast 1.5L e da beta-glucosidase Novozym 188 (Novozymes), a partir de agora denominada **mistura CN**. A mistura CN contém todos os componentes do complexo celulásico de *Trichoderma* citados no item 2.1.1.5, apresentando atividade celulásica completa (endo e exoglucanásica). Experimentos prévios com outros substratos celulósicos (PITARELO, 2007) determinaram a proporção volumétrica ideal entre as duas soluções comerciais em 50:15.

A segunda preparação foi fornecida pela Röhme Enzyme Finland Oy e constitui-se quase exclusivamente de endoglucanases. Esta foi produzida por fermentação de cepas recombinantes de *T. reesei*. Genes do genoma do fungo que codificam componentes enzimáticos do complexo celulásico (as celobiohidrolases CBH I e CBH II) foram suprimidos ou tiveram sua expressão reprimida, numa técnica conhecida como “high-frequency gene replacement” (ZANDONÁ Filho, 2001; RAMOS *et al.*, 1999). Tal preparação será denominada **CBHI/II-**, seguindo a nomenclatura adotada nesses trabalhos.

#### 3.3.1 Determinação das atividades das preparações enzimáticas

As atividades dessas preparações enzimáticas foram determinadas por dois métodos. A **atividade celulásica total** seguiu o método proposto por GHOSE (1986) com algumas modificações (MARTINS, 2005). O método baseia-se na quantificação dos açúcares redutores totais produzidos pela hidrólise de papel de filtro. O ácido 3,5-dinitro-salicílico (DNS) reage com os carboidratos, sofrendo redução de um de seus grupos nitro e formando um composto que apresenta forte absorção em 540 nm (fig. 3.1).

Tiras de aproximadamente 1 x 8 cm (70 mg) de papel de filtro Whatman #1 foram enroladas e adicionadas a tubos de ensaio pré-incubados a 50°C contendo 1 mL de tampão citrato 0,05M (pH 4,8) e 1 mL da solução enzimática em, no mínimo, três diluições diferentes e suficientes para produzir em torno de 1 mg/mL de açúcares redutores. Após 1 h de incubação, a hidrólise foi interrompida pela adição

de 3 mL de DNS. O meio reacional foi então colocado em banho de água fervente por exatamente 5 min e, em seguida, resfriado em banho de água gelada. Uma alíquota de 1 mL foi retirada e diluída a 4 mL. A absorvância da amostra foi então medida a 540 nm em espectrofotômetro Cary 100 e a concentração dos açúcares redutores foi determinada contra uma curva de calibração de padrões de glucose.

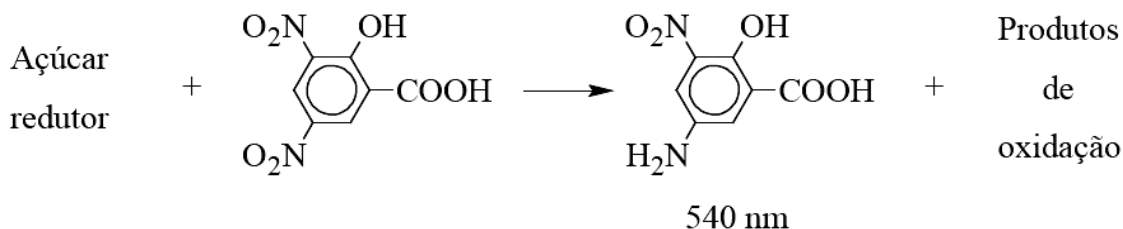


FIGURA 3.1 - REAÇÃO DE AÇÚCARES REDUTORES COM O DNS (MARTINS, 2005)

A atividade enzimática (UFP) foi calculada através da equação:

$$\text{UFP/mL} = \frac{\text{ART (mg/mL)} \cdot E_{\text{dil}} \cdot V_{\text{T}} \text{ (mL)}}{\text{Tempo (min)} \cdot 1 \mu\text{mol glucose (0,18 mg)} \cdot V_{\text{E}} \text{ (mL)}} \quad (7)$$

onde ART é a atividade redutora total (1 mg/mL),  $E_{\text{dil}}$  é a diluição da enzima necessária para atingir tal atividade,  $V_{\text{T}}$  é o volume do meio reacional e  $V_{\text{E}}$  é o volume de amostra utilizado.

A **atividade endoglucanásica** das enzimas foi determinada por método semelhante, porém usando como substrato a carboximetilcelulose de média viscosidade (GHOSE, 1986; MARTINS, 2005). Foram preparadas três diluições diferentes da solução enzimática, sendo estas suficientes para produzir em torno de 0,5 mg/mL de açúcares redutores. Alíquotas de 0,5mL foram incubadas a 50°C e a reação foi iniciada pela adição de 0,5 mL de uma solução de CMC a 2% em tampão citrato, previamente desaerada sob vácuo. A reação foi interrompida após 30 min pela adição de 3 mL de DNS, procedendo-se a seguir como no método anterior. A atividade endoglucanásica (UCMC) foi calculada através da expressão:

$$\text{UCMC/mL} = \frac{\text{ART (mg/mL)} \cdot E_{\text{dil}} \cdot V_{\text{T}} \text{ (mL)}}{\text{Tempo (min)} \cdot 1 \mu\text{mol glucose (0,18 mg)} \cdot V_{\text{E}} \text{ (mL)}} \quad (8)$$

### 3.3.2 Teor de proteínas das preparações enzimáticas

O teor de proteínas das preparações enzimáticas foi determinado pelo método de Lowry, conforme descrito em GHOSE (1986). O método baseia-se na reação de uma mistura de ácido fosfomolibdico e ácido fosfotungstico, o reagente de Folin-Ciocalteu, que sofre uma redução quando reage com proteínas na presença de cobre (II) e produz um composto com forte absorvância em 750 nm. A redução ocorre através das cadeias laterais de alguns aminoácidos (tirosina, triptofano, cisteína, asparagina e histidina) que contribuem com 4 elétrons, ou através da retirada de 2 elétrons de cada unidade tetrapeptídica que é facilitada com a formação do quelato com o cobre (II) (MARTINS, 2005).

A 1 mL de amostra, diluída em tampão citrato de sódio-ácido cítrico (pH 4,8) na proporção 1:100, foi acrescentado 1 mL de solução de ácido percloroacético a 1%. Após centrifugação a 2000 rpm por 25 min, o sobrenadante foi descartado e o precipitado dissolvido em 1 mL do “reagente A” (solução aquosa de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  e NaOH). A 0,5 mL dessa mistura foi adicionado 5 mL de “reagente C” (mistura de soluções aquosas de sulfato cúprico e de tartarato duplo de sódio e potássio), misturado bem e deixado em repouso por 10 min. Adicionou-se então 0,5 mL de “reagente fenol” (reagente de Folin-Ciocalteu 2N diluído em igual volume de água) e aguardou-se 30 min. Após esse tempo, a transmitância a 750 nm foi lida em espectrofotômetro UV-VIS. Os resultados foram comparados com os de uma curva de calibração de albumina de soro bovino dissolvida na mesma solução-tampão.

### 3.4 DESAGREGAÇÃO MECÂNICA DA CELULOSE

As primeiras tentativas de desagregação da celulose bacteriana foram realizadas em moinho vibratório (Fritsch Pulverisette 0) com esfera de ágata. Aproximadamente 10 g do material foram submetidos a duas sessões de 30 min de moagem em agitação máxima. Outras tentativas envolveram a utilização do processador ultrassônico (Vibra-Cell VC-505, Sonics & Materials Inc.) do Laboratório de Biopolímeros deste Departamento. Neste caso, 5 g da manta foram adicionados a um tubo de ensaio juntamente com 10 mL de água, sendo então sonicados por 2 horas em 4 sessões de 30 minutos, a uma potência de 175 W. Finalmente, as mantas foram moídas em um moinho de bolas (Marconi MA500) com esferas de

porcelana. Uma manta de celulose com cerca de 230 g foi colocada no jarro do moinho; 100 mL de água foram adicionados a fim de aumentar um pouco o volume da mistura, visto que o jarro disponível tinha capacidade de 5 L, bem acima do volume disponível de manta celulósica. Foram então acrescentadas esferas de porcelana e o material foi moído por 15 h, em duas sessões de 8 h e 7 h, com pernoite em geladeira.

Após a retirada da suspensão resultante, foram acrescentados 200 mL de água ao jarro na tentativa de desagregar os pedaços de celulose que haviam ficado aderidos às esferas. Para verificar a contaminação das amostras por material resultante do desgaste dessas esferas, foi determinado o teor de cinzas da suspensão resultante da moagem, de acordo com a norma TAPPI T211 om-93: calcinação por uma hora a 575°C, em cadinho previamente calcinado.

### 3.5 DESAGREGAÇÃO ENZIMÁTICA DA CELULOSE

Antes das hidrólises, as mantas de celulose foram homogeneizadas por 2 minutos em liquidificador. Uma quantidade conhecida de água destilada foi acrescentada sempre que a viscosidade dificultava a homogeneização. A celulose homogeneizada foi mantida em geladeira (cerca de 5°C) com adição de 0,1 mg.L<sup>-1</sup> de azida sódica como conservante. As hidrólises foram realizadas com uma carga enzimática de 10 mg de proteína por grama de substrato, a 45°C e pH 4,8. O pH foi mantido pela adição de 10%, em volume, de tampão citrato de sódio, descontado o volume correspondente à preparação enzimática. A temperatura e o pH ótimos para a atividade das enzimas foram determinados em outro estudo (ZANDONÁ, 2001).

Alíquotas de 50 mL da mistura de celulose e tampão foram acondicionadas em erlenmeyers de 250 mL, em um *shaker* com movimento planetário (150 rpm) e controle de temperatura. Ao estabilizar a temperatura, foi acrescentada a preparação enzimática. Em cada procedimento, um controle de celulose sem adição de enzimas foi mantido. As hidrólises foram realizadas em tempos variáveis: 20 a 80 min no caso da mistura CN e 20 a 240 min para a CBHI/II-. Após esse tempo, os erlenmeyers foram imediatamente mergulhados em banho a 100 °C por 5 min para inativação das enzimas e em seguida em um banho de gelo. Parte do substrato original foi guardado em congelador; o restante foi centrifugado a 9900 RPM por 30 min e lavado com água destilada sucessivas vezes, até pH constante (Fig. 3.2). O teor de

celulose na pasta resultante foi determinado a partir da massa seca, pelo mesmo procedimento adotado no item 3.1.1.

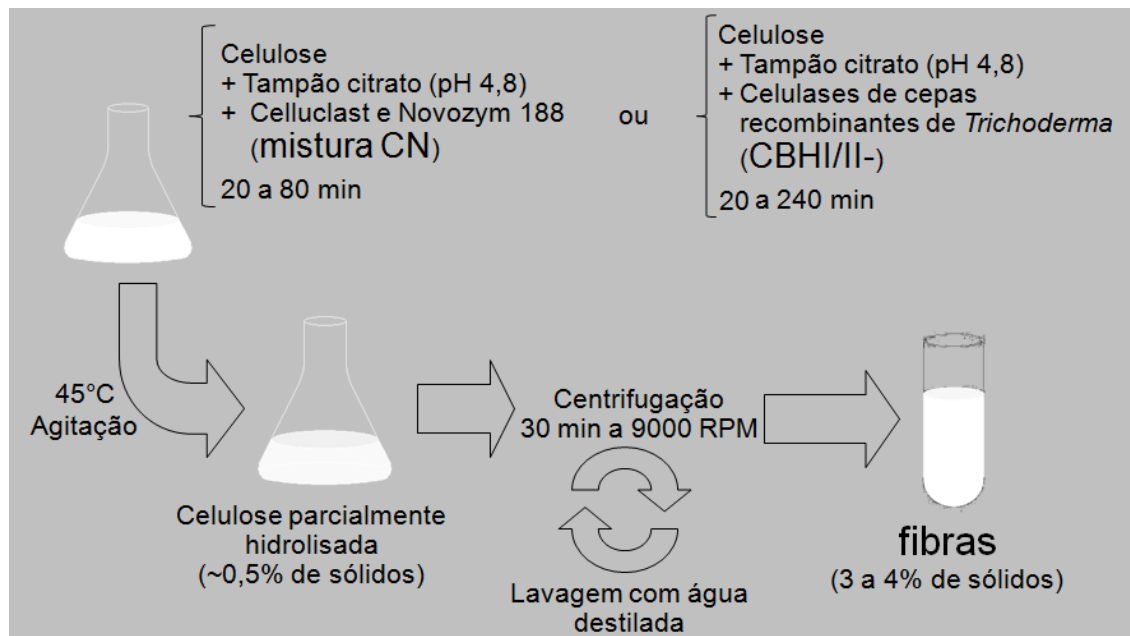


FIGURA 3.2 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA OBTENÇÃO DAS FIBRAS POR HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

### 3.5.1 Acompanhamento da evolução das hidrólises

#### 3.5.1.1 Determinação do poder redutor total dos hidrolisados

O acompanhamento da evolução das hidrólises foi realizado por dois métodos. O primeiro foi a determinação do teor de açúcares redutores totais no substrato, através do método de Somogyi-Nelson (CHAPLIN e KENNEDY, 1994). Nesse método, os açúcares redutores são oxidados em meio alcalino por uma solução do íon cobre (II), o qual é reduzido a óxido de cobre (I). A adição de sulfato de sódio minimiza a entrada de oxigênio na solução, responsável pela reoxidação do óxido cuproso. Numa segunda etapa, os íons cobre (I) são oxidados de volta a cobre (II) por um complexo incolor de arsenomolibdato que se reduz a óxido de molibdênio dando a cor azul característica. Finalmente a absorbância a 520 nm é medida e comparada com padrões preparados com concentrações conhecidas de um açúcar redutor.

As amostras foram primeiramente diluídas de forma a ficarem dentro da faixa de sensibilidade do método (10 a 100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). A alíquotas de 1,0 mL das amostras diluídas adicionou-se 1,0 mL de uma solução aquosa recentemente preparada de tartarato duplo de sódio e potássio (sal de Rochelle), carbonato de sódio, sulfato de sódio e sulfato de cobre. A solução foi agitada e colocada em banho-maria por 15 min. Adicionou-se então 1 mL de uma solução de molibdato de amônio, arsenito ácido de sódio e ácido sulfúrico. Adicionou-se 3,0 mL de água, filtrou-se em lã de vidro e mediu-se a absorbância a 520 nm.

### 3.5.1.2 Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

O segundo método empregado para acompanhamento das hidrólises foi a determinação de glucose e celobiose liberados no meio de hidrólise. Para isso, os hidrolisados foram centrifugados a 14000 rpm por 30 min para separação da fração sólida e o sobrenadante foi analisado pelo mesmo sistema cromatográfico descrito no item 3.1.2.

## 3.6 CARACTERIZAÇÃO DAS FIBRAS OBTIDAS

### 3.6.1 Difractometria de raios X (XRD)

A fim de verificar possíveis mudanças de cristalinidade, organização cristalina e dimensões relativas dos cristalitos de celulose, foram obtidos difratogramas de raios X do controle (celulose não submetida a hidrólise) e das alíquotas de celulose parcialmente hidrolisada.

Para evitar a recristalização das cadeias de celulose durante o procedimento de secagem, o que poderia levar a estimativas exageradas de cristalinidade, optou-se pela troca de solvente (álcool terc-butílico) seguida de liofilização (RAMOS, 1992). 1,0 g de cada amostra foi acondicionado em tubo de centrífuga e 6 mL de uma solução de álcool terc-butílico foram então acrescentados. A mistura foi agitada vigorosamente até dispersão dos sólidos e então centrifugada por 20 min a 10.000 RPM. Após descarte do sobrenadante, o procedimento foi repetido com uma solução de maior concentração do álcool. As proporções utilizadas foram, em porcentagem

volumétrica, de 30%, 50%, 70%, 90% e, finalmente, álcool terc-butílico puro. As amostras foram então liofilizadas e comprimidas em porta-amostras de alumínio.

Os difratogramas de raios X foram obtidos em difratômetro Shimadzu XRD 6000 com radiação de Cu K $\alpha$  ( $\lambda = 0,15418$  nm), 40 kV e 40 mA, velocidade de varredura  $0,5^\circ \cdot \text{min}^{-1}$ . A cristalinidade das amostras de celulose foi obtida a partir do método proposto por CHEN *et al.* (2007). Cinco picos de difração relacionados à rede cristalina da celulose I e um pico largo, centrado próximo a  $2\theta = 20^\circ$ , relacionado ao halo amorfo, foram ajustados aos difratogramas utilizando-se o ajuste gaussiano de picos do software Origin 8 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA). O índice de cristalinidade ( $I_c$ ) foi calculado pela expressão:

$$I_c = \frac{\text{área total do difratograma} - \text{área do halo amorfo}}{\text{área total do difratograma}} \quad (9)$$

Os picos obtidos o ajuste foram também utilizados para estimar as dimensões dos cristalitos de celulose, conforme indexados por ELLAZOUZI-HAFRAOUI *et al.* (2008), utilizando-se a Equação de Scherrer:

$$d_{hkl} = \frac{0,9 \times \lambda}{\beta_{1/2} \times \cos \theta} \quad (10)$$

onde  $\lambda$  é o comprimento de onda da radiação em nm,  $\beta_{1/2}$  é a largura do pico a meia altura em radianos e  $\theta$  é o ângulo de difração. O fator de forma 0,9 é válido para partículas esféricas; no entanto, como os resultados serão utilizados apenas de forma comparativa, isso não representa um problema.

### 3.6.2 Determinação da distribuição de massas moleculares da celulose

A distribuição de massas moleculares da celulose, antes e depois dos procedimentos de hidrólise enzimática, foi determinada utilizando cromatografia de permeação em gel (GPC), segundo o procedimento adotado por ZANDONÁ Filho (2001). As amostras foram carbaniladas e seus derivados comparados com curvas de calibração de poliestireno.

A carbanilação da celulose (Fig. 3.3) foi realizada com o objetivo de obter um derivado de celulose solúvel na fase móvel utilizada, tetrahydrofurano (THF). As amostras (cerca de 30 mg) foram secas a 60 °C em estufa a vácuo, suspensas em dimetil-sulfóxido (3 mL) e então reagidas com isocianato de fenila (0,30 mL) em tubos de ensaio fechados, por 48 h a 80 °C, com agitação ocasional. Após esse período, a mistura resultante foi precipitada em metanol, O precipitado foi filtrado, lavado com metanol, seco em dessecador sob vácuo contra sílica gel e acondicionado sob refrigeração em vial.

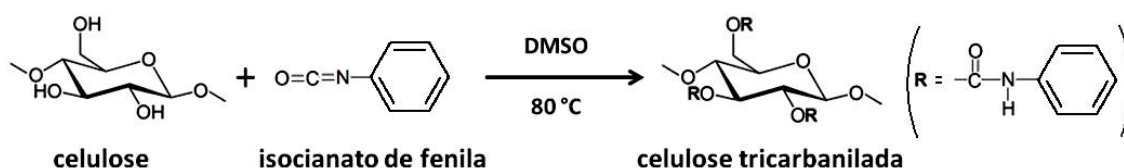


FIGURA 3.3 – REAÇÃO DE CARBANILAÇÃO DA CELULOSE

As amostras foram solubilizadas em THF (1,00 mL) e analisada em equipamento Shimadzu LC10AD, com uma coluna de guarda e quatro colunas Tosoh TSK Gel (7,8 x 300 mm) com limites de exclusão equivalentes a  $4.10^7$ ,  $4.10^5$ ,  $6.10^4$  e  $1.10^3$  unidades de massa atômica. A fase móvel utilizada foi THF a uma vazão de  $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ . O volume de injeção foi de  $20 \mu\text{L}$ . O eluato de sistema foi monitorado por um detector de absorção no ultravioleta Shimadzu SPD-10A em comprimento de onda de 254 nm.

Na ausência de padrões de celulose para permeação em gel, foram utilizados padrões monodispersos de poliestireno com massa molecular entre 17500 e 8420000 unidades de massa atômica. A partir dos volumes de retenção apresentados pelos padrões, foi traçada uma curva padrão. Os parâmetros universais utilizados para a calibração (coeficientes de Mark-Houwink) foram  $K_p = 1,18.10^{-4}$  e  $\alpha_p = 0,74$  para o poliestireno,  $K_c = 2,01.10^{-5}$  e  $\alpha_c = 0,92$  para a celulose tricarbamilada (VALTASAARI e SAARELA, 1975).

O cálculo da massa molecular foi realizado pelo método da calibração universal (RAMOS, 2001), segundo a equação

$$\ln M_c = \frac{(1 + \alpha_p) \ln M_p + \ln (K_p/K_c)}{1 + \alpha_c} \quad (11)$$

onde  $M_c$  é a massa molecular da celulose tricarbamilada e  $M_p$  é a massa molecular do padrão. A partir daí foram calculadas a média aritmética das massas moleculares,  $M_N$  e a média ponderada das massas moleculares,  $M_W$ . O grau de polimerização (DP) foi calculado pela relação  $DP = M / 519$  onde o denominador corresponde à massa molecular de uma unidade de anidroglicose tricarbamilada. Por fim, a polidispersão das amostras foi calculada pela relação  $DP_W / DP_N$ .

### 3.6.3 Microscopia eletrônica de varredura

Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) das fibras foram obtidas no microscópio eletrônico JEOL JSM-6360, do Centro de Microscopia Eletrônica (CME) da UFPR, com tensão de aceleração de 15 kV e magnificações de 1000 a 20000 vezes. As fibras foram dispersas em água destilada, gotejadas sobre um porta-amostras de alumínio e secas a 60 °C em estufa a vácuo. Para evitar acúmulo de cargas e conseqüente destruição das amostras, as mesmas foram recobertas por uma camada de ouro.

### 3.6.4 Microscopia de força atômica

As fibras foram também observadas através de microscopia de força atômica (AFM) num equipamento Shimadzu SPM 9500J3 do Departamento de Física da UFPR, no modo dinâmico (*tapping mode*) com magnificações de 5000 a 100000 vezes.

## 3.7 OBTENÇÃO DOS FILMES DE AMIDO PLASTIFICADO

Ensaio preliminares de obtenção de filmes de amido plastificado foram realizados de acordo com o método proposto por WILHELM *et al.* (2003). Glicerol PA (Sigma-Aldrich) foi utilizado como plastificante, na proporção de 30% em relação à massa seca de amido. O amido é inicialmente disperso em água. A dispersão foi então aquecida em balão de fundo chato com agitação magnética vigorosa e uma solução de glicerol a 100 g.L<sup>-1</sup> é acrescentada. Após 30 min de aquecimento, visando à completa gelatinização do amido, a mistura foi vertida em placas circulares de PVC e secada em estufa a vácuo por 24 h (Fig. 3.4). Os filmes foram

então mantidos em condições de temperatura e umidade ambiente por 24 h para facilitar o descolamento das placas.

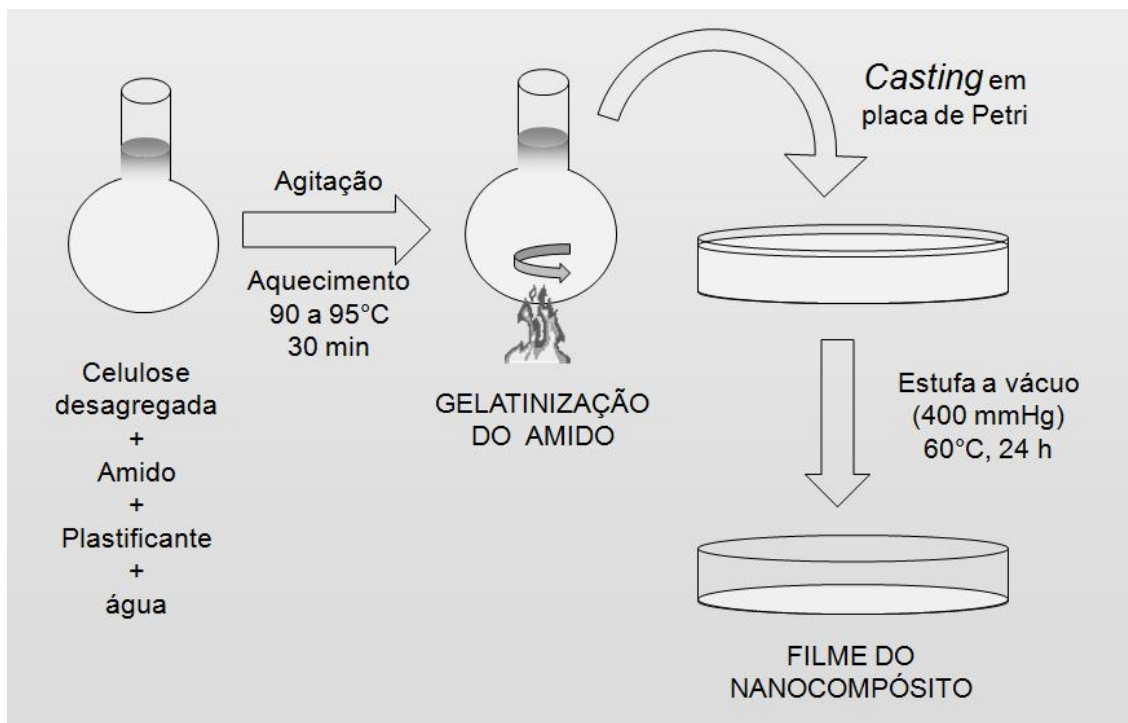


FIGURA 3.4 – OBTENÇÃO DOS FILMES DE NANOCOMPÓSITO POR *CASTING*

Foram testadas várias concentrações da mistura de amido, visando estabelecer um compromisso entre viscosidade e tempo de secagem em estufa. Soluções mais concentradas secam mais rapidamente, porém sua elevada viscosidade leva a perdas na transferência para as placas de Petri e irregularidade na espessura dos filmes. Também foram testadas diferentes temperaturas e tempos de aquecimento para cada amostra de amido. Por último, foram produzidos filmes incorporando as preparações de celulose bacteriana descritas no item 3.1. Essa incorporação deu-se pela adição das suspensões de celulose à mistura de amido, água e glicerol, antes do aquecimento, mediante agitação magnética vigorosa. Todos os filmes foram produzidos com 2,5% de celulose em relação à massa de amido.

### 3.8 CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES OBTIDOS

#### 3.8.1 Preparo e acondicionamento dos corpos de prova

Os corpos de prova foram preparados segundo a norma ASTM D 882 – 95a, com pequenas modificações. Os filmes foram cortados em tiras de 10,0 mm de largura. Na extremidade de cada tira, foi afixada uma fita adesiva plástica, a fim de facilitar a manipulação do corpo de prova. Foi mantida uma seção de 40,0 mm de comprimento entre as fitas, mesmo comprimento da distância entre garras do equipamento.

Os corpos de prova foram acondicionados por 10 dias em atmosfera controlada com umidade relativa de 43%, conforme a norma ASTM E 104 (WILHELM *et al.*, 2003). Uma solução saturada de  $K_2CO_3$  foi colocada no fundo de um dessecador; os filmes foram então suspensos sobre essa solução e o dessecador vedado com graxa de alto vácuo.

#### 3.8.2 Ensaio de tração

Os ensaios de tração foram realizados em uma máquina de ensaios universal Instron 5565, seguindo a já citada norma ASTM D 882 – 95a. A distância entre garras foi de 40,0 mm e a velocidade de separação das garras, de  $4 \text{ mm} \cdot \text{min}^{-1}$ . Foram testados no mínimo 5 corpos de prova de cada amostra.

#### 3.8.3 Difractometria de raios X

Os filmes foram caracterizados através de difratometria de raios X, em condições idênticas às aquelas descritas no item 3.6.1, a fim de verificar o desenvolvimento de cristalinidade nas amostras e a comparação com perfis difratométricos de compósitos de amido plastificado citados na literatura (ANGLÈS e DUFRESNE, 2001; MATHEW e DUFRESNE, 2002; LÓPEZ-RUBIO *et al.*, 2007).

#### 3.8.4 Microscopia óptica e eletrônica de varredura

Imagens de microscopia óptica da superfície e da região de ruptura dos corpos de prova rompidos foram obtidas com ampliações de 50, 200 e 500 vezes.

Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) da região de ruptura dos filmes foram obtidas no microscópio eletrônico JEOL JSM-6360, do Centro de Microscopia Eletrônica (CME) da UFPR, com tensão de aceleração de 15 kV e magnificações de 300 a 5000 vezes (magnificações maiores levam à decomposição da matriz de amido). Os filmes foram colados diretamente sobre o porta-amostras e mantidos em dessecador com sílica-gel por 24 h. As amostras foram recobertas com uma camada de ouro para evitar acúmulo de carga devido à baixa condutividade.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 CARACTERIZAÇÃO DOS MATERIAIS UTILIZADOS

#### 4.1.1 Celulose bacteriana

O teor de matéria seca das mantas de celulose bacteriana variou entre 0,45 e 0,55%, tendo sido determinado a cada novo lote de celulose recebido. O teor de cinzas (em relação à matéria seca) variou de 0,42 a 0,49%.

A análise por HPLC do produto da hidrólise da celulose bacteriana por ácido sulfúrico (ver item 3.1.2) revelou apenas três picos (Fig. 4.1). O primeiro corresponde ao ácido sulfúrico utilizado na hidrólise, cuja retirada não é necessária para a análise. Em seguida eluiu a glucose produzida pela hidrólise da celulose (Fig. 4.2). Os outros monossacarídeos monitorados (xilose e arabinose) não foram detectados, o que indica que o único polissacarídeo presente na amostra é a celulose. O último pico observado no cromatograma é do hidroximetilfurfural (HMF) resultante da desidratação de parte da glucose pela ação do ácido sulfúrico (Fig. 4.3). A glucose foi quantificada a partir da resposta do detector de índice de refração. Já o HMF absorve UV no comprimento de onda de 280 nm, o que permite sua quantificação a partir da resposta do detector de absorção no UV.

A Tab. 4.1 fornece o resultado da determinação do teor de celulose nas mantas a partir de experimento em triplicata. Observa-se que a quase totalidade do material sólido presente nas mantas corresponde a celulose. Deve-se levar em conta que este resultado pode estar subestimado, pois a preparação da amostra para o ensaio envolve uma etapa de secagem, durante a qual o material sofre uma compactação. Isto limita a acessibilidade da celulose ao ataque do ácido, além de poder reter água entre as fibras, cuja presença leva a uma superestimativa da massa inicial da amostra seca.

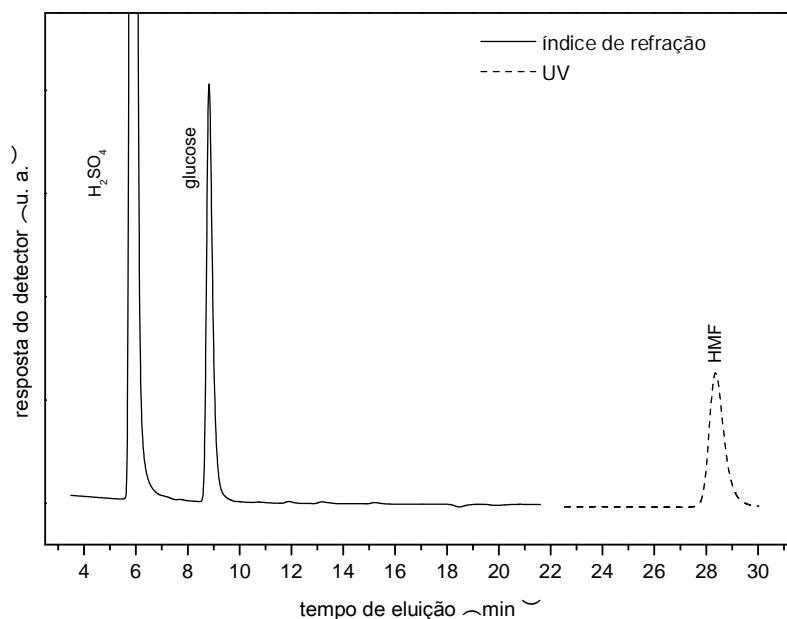


FIGURA 4.1 – PERFIL CROMATOGRÁFICO DO HIDROLISADO DE KLASON DA CELULOSE BACTERIANA, COM DETECÇÃO POR REFRACTOMETRIA DIFERENCIAL E ABSORÇÃO NO UV EM 280 nm

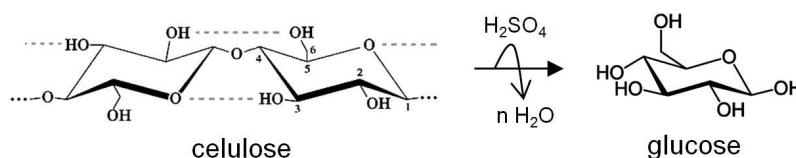


FIGURA 4.2 – REAÇÃO DE HIDRÓLISE ÁCIDA DA CELULOSE

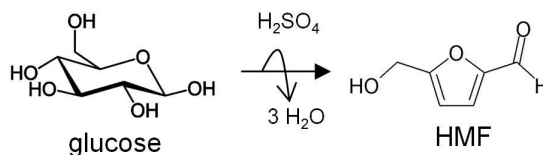


FIGURA 4.3 – REAÇÃO DE DESIDRATAÇÃO DA GLUCOSE

TABELA 4.1 – TEOR MÁSSICO DE CELULOSE DAS MANTAS, EXPRESSO EM RELAÇÃO À MASSA SECA TOTAL

	% como anidroglicose
glucose	93,50 ± 0,73
HMF	3,34 ± 0,08
<b>TOTAL</b>	<b>96,84 ± 0,81</b>

#### 4.1.2 Amidos

Na Fig. 4.4 observam-se difratogramas de raios X das duas variedades de amido efetivamente utilizadas na produção de compósitos: o amido de mandioca nativo (amido I) e o amido de mandioca pré-gelatinizado (amido I<sub>m</sub>). Observam-se no amido I picos de difração associados ao amido tipo C (VAN SOEST e VLIEGENTHART, 1997). O difratograma do amido I<sub>m</sub> mostra apenas um halo amorfo, não evidenciando qualquer tipo de organização interna. Embora não tenhamos acesso às condições do processo de modificação utilizado, a grande semelhança entre o perfil difratométrico deste amido e do utilizado por HULLEMAN *et al.* (1999) permite supor que o mesmo tenha sido submetido à gelatinização em água, seguida de secagem em *spray dryer* e moagem da massa resultante, processo comumente utilizado na produção de amidos pré-gelatinizados.

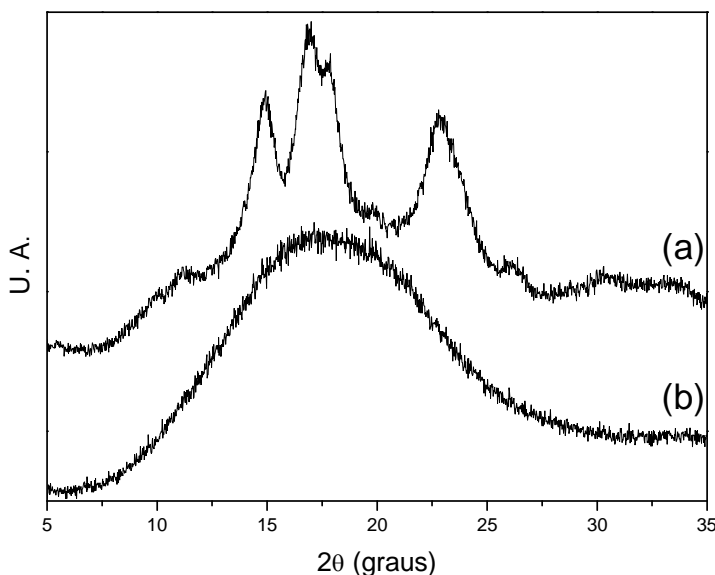


FIGURA 4.4 – DIFRATOGRAMAS DE RAIOS X DO AMIDO MANDIOCA NATIVO (a) E PRÉ-GELATINIZADO INDUSTRIALMENTE (b)

#### 4.1.3 Preparações enzimáticas

A determinação da atividade das preparações enzimáticas utilizadas mostrou-se problemática por uma série de motivos. O primeiro deles diz respeito à limitada quantidade de enzima disponível, o que restringiu o número de ensaios realizados, uma vez que o método proposto por GHOSE (1987) exige o preparo de várias diluições para que se chegue a um resultado confiável. Além disso, o ensaio

de atividade celulásica total, realizado utilizando-se papel de filtro como substrato, produz resultados muito mais baixos para a preparação endoglucanásica (CBH I/II-) do que para a celulase comercial (mistura CN). Isto ocorre porque a primeira preparação carece das celobiohidrolases que liberam em maior escala os açúcares redutores detectados pelo método. Isso implica em um consumo exagerado da CBH I/II- para a realização do ensaio, justamente a enzima para a qual havia maiores restrições quanto à quantidade. Com a atividade endoglucanásica, realizada sobre carboximetilcelulose (CMC), ocorre o inverso: a mistura CN age sobre este substrato com uma intensidade muito menor que a CBH I/II-. Tanto os ensaios de atividade celulásica total da CBH I/II- quanto os de atividade endoglucanásica da mistura CN não forneceram resultados reprodutíveis, razão pela qual foram omitidos aqui. Além de apresentarem grande variância, tais resultados são muito discrepantes dos obtidos por ZANDONÁ Filho (2001) e RAMOS *et al.* (1999) para as mesmas enzimas, embora estes autores tenham seguido o mesmo método que o utilizado aqui.

A determinação da atividade enzimática serviria em princípio como parâmetro de comparação entre as enzimas, visando determinar quantidades equivalentes de enzima a serem utilizadas nos tratamentos enzimáticos das fibras de celulose. No entanto, as duas preparações enzimáticas agem por mecanismos diferentes. Na mistura CN ocorre uma ação sinérgica entre as endoglucanases, celobiohidrolases e  $\beta$ -glucosidases, enquanto na CBH I/II- ocorre apenas a ação endoglucanásica. É, portanto, questionável atribuir algum significado à comparação direta entre atividades.

O teor de proteínas acabou sendo escolhido como parâmetro quantitativo para a determinação da quantidade de preparação enzimática utilizada na desagregação da celulose. Apesar de não ser possível garantir que toda proteína presente nas preparações corresponda à enzima, esse critério de comparação tem a vantagem de não depender do tipo de ação realizada pela enzima ou da extensão em que essa ação ocorre. Tais teores foram determinados em  $98,3 \pm 1,9 \text{ g L}^{-1}$  para a CBH I/II- e  $162,3 \pm 1,9 \text{ g L}^{-1}$  para a mistura CN.

## 4.2 DESAGREGAÇÃO DA CELULOSE BACTERIANA

### 4.2.1 Desagregação mecânica

A desagregação das mantas de celulose bacteriana por moagem é dificultada pelo baixo teor de sólidos presentes na manta, aliado ao extremo emaranhamento das fibras de celulose. Consequentemente, a ação dos elementos de moagem reduz-se a expulsar a água retida no interior da rede, contribuindo pouco para o rompimento das fibras individuais. Como resultado, a moagem em moinho vibratório produziu grumos com aspecto filamentosos, grosseiramente dispersos. Resultado semelhante foi obtido com a ação de ultra-som sobre o gel de celulose bacteriana, que apenas desagregou superficialmente o gel, dando-lhe um aspecto semelhante a flocos de algodão. A dispersão posterior desses flocos na matriz polimérica mostrou-se pouco eficaz.

A moagem em moinho de bolas foi aparentemente mais promissora. Houve uma boa recuperação do material da primeira moagem, resultando em uma suspensão que, após 8 horas em geladeira, decantou parcialmente formando duas fases (Fig. 4.5a). O material remanescente no moinho, após a retirada da suspensão, ao ser moído com o acréscimo de mais água, produziu uma maior quantidade de material sólido que na primeira moagem (Fig. 4.5b). Para verificar o motivo do aparente aumento do teor de sólidos entre a primeira e a segunda moagem, foram determinados o teor de massa seca e o teor de cinzas das suspensões. O teor de cinzas do material da primeira moagem foi de 83% em relação à massa total de sólidos. Já na segunda moagem, o teor foi ainda maior: 86%. Tal teor de cinzas é muito elevado em relação ao teor inicial de cinzas da amostra (<0,5% da massa seca total), o que indica que o processo de moagem acrescentou sólidos à amostra, pelo desgaste das esferas de alumina utilizadas como elemento de moagem. A utilização desse material contaminado foi descartada, uma vez que não seria possível identificar isoladamente os efeitos da celulose e do material inorgânico sobre as propriedades mecânicas dos filmes. No entanto, alguns filmes foram produzidos incorporando a celulose moída, apenas para se verificar a dispersibilidade da mesma no amido plastificado. Os resultados acima parecem confirmar que a desagregação física de materiais celulósicos em micro ou nanofibrilas só é viável utilizando-se uma ação mecânica muito mais intensa – como

a passagem por um triturador cônico (KOIZUMI *et al.*, 2008) ou a combinação de homogeneização a alta pressão com cisalhamento e hidrólise enzimática parcial (HAYASHI *et al.*, 2005).

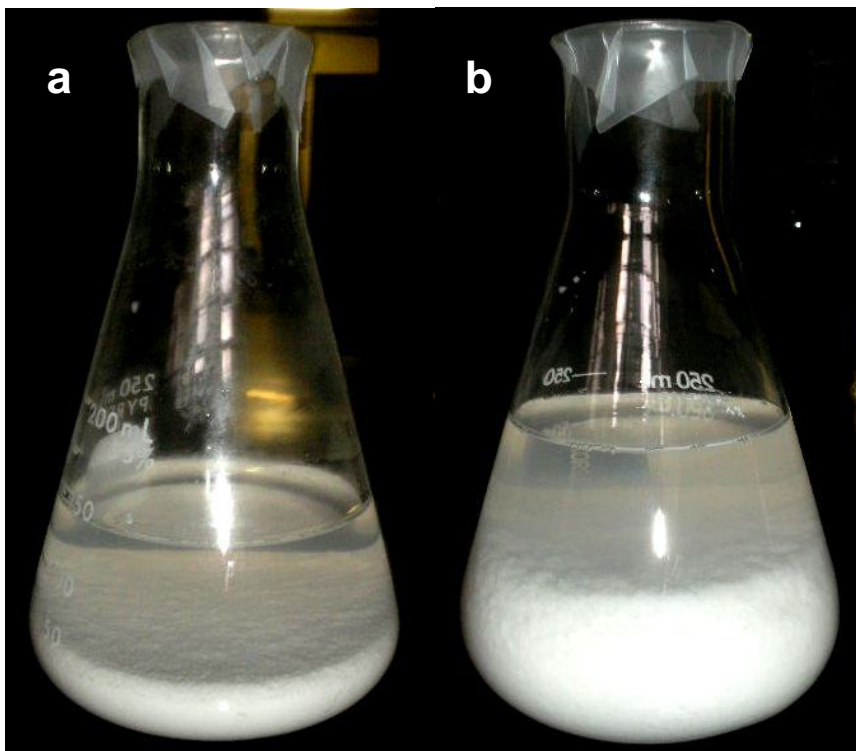


FIGURA 4.5 - SUSPENSÃO RESULTANTE DA MOAGEM DA CELULOSE BACTERIANA EM MOINHO DE BOLAS. (a) PRIMEIRA MOAGEM; (b) SEGUNDA MOAGEM

A moagem do material totalmente seco não foi cogitada como método viável de obtenção de nanofibras, pois as fibras celulósicas, após a secagem, sofrem uma drástica redução de sua área superficial (FAHMY *et al.*, 2006; FENGEL e WEGENER, 1989). Tal redução dificultaria a desagregação das fibras, tornando-as muito menos acessíveis ao ataque enzimático. Além disso, a secagem da celulose bacteriana é um processo irreversível; uma vez seca, não é possível retornar ao estado original.

Uma explicação para esse comportamento pode estar na descrição dada por FENGEL e WEGENER (1989) para o processo de secagem da celulose. Inicialmente, são rompidas as ligações hidrogênio entre as moléculas de água, que são as de menor energia no sistema celulose-água (Fig. 4.6a). Parte da água é removida e as superfícies aproximam-se umas das outras (Fig.4.6b). Quando

apenas uma camada monomolecular de água situa-se entre duas superfícies adjacentes (Fig. 4.6c), ligações hidrogênio podem se estabelecer entre essas superfícies, rompendo definitivamente as ligações entre água e celulose (Fig. 4.6d). Considerando-se a elevada razão de aspecto das nanofibrilas de celulose bacteriana, esse processo reduziria drasticamente a área superficial das mesmas e, portanto, sua interação com a matriz polimérica de amido.

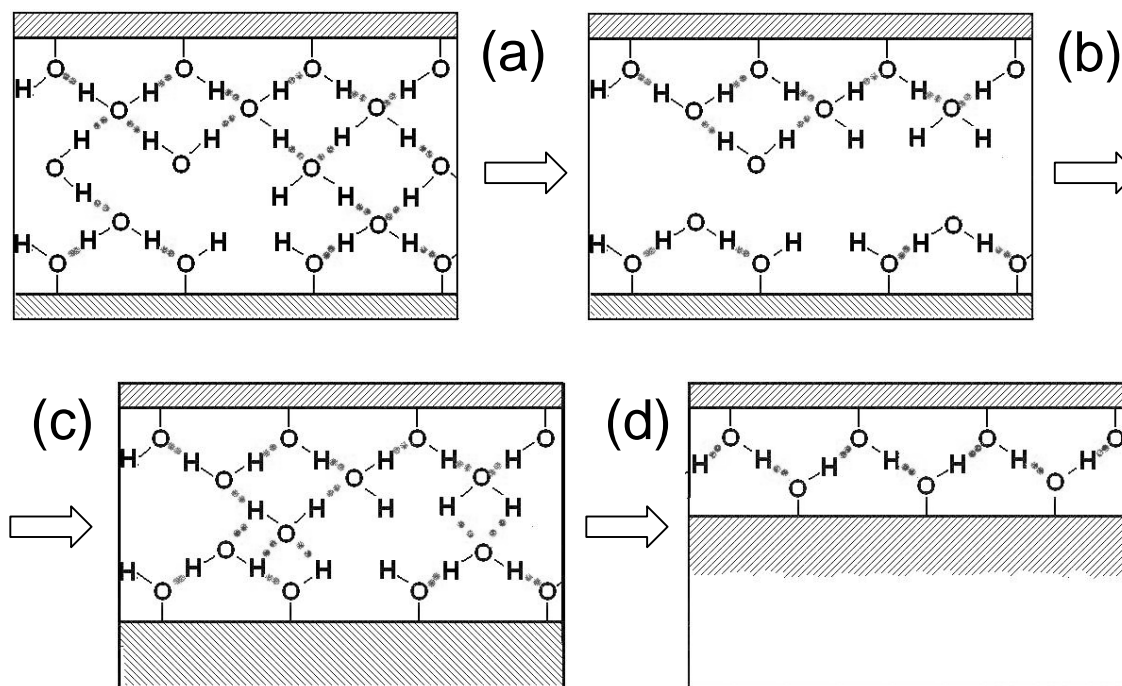


FIGURA 4.6 – SECAGEM DA CELULOSE. EM CINZA: INTERIOR DAS FIBRAS. \*\* REPRESENTA LIGAÇÕES HIDROGÊNIO (adaptado de FENGL e WEGENER, 1989): (a) LIGAÇÕES HIDROGÊNIO ENTRE A ÁGUA E A SUPERFÍCIE DAS FIBRAS. (b), (c): RETIRADA PROGRESSIVA DE ÁGUA E APROXIMAÇÃO DAS FIBRAS. (d) ESTABELECIMENTO DE LIGAÇÕES HIDROGÊNIO ENTRE AS SUPERFÍCIES DAS FIBRAS

#### 4.2.2 Desagregação enzimática

O comportamento macroscópico das amostras de celulose bacteriana submetidas à hidrólise parece confirmar o modo de ação das enzimas proposto no item 2.1.1.6. Enquanto a hidrólise com mistura CN leva à redução da viscosidade e ao aumento da transparência, perceptível mesmo após alguns minutos de hidrólise, o tratamento com CBHI/II- não produz nenhum resultado notável. No entanto, amostras submetidas a este tratamento gelificaram quando mantidas sob

refrigeração, o que sugere a presença de fragmentos de celulose mais curtos no meio hidrolisado (Fig. 4.7).

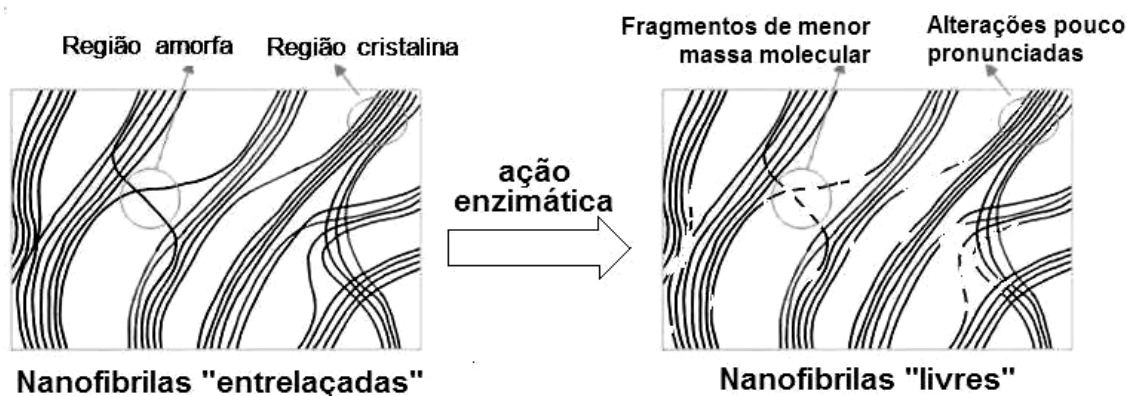


FIGURA 4.7 – AÇÃO DAS ENZIMAS SOBRE A CELULOSE BACTERIANA

Fixou-se em 10 mg de proteína por g de substrato a quantidade de preparação enzimática a ser utilizada em ambos os casos. Dados os teores de proteína obtidos para as preparações utilizadas (ver item 4.1.3), isso corresponde a 0,108 mL de CBHI/II- e 0,062 mL de Mistura CN para cada grama de celulose.

A figura 4.8 mostra o acompanhamento da hidrólise a partir do teor de açúcares redutores total, expresso em mg L<sup>-1</sup> de glucose. Observa-se que a evolução da hidrólise com o uso da mistura CN foi muito mais rápida; ainda assim, se considerarmos que todo o açúcar redutor produzido durante a hidrólise corresponde a glucose, teríamos após 60 minutos cerca de 26% de conversão da celulose em glucose, o que está muito abaixo dos resultados já citados para a hidrólise ácida. Situação ainda melhor é observada para a hidrólise com endoglucanase: após 240 min de hidrólise, menos de 12% da celulose teria sido hidrolisada, se assumirmos uma conversão apenas a glucose. Tais níveis de conversão da celulose em açúcares redutores são muito menores que os já citados para a hidrólise ácida, o que justifica a opção pela hidrólise enzimática.

O poder redutor total de uma amostra de hidrolisado não corresponde, no entanto, ao conteúdo de glucose da mesma, uma vez que novas extremidades reductoras são formadas quando do rompimento de ligações  $\beta(1-4)$ , sem que haja necessariamente a liberação de monossacarídeos no meio. A conversão da celulose em açúcares solúveis deve então ser menor que as estimativas acima, como comprovam os resultados da cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

A figura 4.9 mostra os perfis cromatográficos das preparações enzimáticas e do tampão citrato-ácido cítrico utilizado nas hidrólises. Tais perfis são importantes para diferenciar os picos resultantes de produtos da hidrólise daqueles já presentes no meio independentemente da ocorrência ou não de reação.

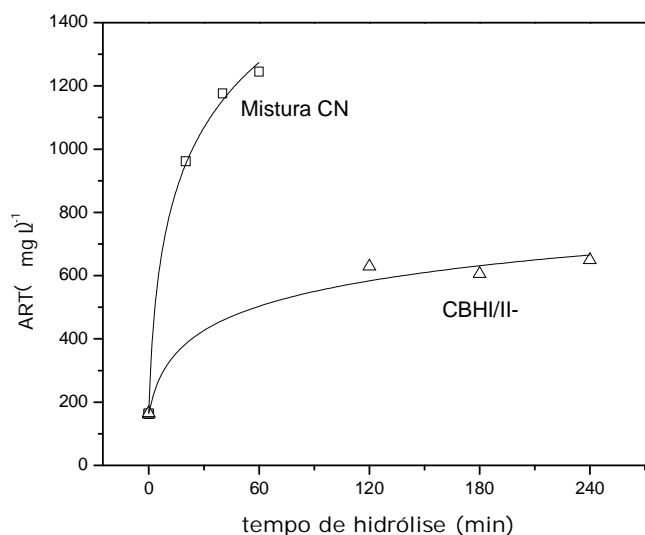


FIGURA 4.8 – AÇÚCARES REDUTORES TOTAIS (ART) GERADOS PELA HIDRÓLISE DA CELULOSE

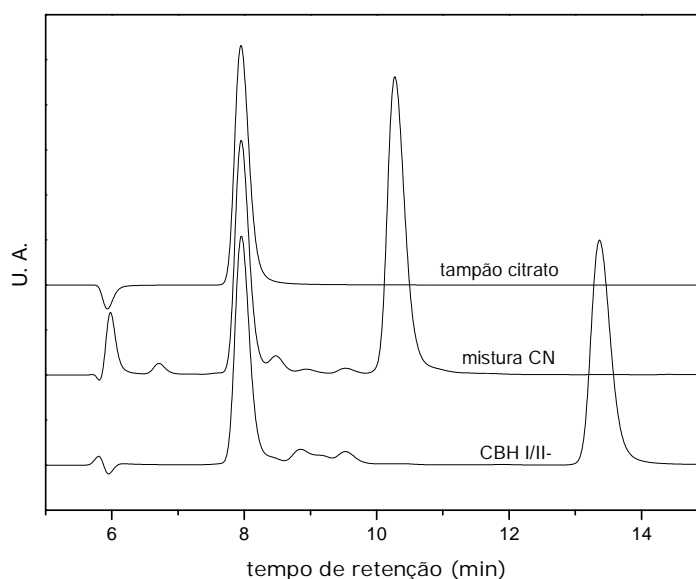


FIGURA 4.9 – PERFIS CROMATOGRAFICOS DAS PREPARAÇÕES ENZIMÁTICAS E DA SOLUÇÃO-TAMPÃO UTILIZADA NAS HIDRÓLISES

As Figs. 4.10-4.11 mostram os perfis cromatográficos dos hidrolisados obtidos com o uso das duas diferentes preparações enzimáticas, permitindo o

acompanhamento ao longo do tempo da produção de açúcares solúveis, glucose e celobiose, a partir da hidrólise do substrato celulósico. Além dos picos correspondentes a esses sacarídeos (**a** e **c**), são evidentes os picos do ácido cítrico proveniente da solução-tampão utilizada (**b**), além de substâncias não identificadas provenientes das preparações enzimáticas (**d**), provavelmente conservantes adicionados às mesmas. Discrepâncias entre os tempos de hidrólise mostrados nesses gráficos e os considerados na determinação de ART (Fig. 4.8) devem-se ao tempo decorrido entre a realização da hidrólise e os ensaios (tanto de ART quanto de HPLC) em razão de problemas com os equipamentos. O longo tempo de armazenamento de algumas amostras, bem como a perda de outras quando da ocorrência dos defeitos nos equipamentos, impediram a utilização desses resultados.

Nota-se que entre 20 e 40 minutos há pouca alteração dos picos desses açúcares no caso da hidrólise com mistura CN (Fig. 4.10). Entre 40 e 60 minutos de hidrólise, há um salto na produção de glucose. É provável que em tempos de hidrólise mais curtos ocorra um ataque preferencialmente das regiões menos organizadas entre as nanofibrilas. Após a desagregação parcial da rede de nanofibrilas, a própria estrutura das mesmas passa a ser atacada pelas enzimas.

A preparação enzimática CBH I/II- age de forma bem mais gradual (Fig. 4.11), com uma evolução lenta porém constante dos teores de glucose e celobiose, ao menos após os 60 minutos iniciais de reação. Nota-se, pela resposta do detector, que tais teores são uma ordem de grandeza menores que aqueles liberados pela mistura CN.

A partir da comparação dos cromatogramas acima com padrões de glucose e celobiose, pode-se quantificar esses açúcares nos hidrolisados. A conversão da reação, ou seja, a fração de celulose convertida em açúcares solúveis, pode ser estimada (Tab. 4.2) conhecendo-se a concentração inicial de celulose nas amostras.

No caso das hidrólises realizadas com mistura CN, a estimativa de conversão obtida a partir do poder redutor total dos hidrolisados coincidiu com a obtida a partir dos cromatogramas, o que sugere que na hidrólise com essa preparação enzimática os principais produtos da reação são os açúcares solúveis. Já no caso das hidrólises com CBH I/II-, a estimativa de conversão a partir da glucose e celobiose ficou muito aquém do obtido com os açúcares redutores totais. É provável que nesse caso os produtos de hidrólise majoritários sejam

oligosacarídeos e fragmentos menores de celulose, o que reforça a hipótese do mecanismo de desagregação proposto acima (ver Fig. 4.7). A taxa de conversão mais elevada nos primeiros 60 min, permanecendo quase inalterada nos 60 min seguintes, pode ser explicada pela maior acessibilidade inicial das cadeias da celulose nas regiões amorfas das nanofibrilas.

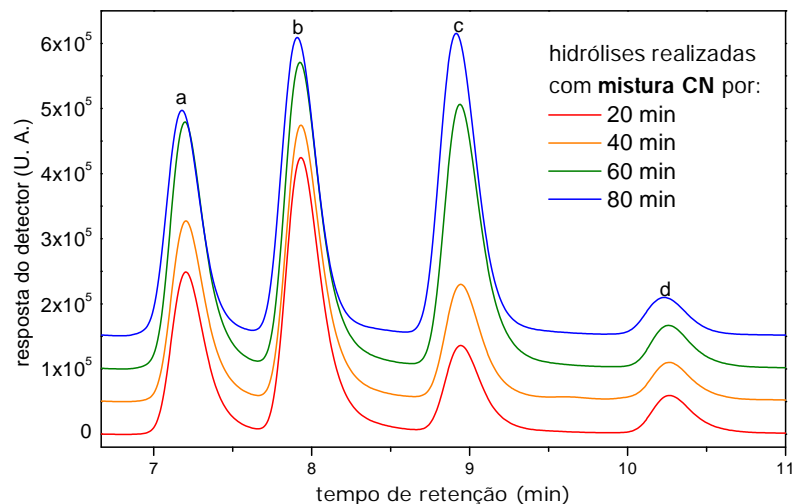


FIGURA 4.10 – PERFIS CROMATOGRÁFICOS DOS HIDROLISADOS OBTIDOS PELA AÇÃO DA MISTURA CN SOBRE A CELULOSE BACTERIANA. (a) CELOBIOSE; (b) ÁCIDO CÍTRICO; (c) GLUCOSE; (d) CONSERVANTE DA ENZIMA

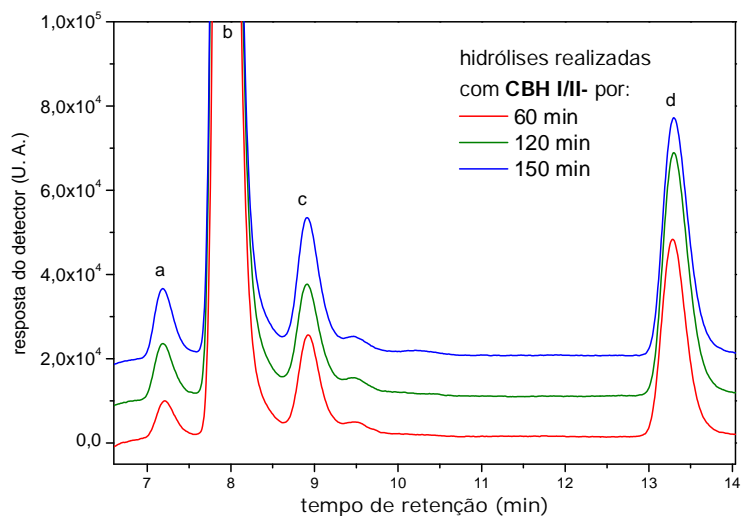


FIGURA 4.11 – PERFIS CROMATOGRÁFICOS DOS HIDROLISADOS OBTIDOS PELA AÇÃO DA CBH I/II- SOBRE A CELULOSE BACTERIANA. (a) CELOBIOSE; (b) ÁCIDO CÍTRICO; (c) GLUCOSE; (d) CONSERVANTE DA ENZIMA

TABELA 4.2 – TEOR DE CELOBIOSE E GLUCOSE PRESENTES NOS HIDROLISADOS E CONVERSÃO DA CELULOSE BACTERIANA

Tempo de hidrólise (min)	Celobiose (mg L <sup>-1</sup> )	Glucose (mg L <sup>-1</sup> )	Equivalente em anidrogucose (mg L <sup>-1</sup> )	Conversão (% sobre massa seca)
Hidrólises com mistura CN				
20	374	233	564	12,4
40	422	303	672	14,8
60	587	697	1183	26,0
80	533	788	1214	26,7
Hidrólises com CBH I/II-				
60	2,1	48,4	45,6	1,00
120	5,4	51,8	51,7	1,14
150	11,3	62,7	67,1	1,48

#### 4.3 FILMES DE AMIDO PLASTIFICADO

As primeiras tentativas de plastificação do amido com glicerol foram feitas sem a adição de nenhum tipo de reforço estrutural, visando apenas determinar as melhores condições de trabalho com cada amostra de amido. Concluiu-se que o aquecimento a uma temperatura pouco abaixo da ebulição (90 a 95°C) por cerca de 30 min proporcionou uma gelificação completa do amido sem a inconveniente formação de bolhas resultante da ebulição.

Apesar dos amidos nativos de mandioca – amido I - e de milho – amido II - terem produzido filmes homogêneos e bem plastificados (Fig. 4.12), o interesse inicial foi pelas variedades modificadas, amidos I<sub>m</sub> e II<sub>m</sub>. A princípio, esses amidos revelaram ter características que os tornariam mais adequados para a produção de compósitos. O amido II<sub>m</sub> gelatiniza muito rapidamente, além de formar filmes muito resistentes. No entanto, os filmes sofrem contração durante a secagem, resultando em rachaduras, espessura irregular e dificuldades para retirá-los das placas. Tal comportamento pode ser atribuído às cadeias mais curtas resultantes do tratamento ácido a que esse amido foi submetido. A maior mobilidade e o menor entrelaçamento dessas cadeias permitiriam rearranjos das hélices de amilopectina que levam à deformação do filme. Já o amido I<sub>m</sub> por ser gelatinizado, pode ser disperso a frio, o que poderia reduzir o tempo e a energia despendidos para a produção dos filmes, ao eliminar a necessidade do aquecimento para a gelatinização. A plastificação a frio, no entanto, se mostrou impraticável devido à elevada viscosidade da mistura resultante. A necessidade de agitação muito

vigorosa levou à formação de bolhas que não puderam ser totalmente eliminadas na secagem a vácuo (Fig. 4.13a). Seguindo o procedimento adotado para os outros amidos (aquecimento por 30 min a 90-95 °C), obtiveram-se filmes tão regulares quanto os de amido nativo de mandioca. Durante o acondicionamento, porém, os filmes sofreram distorções semelhantes às observadas nos filmes de amido II<sub>m</sub> (Fig. 4.13b). É possível que o processo industrial adotado para a pré-gelatinização – provavelmente gelatinização do amido em água, seguida de secagem e moagem – leve a um rompimento parcial das cadeias do amido, de forma semelhante ao que ocorre com o amido II<sub>m</sub>.

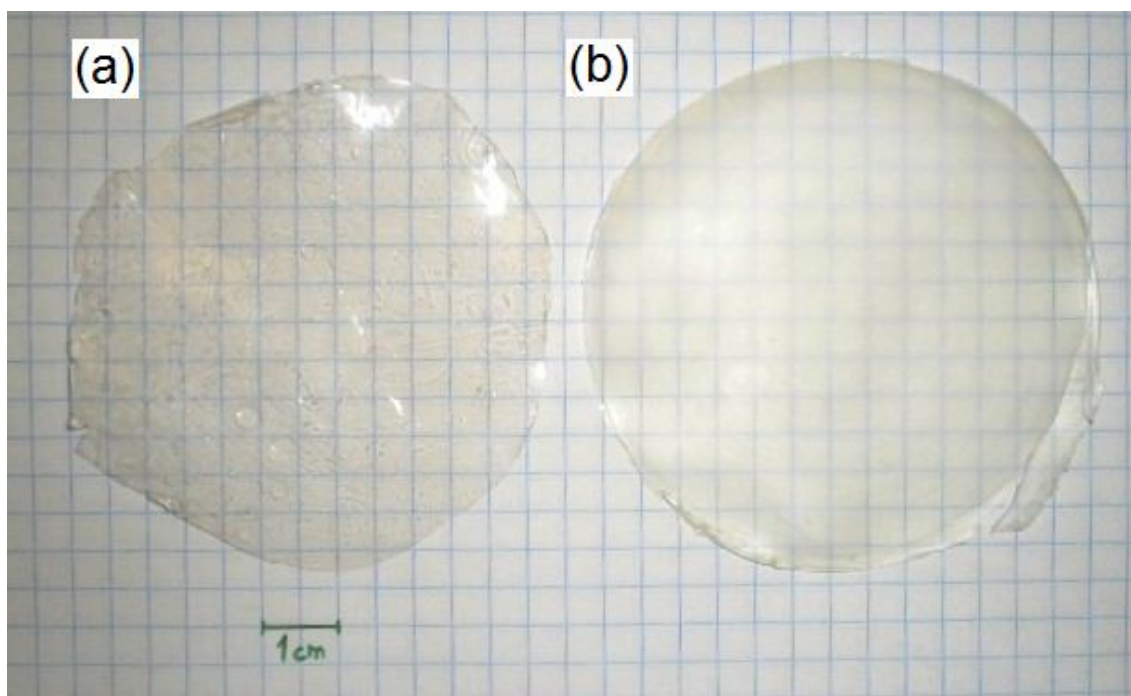


FIGURA 4.12 – FILMES DE AMIDO DE (a) MANDIOCA E (b) MILHO, PLASTIFICADOS COM 30% DE GLICEROL

A escolha final recaiu então sobre o amido nativo de mandioca, pois além de produzir filmes (Fig. 4.12a) mais transparentes e flexíveis que os de milho, há na literatura pouca referência à plastificação do amido de mandioca. A grande maioria dos trabalhos refere-se ao amido de milho e não foi encontrado nenhum trabalho que envolvesse amido de mandioca e celulose bacteriana. Na Fig. 4.14 pode-se comparar o difratograma de raios X do amido I (Fig. 4.14a) com o de um filme desse amido plastificado com 30% de glicerol (Fig. 4.14b). Enquanto o amido I apresenta picos característicos de um amido do tipo C (VAN SOEST e VLIEGENTHART,

1997), o filme produzido pela plastificação do mesmo amido não mostra qualquer indício de cristalinidade, apenas um halo amorfo com máximo em torno de  $19^\circ$  de  $2\theta$ . O processo utilizado na produção dos filmes garante, portanto, a completa gelatinização do amido.

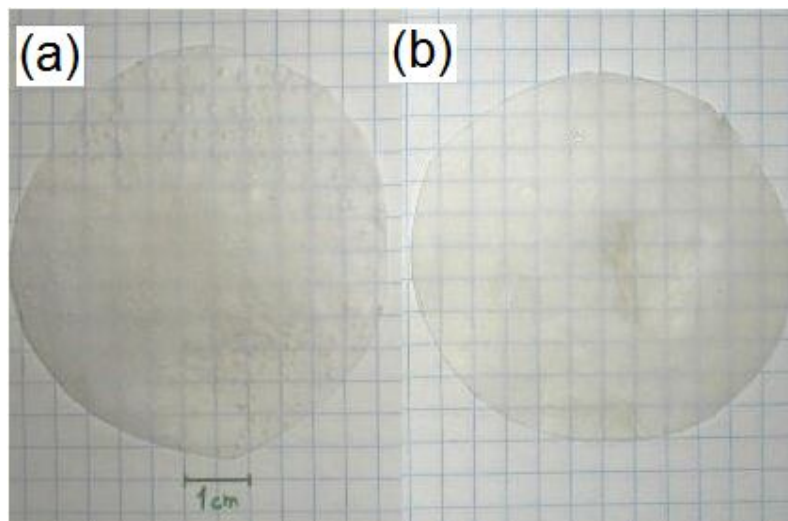


FIGURA 4.13 – FILMES DE AMIDO DE MANDIOCA MODIFICADO PLASTIFICADOS COM 30% DE GLICEROL (a) A FRIO E (b) A QUENTE

A escolha do glicerol como plastificante foi motivada pela sua disponibilidade, biodegradabilidade e afinidade com o amido (ver item 2.1.2.2). O teor de glicerol utilizado foi estabelecido a partir dos valores que se revelaram mais adequados em diversas referências (ÀNGLES e DUFRESNE, 2000, 2001; AVÉROUS *et al.*, 2001; TALJA *et al.*, 2007; LÓPEZ-RUBIO *et al.*, 2007) e, em particular, em WILHELM *et al.* (2003).

#### 4.4 PRODUÇÃO DOS COMPÓSITOS

As primeiras tentativas de produzir compósitos dispersando-se a celulose por meio de ultra-som não produziram bons resultados. A celulose parecia se dispersar de início, porém o aquecimento ou a agitação eram suficientes para fazer com que a celulose se reagrupasse e segregasse do meio, resultando em filmes extremamente irregulares. O mesmo ocorreu com a celulose triturada no moinho vibratório. Mesmo as tentativas de incorporar o amido à celulose já no interior do moinho não melhoraram a dispersão das fibras no produto final.

A dispersão da celulose tratada enzimaticamente foi muito mais fácil, mesmo para os tempos de tratamento mais curtos. Foram produzidos filmes muito homogêneos, com um pequeno aumento de opacidade em relação aos filmes sem reforço. A análise dos difratogramas de filmes dos compósitos (Fig. 4.14d, e, f) revela o aparecimento de picos típicos de cristalinidade do tipo  $V_H$ . O surgimento desse padrão cristalino, resultante do reordenamento das cadeias da amilose (ver item 2.1.3) (THIRÉ *et al.*, 2005; VAN SOEST e VLIEGENTHART, 1997), é perceptível mesmo no filme sem reforço de celulose após acondicionamento a 43% de umidade relativa (Fig. 4.14c).

Os filmes contendo fibras celulósicas apresentam, além dos picos característicos da retrogradação da amilose, outros picos cuja atribuição é mais problemática. Alguns deles estão próximos dos picos mais significativos da celulose (assinalados por asteriscos na Fig. 4.14). A atribuição de algum deles à celulose é no entanto duvidosa, pois apresentam em todos os filmes pequenos deslocamentos em relação aos valores já bem determinados na literatura para a celulose (ELAZZOUZI-HAFRAOUI *et al.*, 2008; FENGEL e WEGENER, 1989). Tais deslocamentos não podem ser explicados por mudanças na estrutura da celulose, pois as condições em que os filmes são produzidos não poderiam levar a alterações cristalinas nas fibras. É mais provável, portanto, que tais picos sejam resultado da transcristalinidade - formação de padrões cristalinos induzida pela presença das fibras. Outra possibilidade, a de que haja nos filmes grânulos de amido não gelatinizados que contribuam com a cristalinidade é logo descartada quando se observa o aspecto amorfo de filmes sem fibras, cujas condições de gelatinização foram as mesmas dos demais.

A cristalinidade do tipo  $V_H$  predomina no filme reforçado com celulose tratada com mistura CN (Fig. 4.14f). Por outro lado, tanto o filme contendo celulose tratada com CBH I/II- quanto aquele contendo celulose não tratada (Fig. 4.14d, e) mostram um perfil difratométrico semelhante, com picos que podem ser atribuídos à recristalização da amilopectina em torno das fibras num padrão do tipo B (ver item 2.1.3) (ÂNGLES e DUFRESNE, 2000).

No filme contendo celulose tratada com endoglucanases (Fig.4.14d) esses picos tem aspecto arredondado. Isso pode indicar sobreposição de picos de outros padrões cristalinos (possivelmente tipo C) ou alargamento devido às dimensões reduzidas dos cristalitos formados. A presença de nanocristais poderia explicar em

parte as propriedades mecânicas superiores desse filme, que serão apresentadas posteriormente.

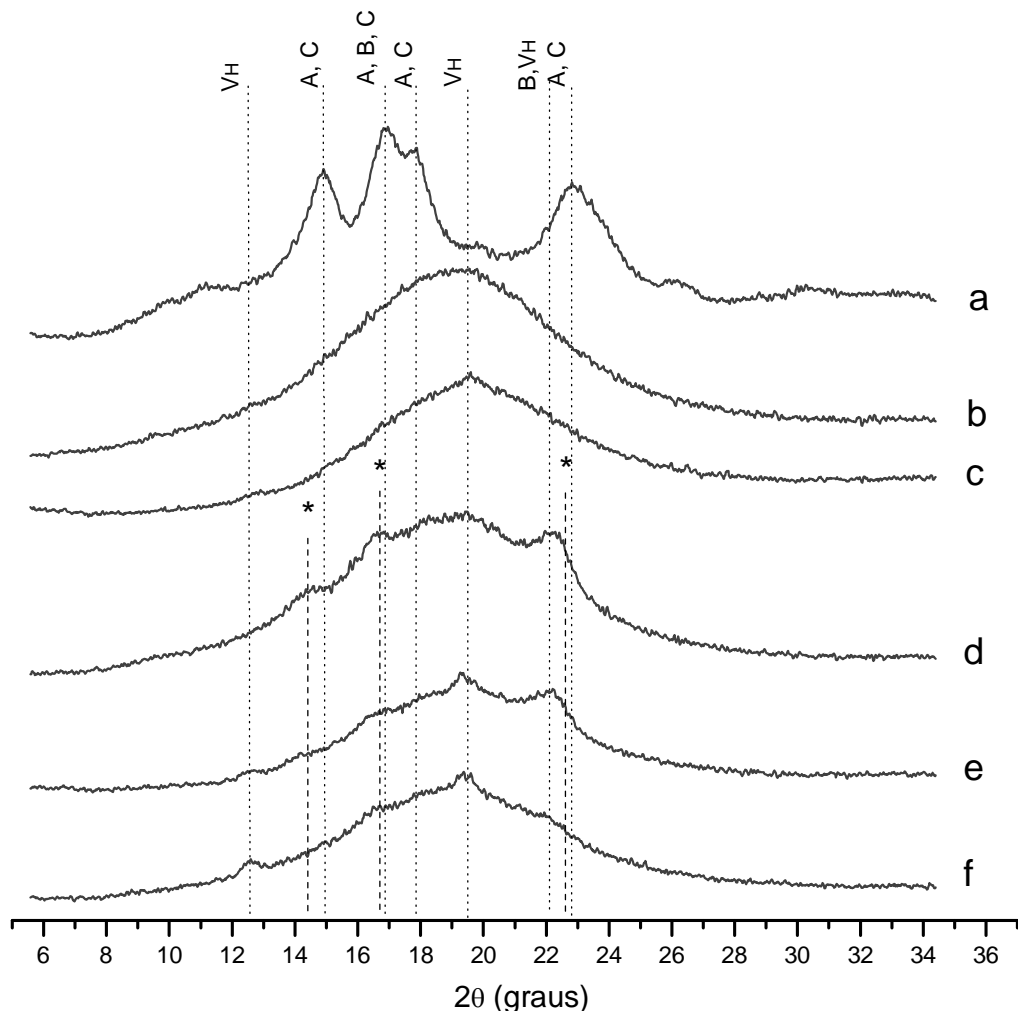


FIGURA 4.14 – DIFRATOGRAMAS DE RAIOS X DO AMIDO DE MANDIOCA E DE SEUS FILMES. (a) AMIDO DE MANDIOCA. (b) FILME PLASTIFICADO COM 30% DE GLICEROL. (c) MESMO FILME APÓS ACONDICIONAMENTO EM UMIDADE RELATIVA DE 43%. (d) A (f): FILMES REFORÇADOS COM 2,5% DE CELULOSE BACTERIANA (d) TRATADA COM CBH I/II- POR 60 min, (e) SEM TRATAMENTO ENZIMÁTICO E (f) TRATADA COM MISTURA CN POR 20 min. AS LINHAS PONTILHADAS REPRESENTAM PICOS DE CRISTALINIDADE ASSOCIADOS AO AMIDO; AS LINHAS TRACEJADAS (\*) INDICAM PICOS CARACTERÍSTICOS DA CELULOSE

Não foi observada, em nenhum dos filmes, a presença do pico em  $21,15^\circ$  em  $2\theta$ , relatado por ÀNGLES e DUFRESNE (2000) e MATHEW e DUFRESNE (2002) e atribuído à formação de regiões paracristalinas de amilopectina em torno dos nanocristais de celulose. É possível que essa ausência se deva ao fato dos autores acima citados terem utilizado como reforço *whiskers* de celulose, cuja geometria difere das nanofibras empregadas. De qualquer forma, as nanofibras

afetam a organização da matriz polimérica de diferentes formas dependendo do tratamento a que foram submetidas. A ação das enzimas deve produzir mudanças superficiais na celulose que podem estar agindo como sítios de nucleação de diferentes padrões cristalinos.

#### 4.5 PROPRIEDADES MECÂNICAS DOS COMPÓSITOS

As tentativas preliminares de incorporação da celulose parcialmente hidrolisada nos filmes permitiram definir qual tipo e condição de tratamento resulta nas melhores propriedades mecânicas. Foram analisados o módulo de elasticidade ( $E$ ) e o limite de resistência à tração ( $\sigma_{máx}$ ) dos compósitos. Pode-se observar nas Fig. 4.16-4.17 que duas tendências diferentes ocorrem. As propriedades mecânicas de compósitos contendo celulose tratada com mistura CN são melhores para um tempo de tratamento menor (20 min, Fig. 4.16 e Fig. 4.17). Tratamentos mais longos levam a um decréscimo do módulo e da tensão máxima dos filmes. No caso do tratamento com CBHI/II-, observa-se que o máximo da tensão e módulo dos compósitos ocorre com o uso de fibra tratada por 60 min. Após esse tempo, há um decréscimo na capacidade de reforço da celulose (fig. 4.17).

Tais resultados poderiam ser explicados pela diferente forma de ação das enzimas. A mistura CN apresenta atividade celulásica completa, degradando muito intensamente as fibras. Um tratamento curto é suficiente para desembaraçar parcialmente as nanofibrilas (ver item 4.2.2), aumentando sua dispersibilidade e sua área superficial, o que permite maior interação com a matriz polimérica. Já um tratamento prolongado rompe excessivamente as nanofibrilas, reduzindo sua capacidade de reforço.

Por outro lado, a CBHI/II- age preferencialmente sobre as regiões amorfas, tendo uma capacidade menor de romper as nanofibrilas. À medida que a hidrólise progride, as regiões amorfas entre os cristalitos vão sendo rompidas, o que libera as nanofibrilas, favorecendo sua dispersão. Após tais regiões amorfas serem atacadas, aumenta a acessibilidade das regiões cristalinas. Só então se observa um decréscimo das propriedades mecânicas dos compósitos, resultante provavelmente de defeitos nas nanofibrilas gerados pela degradação provocada pelas enzimas.

Os ensaios de tração descritos acima foram realizados com filmes mantidos em condições de temperatura e umidade ambiente. Como todos os filmes haviam

sido mantidos nas mesmas condições, servem como parâmetro comparativo entre eles, embora os resultados sejam muito discrepantes dos mostrados adiante. Os maiores valores de  $E$  e  $\sigma_{\max}$  foram obtidos para filmes contendo celulose tratada com endoglucanase. Optou-se então por prosseguir a investigação das propriedades mecânicas desses filmes.

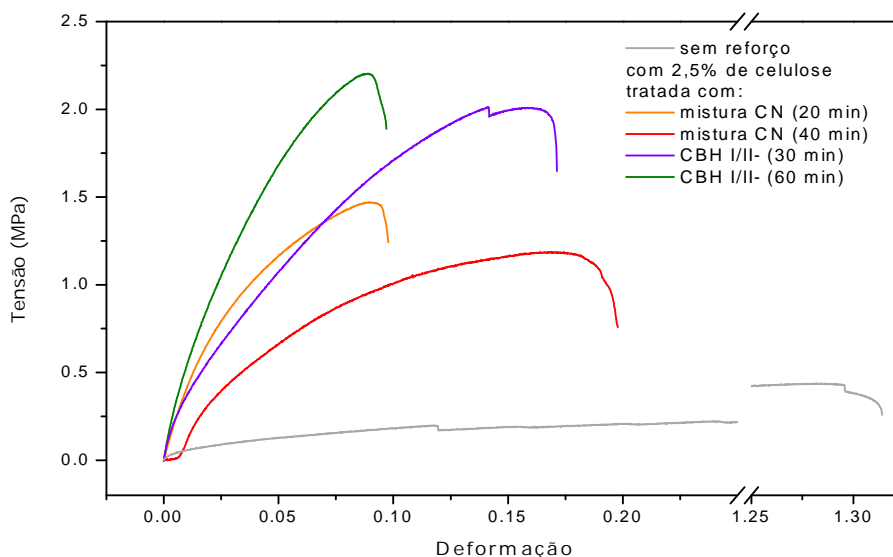


FIGURA 4.16 – CURVAS TENSÃO/DEFORMAÇÃO TÍPICAS DOS FILMES DE AMIDO PLASTIFICADO SEM REFORÇO E REFORÇADOS COM CELULOSE BACTERIANA

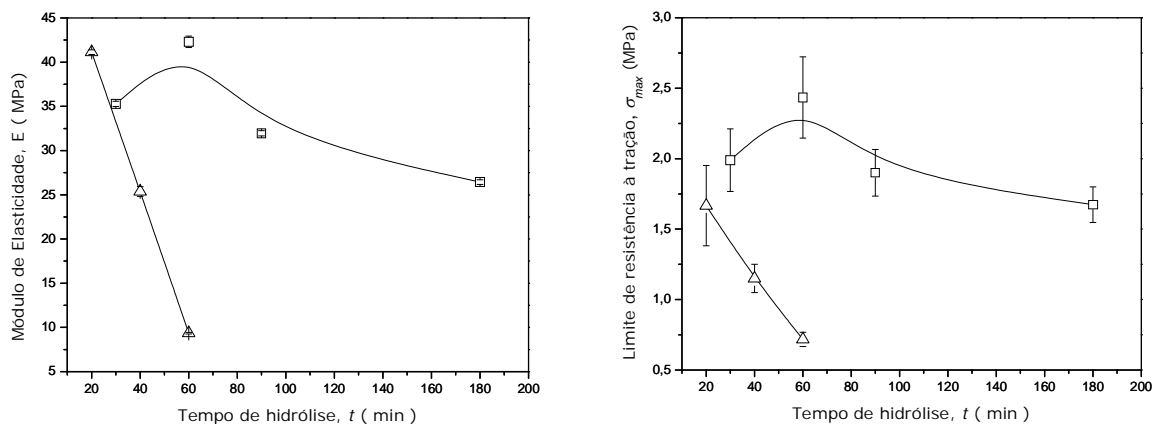


FIGURA 4.17 – PROPRIEDADES MECÂNICAS DE FILMES REFORÇADOS COM CELULOSE TRATADA COM MISTURA CN ( $\Delta$ ) E COM CBH I/II- ( $\square$ )

Os ensaios seguintes foram realizados com filmes acondicionados conforme descrito no item 3.8.1, o que dá maior confiabilidade aos valores absolutos de módulo e tensão. A Fig. 4.18 mostra curvas típicas de tensão x deformação dos filmes acondicionados, tendo sido incluído um filme sem reforço (curva 1) e um

acrescido de celulose não-tratada (curva 2) para comparação. Observa-se um nítido aumento da rigidez e da capacidade de suportar cargas dos compósitos contendo celulose tratada, a não ser no caso do filme contendo celulose tratada por 120 min, cujo comportamento mecânico é inferior ao do filme com celulose não tratada.

Na Fig. 4.19, observa-se que o máximo de  $E$  e  $\sigma_{\max}$  ocorre mesmo para o tratamento com endoglucanase por 60 min. O limite de resistência à tração dobrou em relação ao controle (celulose não tratada, ponto  $t = 0$  do gráfico) e o módulo de Young foi quatro vezes maior. A comparação com a matriz não reforçada (ponto cinza na Fig. 4.19) mostra mais claramente o efeito de reforço das nanofibras. Mesmo a fibra não tratada aumenta em aproximadamente 5 vezes o módulo de Young e quadruplica  $\sigma_{\max}$  em relação ao amido plastificado. A melhor condição de tratamento com CBH I/II- (60 min) resulta em um módulo aproximadamente quase 20 vezes maior e eleva  $\sigma_{\max}$  em 8 vezes.

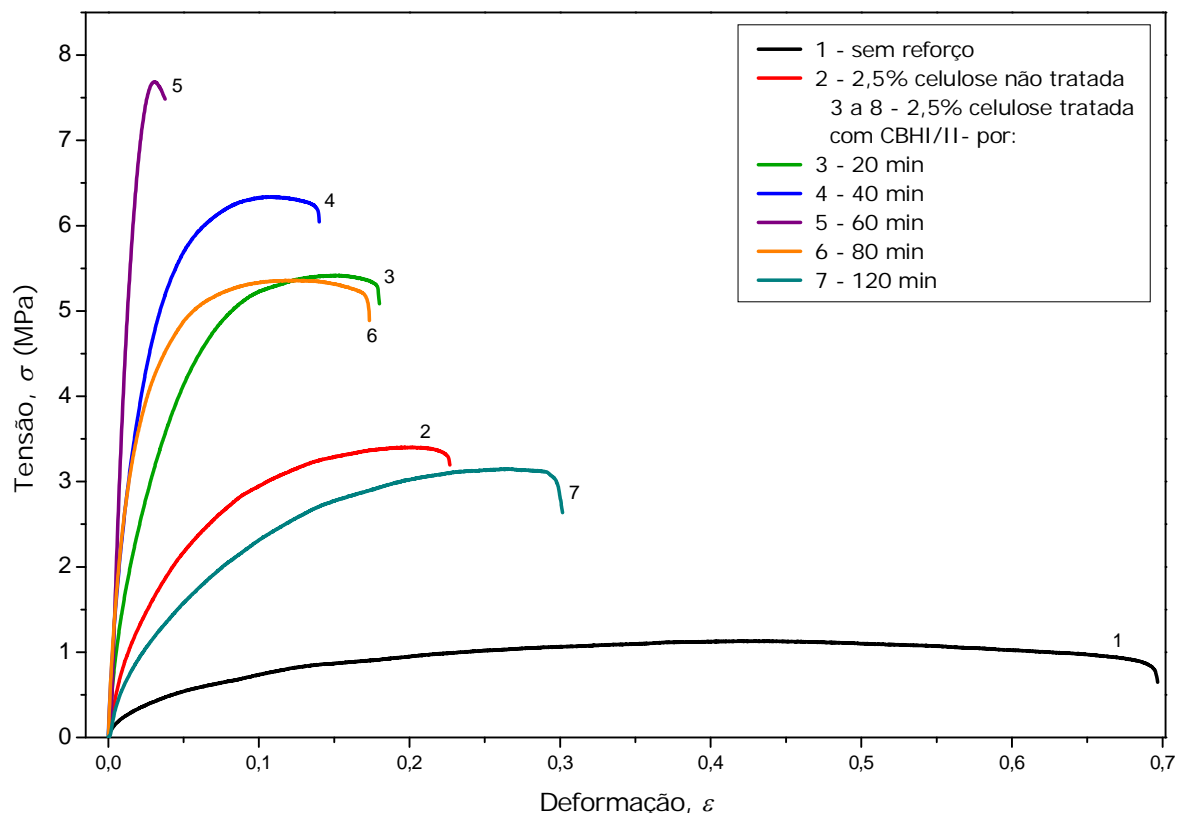


FIGURA 4.18 – CURVAS TÍPICAS DE TENSÃO X DEFORMAÇÃO DOS COMPÓSITOS ACONDICIONADOS POR 10 DIAS EM UMIDADE RELATIVA DE 43%

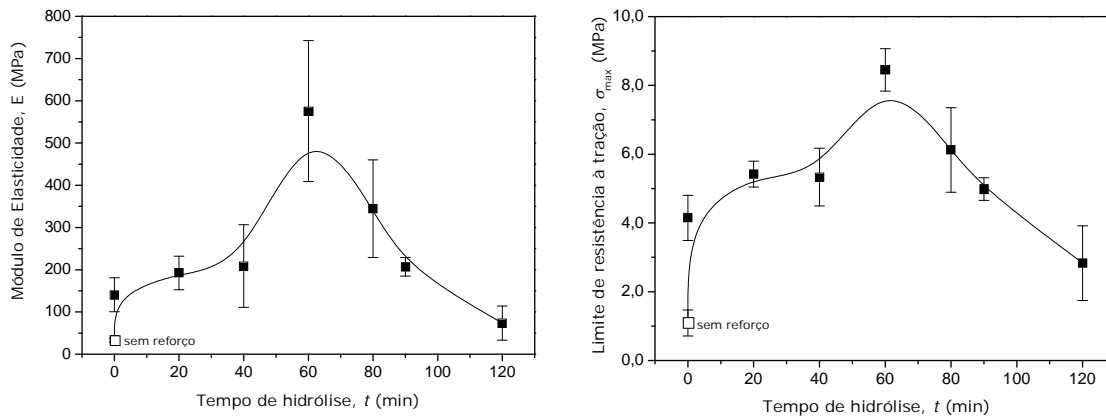


FIGURA 4.19 – PROPRIEDADES MECÂNICAS DE FILMES REFORÇADOS COM 2,5% DE CELULOSE TRATADA COM ENDOGLUCANASE, ACONDICIONADOS EM UMIDADE RELATIVA DE 43%

#### 4.6 MORFOLOGIA DOS FILMES

A figura 4.20 mostra corpos de prova submetidos a ensaio de tração até ruptura. Observa-se, no filme de amido plastificado sem reforço (Fig. 4.20a), um estreitamento da região de ruptura característico de materiais dúcteis (GARCIA *et al.*). Esse estreitamento é menos pronunciado nos filmes com reforço, o que concorda com o aumento de rigidez desses materiais já evidenciado na Fig. 4.18 por uma drástica redução do alongamento na ruptura. A transparência dos filmes é pouco afetada pela presença da celulose, a não ser no filme contendo celulose não tratada (Fig. 4.20b), o que sugere uma dispersão bem homogênea das nanofibras nos demais filmes.

A Fig. 4.21 mostra imagens de microscopia óptica dos filmes submetidos a teste de tração até a ruptura. Observa-se que o filme de amido plastificado sem reforço tem aspecto bem homogêneo; as irregularidades na sua superfície podem ser atribuídas à placa utilizada como suporte e ao processo de secagem. A borda da região de ruptura é muito regular, não mostrando nenhum aspecto que possa indicar imperfeições internas. A segunda imagem, de um filme reforçado com 2,5% de celulose não submetida a tratamento enzimático, apresenta aspecto muito diferente. A rugosidade de sua superfície é provavelmente devido à presença de fibras não totalmente dispersas. A ruptura gerou uma borda irregular na qual surgiram rasgos que indicam que o material não é homogêneo.

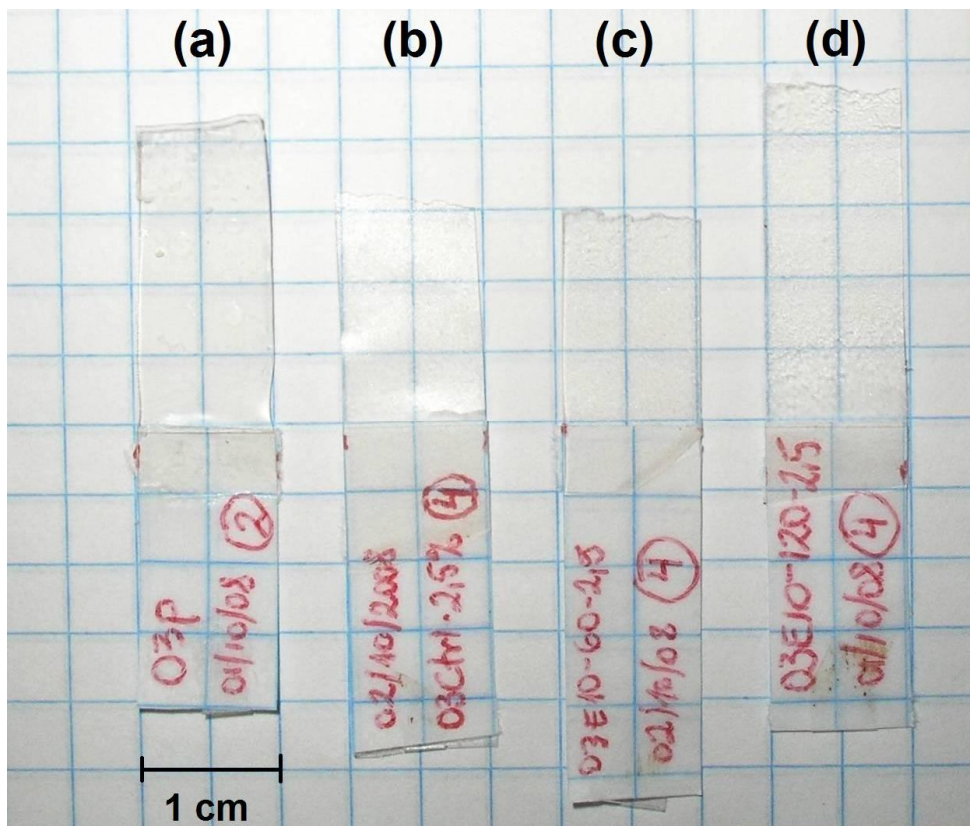


FIGURA 4.20 – CORPOS DE PROVA SUBMETIDOS A ENSAIO DE TRAÇÃO ATÉ A RUPTURA. FILMES DE AMIDO PLASTIFICADO COM 30% DE GLICEROL: (a) SEM REFORÇO; (b) COM 2,5% DE CELULOSE NÃO TRATADA; (c) E (d): COM 2,5% DE CELULOSE TRATADA COM CBH I/II-POR 60 E 120 min, RESPECTIVAMENTE

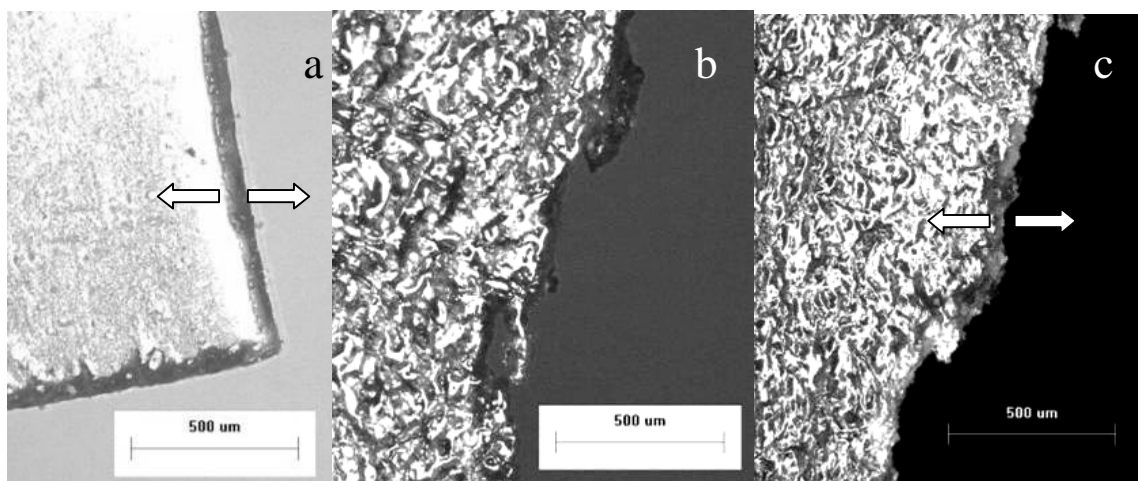


FIGURA 4.21 – FOTOMICROGRAFIAS DE FILMES (a) SEM REFORÇO, (b) COM CELULOSE NÃO TRATADA E (c) COM CELULOSE TRATADA COM ENDOGLUCANASE POR 60 MINUTOS. AS SETAS INDICAM A DIREÇÃO DA TENSÃO APLICADA. AMPLIAÇÃO DE 50x

A borda do filme acrescido de celulose tratada com CBHI/II- por 60 min é mais regular, apresentando menos rasgos. A rugosidade em sua superfície é numa escala menor do que no caso anterior. Ambas as características sugerem que as fibras encontram-se distribuídas de maneira mais uniforme no interior do compósito.

A Fig. 4.22 mostra as micrografias eletrônicas de varredura dos filmes após ruptura. Observa-se que o amido plastificado sem reforço (Fig. 4.22a e 4.22b) rompeu de forma muito regular, o que indica grande homogeneidade e provável ausência de domínios cristalinos de dimensões macroscópicas. A presença de fibras modificou o perfil da região de ruptura, provavelmente devido à formação das regiões cristalinas mencionadas no item 4.4. O filme reforçado com celulose tratada com CBHI/II- (e) rompeu de forma algo regular que o filme reforçado com celulose não tratada (c), o que sugere uma melhor dispersão das fibras na matriz polimérica. As fibras estão totalmente envolvidas pela matriz polimérica, demonstrando que existe uma boa compatibilidade química entre as superfícies hidroxiladas da celulose e do amido (ver Fig. 4.15).

ÀNGLES e DUFRESNE (2000) e MATHEW e DUFRESNE (2002) observaram que fractogramas de compósitos de amido contendo nanofibrilas de celulose apresentam pontos brilhantes correspondentes a nanofibrilas livres do polímero. O acúmulo de carga devido à pequena espessura das nanofibrilas é responsável por esse fenômeno. Fractogramas com magnificação equivalente (Fig. 4.22d, f) dos nanocompósitos produzidos neste trabalho não mostram pontos brilhantes, revelando apenas projeções arredondadas nas micrografias (setas). Tais projeções podem corresponder a feixes de fibras que, ao serem tracionados, continuaram aderidos à matriz. Pode-se atribuir esse perfil “suave” de ruptura a uma interação muito intensa entre a matriz e as fibras, impedindo sua liberação.

A ausência de orifícios deixados pela saída de feixes de fibras (*pull out*) é outro indício da elevada compatibilidade matriz-carga. A superfície de ruptura do filme reforçado com celulose tratada (Fig. 4.22f) é ainda mais regular que a do filme contendo celulose não hidrolisada (Fig. 4.22c), sugerindo novamente melhor dispersão das fibras. A combinação entre dispersão eficaz da celulose e interação da mesma com o amido, aliadas à presença de regiões cristalinas, é responsável pelas propriedades mecânicas superiores desses compósitos.

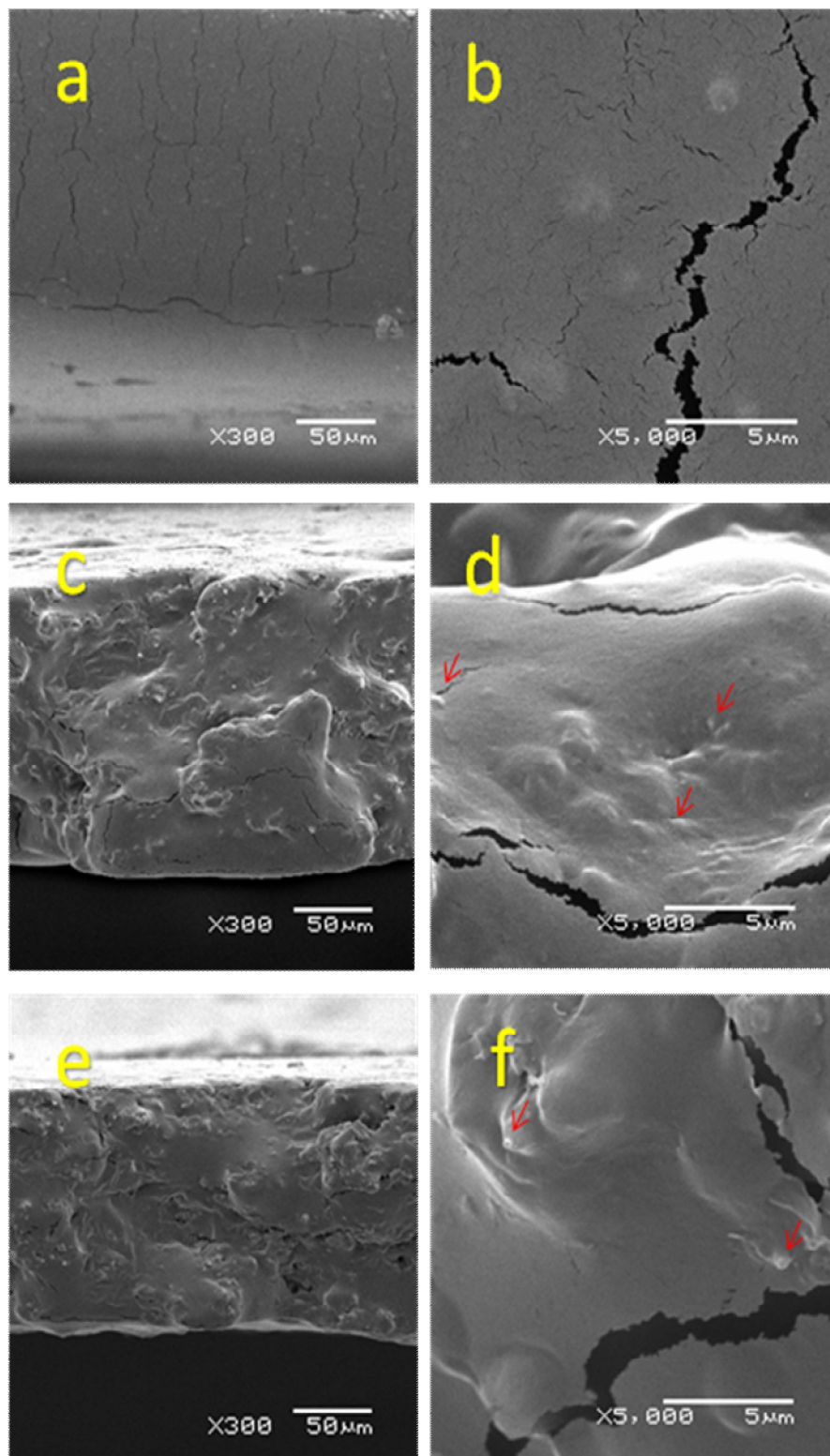


FIGURA 4.22 - MICROGRAFIAS ELETRÔNICAS DE VARREDURA DA REGIÃO DE RUPTURA DOS FILMES SEM REFORÇO (a, b), COM REFORÇO DE CELULOSE NÃO HIDROLISADA (c, d) E HIDROLISADA COM CBHI/II- POR 60 MINUTOS (e, f). AS SETAS INDICAM PROJEÇÕES DOS FILMES RESULTANTES DA TRAÇÃO

## 4.7 ALTERAÇÕES NA CELULOSE APÓS A HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

### 4.7.1 Índice de cristalinidade

Uma possível explicação para a maior capacidade de reforço da celulose tratada com endoglucanase seria um aumento do seu índice de cristalinidade, uma vez que a enzima atacaria preferencialmente as regiões amorfas. Para verificar se esse aumento de fato ocorre, analisou-se os difratogramas de raios X da celulose não-tratada, tratada com mistura CN e com endoglucanase. A Fig. 4.23 mostra o difratograma da celulose não tratada. Observam-se picos de difração  $(1 \bar{1} 0)$ ,  $(1 1 0)$ ,  $(2 0 0)$  e  $(0 0 4)$  característicos da celulose I (ELAZZOUZI-HAFRAOUI *et al.*, 2008; KLECHKOVSKAYA *et al.*, 2003). A deconvolução desses picos revelou um halo amorfo com máximo em torno de  $22^\circ$  de  $2\theta$ . O mesmo halo foi observado também nas amostras de celulose tratada tanto com mistura CN quanto com CBHI/II-. A Tab. 4.3 mostra os resultados da estimativa do índice de cristalinidade calculados a partir desses dados. Não foram observadas diferenças significativas de cristalinidade em relação ao controle (celulose não tratada) para nenhum dos tratamentos realizados.

Para verificar se, durante a hidrólise, houve erosão dos cristalitos em alguma direção preferencial, foram comparados os valores calculados a partir da lei de Scherrer para as dimensões dos cristalitos. Nas direções  $(1 \bar{1} 0)$ ,  $(1 1 0)$ ,  $(2 0 0)$  e  $(0 0 4)$ , correspondentes aos picos indexados por ELAZZOUZI-HAFRAOUI *et al.* (2008) e KLECHKOVSKAYA *et al.* (2003), não houve variação sistemática nas dimensões calculadas (tabela 4.4). Portanto, não se pode afirmar que as enzimas estejam atuando mais especificamente sobre alguma das faces dos cristalitos. As dimensões dos cristalitos na direção  $(0 0 1)$ , correspondente à direção das cadeias da celulose, seria um parâmetro interessante da ação enzimática. No entanto, o único pico indexado correspondente a essa direção,  $(0 0 4)$ , forneceu resultados muito dispersos, que não foram considerados confiáveis para determinar o tamanho dos cristalitos.

Não parece haver nenhuma mudança importante na organização cristalina dos cristalitos de celulose após a hidrólise. Os difratogramas mostrados na figura 4.24 são essencialmente iguais, embora tenham sido obtidos, respectivamente, de celulose não tratada, tratada com mistura CN e com CBHI/II-.

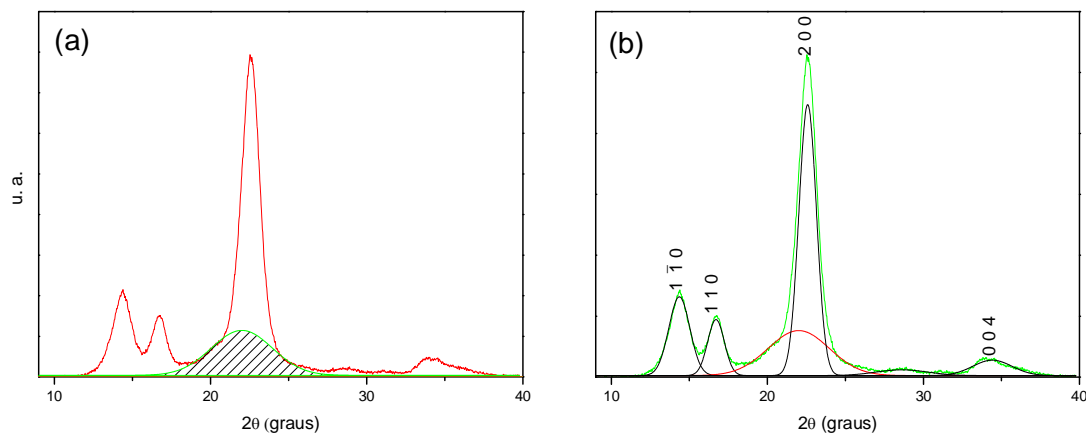


FIGURA 4.23 – (a) DIFRATOGRAMA DA CELULOSE BACTERIANA NÃO-TRATADA. A ÁREA HACHURADA CORRESPONDE AO HALO AMORFO. (b) PICOS RESULTANTES DA DECONVULÇÃO DO MESMO DIFRATOGRAMA. A INDEXAÇÃO DOS PICOS SEGUIE ELAZZOUI-HAFRAOUI *et al.* (2008) e KLECHKOVSKAYA *et al.* (2003)

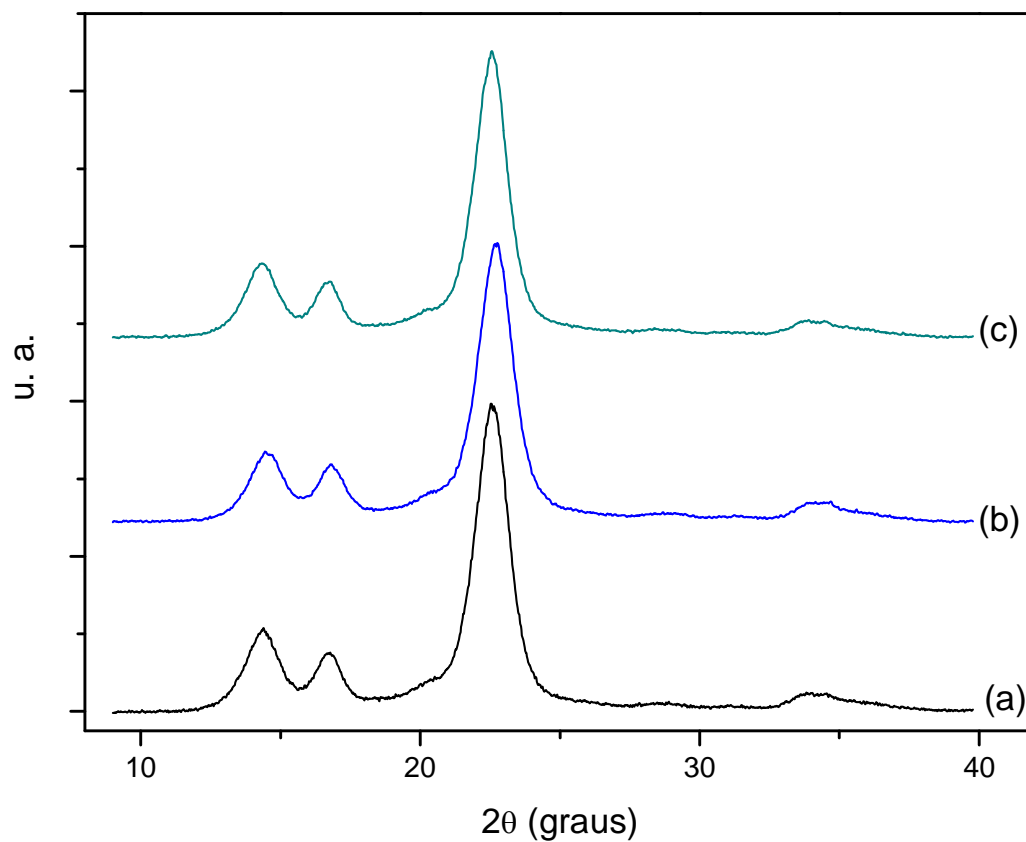


FIGURA 4.24 – DIFRATOGRAMAS DE RAIOS X DE CELULOSE (a) NÃO TRATADA E TRATADA COM (b) MISTURA CN E (c) CBHI/II-

TABELA 4.3 – ÍNDICE DE CRISTALINIDADE ( $I_c$ ) DA CELULOSE NÃO TRATADA (CONTROLE), TRATADA COM MISTURA CN E COM CBH I/II-

Amostra/tempo de tratamento (min)	Índice de cristalinidade ( $I_c$ )
0 (controle)	0,762
Tratadas com mistura CN	
20	0,753
40	0,756
60	0,757
80	0,758
Tratadas com CBH I/II-	
30	0,771
60	0,758
90	0,769
120	0,764
180	0,766
240	0,762

TABELA 4.4 – ESTIMATIVA DAS DIMENSÕES DOS CRISTALITOS DE CELULOSE SUBMETIDA A DIFERENTES TRATAMENTOS ENZIMÁTICOS

Amostra/tempo de tratamento (min)	Dimensões dos cristalitos (nm) nas faces:		
	(1 -1 0)	(1 1 0)	(2 0 0)
0 (controle)	10,1	12,8	12,2
Tratadas com mistura CN			
20	10,1	12,1	12,0
40	10,0	12,6	12,2
60	10,0	12,7	11,9
80	10,2	12,9	12,2
Tratadas com CBH I/II-			
60	10,1	12,7	12,4
90	10,2	12,9	12,6
120	10,2	12,9	12,4
180	10,4	13,0	12,5
240	10,1	12,7	12,5

#### 4.7.2 Micrografias eletrônicas de varredura

As micrografias eletrônicas de varredura (Fig. 4.25) mostram modificações na morfologia das fibras de celulose bacteriana. A celulose não hidrolisada (a, b) apresenta feixes de fibras mais compactos, cercados de regiões com fibras mais

dispersas (a). Uma maior magnificação (b) revela fibras em forma de fitas com grande regularidade de largura, estimada em 70 a 90 nm a partir das imagens. Curiosamente, a celulose tratada com CBH I/II- constitui-se de fibras com a mesma largura (d), embora uma observação com menor magnificação (c) mostre que se encontram dispersas de forma muito mais homogênea que o material original. A hidrólise com mistura CN produziu uma massa compacta (e), cuja ampliação revela que ocorreu um considerável afinamento das fibras individuais.

O nível de ampliação das imagens foi suficiente para confirmar que a atividade endoglucanásica foi efetiva em dispersar as fibras, embora não permita confirmar a hipótese de que tal dispersão ocorra pelo processo ilustrado na Fig. 4.7. Maiores ampliações não foram possíveis pela degradação das fibras. A secagem necessária para a observação no MEV também dificulta uma avaliação mais precisa da morfologia das fibras, uma vez que elas tendem a se depositar sobre sua face mais larga, impedindo uma estimativa de sua espessura. Já a ação mais agressiva do complexo celulásico completo (mistura CN) sobre a morfologia das fibras foi confirmada. Embora haja uma boa dispersão das fibras submetidas a esse tratamento, defeitos gerados pela hidrólise reduzem o incremento nas propriedades de reforço.

#### 4.6.3 Micrografias de força atômica

A Fig. 4.26 mostra imagens de microscopia de força atômica (AFM) das fibras de celulose antes e depois do tratamento com endoglucanases (CBH I/II-) por 60 min. As nanofibras de celulose não-tratada encontram-se parcialmente agrupadas em feixes. Tal organização não é visível na celulose após a hidrólise parcial, evidenciando a desagregação sofrida pela mesma. Essa alteração de morfologia pode ser a responsável pela maior dispersibilidade da celulose tratada na matriz polimérica e contribuir para a sua maior capacidade de reforço estrutural.

Na Fig. 4.27 tem-se uma imagem com maior magnificação das mesmas amostras, acompanhadas de perfis obtidos a partir de processamento da imagem pelo *software* do microscópio. Não são percebidas alterações significativas nas dimensões (altura e largura) das nanofibras, embora o perfil da celulose tratada enzimaticamente pareça mais arredondado.

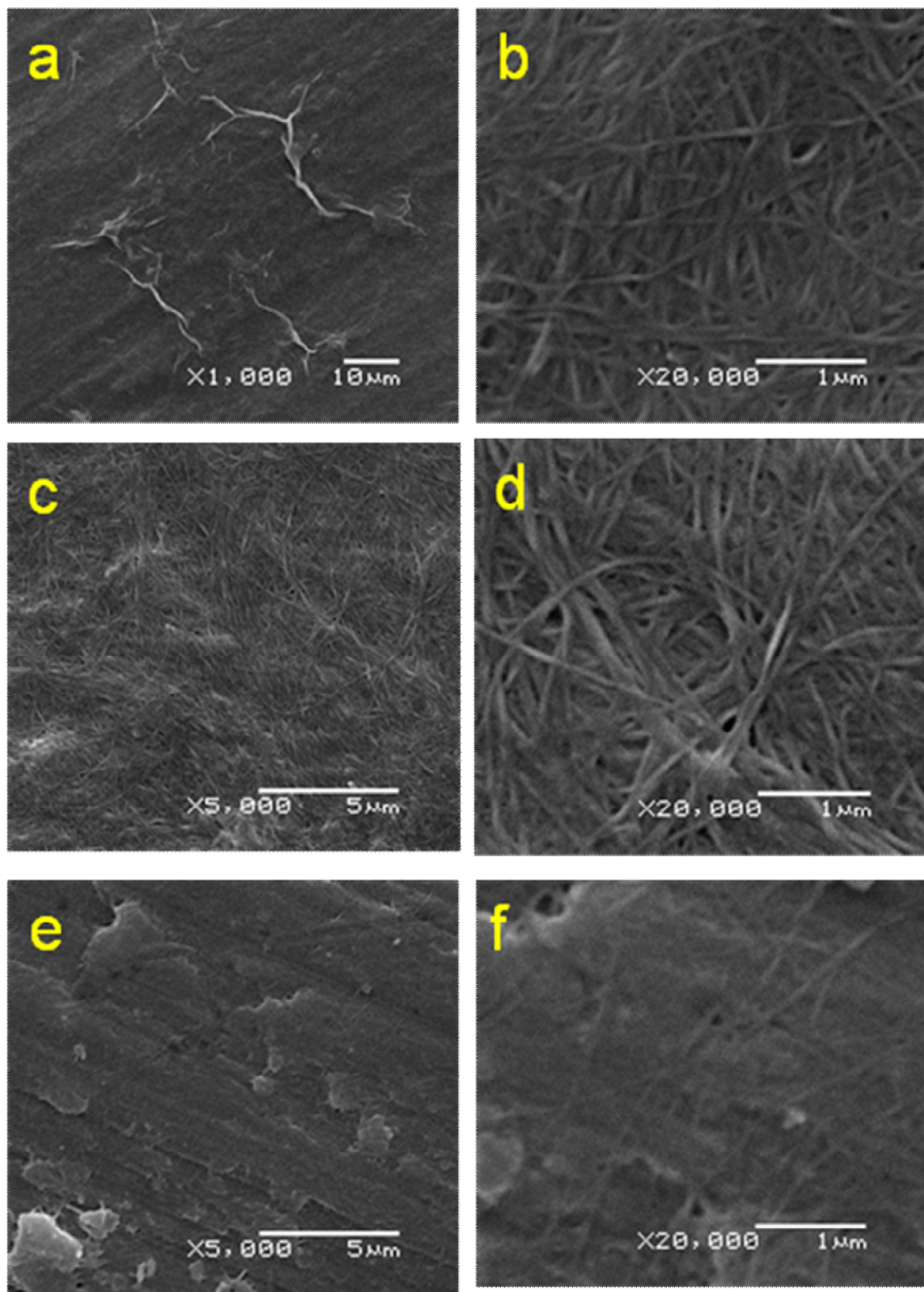


FIGURA 4.25 – IMAGENS DE MEV DAS FIBRAS DE CELULOSE BACTERIANA NÃO TRATADA (a,b), TRATADA COM CBHI/II- POR 60 MINUTOS (c,d) E COM MISTURA CN POR 80 MINUTOS (e,f)

A celulose não hidrolisada apresenta regiões onde as nanofibras mudam subitamente de direção (setas vermelhas), que podem indicar “contornos de grãos” nos cristalitos (ver item 2.1.3). Além disso, regiões com superfície extremamente irregular (setas azuis) também são notadas. O tratamento enzimático parece “suavizar” a superfície das fibras, reduzindo a presença dessas regiões (Fig. 4.27b). É possível que a redução dessas áreas irregulares nas fibras esteja relacionada com o aumento da resistência à tração dos compósitos por um mecanismo análogo ao proposto por NAKAGAITO e YANO (2004) para a celulose microfibrilada. Segundo os autores, a fibrilação mecânica da celulose elimina defeitos cristalinos nas nanofibrilas que poderiam atuar como propagadores de trincas no material. Os compósitos mencionados nesse artigo apresentam um súbito melhoramento na sua resistência à tração a partir de um determinado nível de fibrilação. Pode-se cogitar que tal fenômeno seja semelhante à desagregação pela ação das enzimas acompanhada, como mostram as imagens acima, por alterações morfológicas nas nanofibrilas.

A Fig. 4.28 mostra uma projeção em relevo da mesma imagem superior da Fig. 4.27, mostrando mais claramente o perfil achatado, semelhante a fitas, das nanofibrilas de celulose bacteriana.

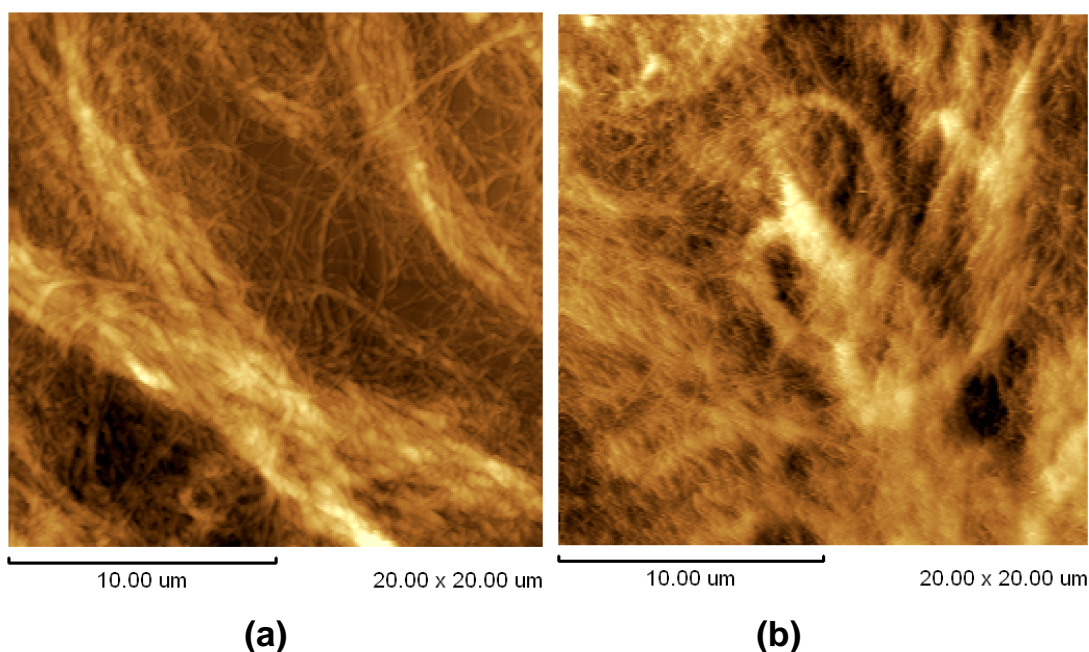


FIGURA 4.26 – MICROGRAFIAS DE FORÇA ATÔMICA DA CELULOSE BACTERIANA NÃO TRATADA (a) E TRATADA COM CBH I/II- POR 60 MINUTOS (b)

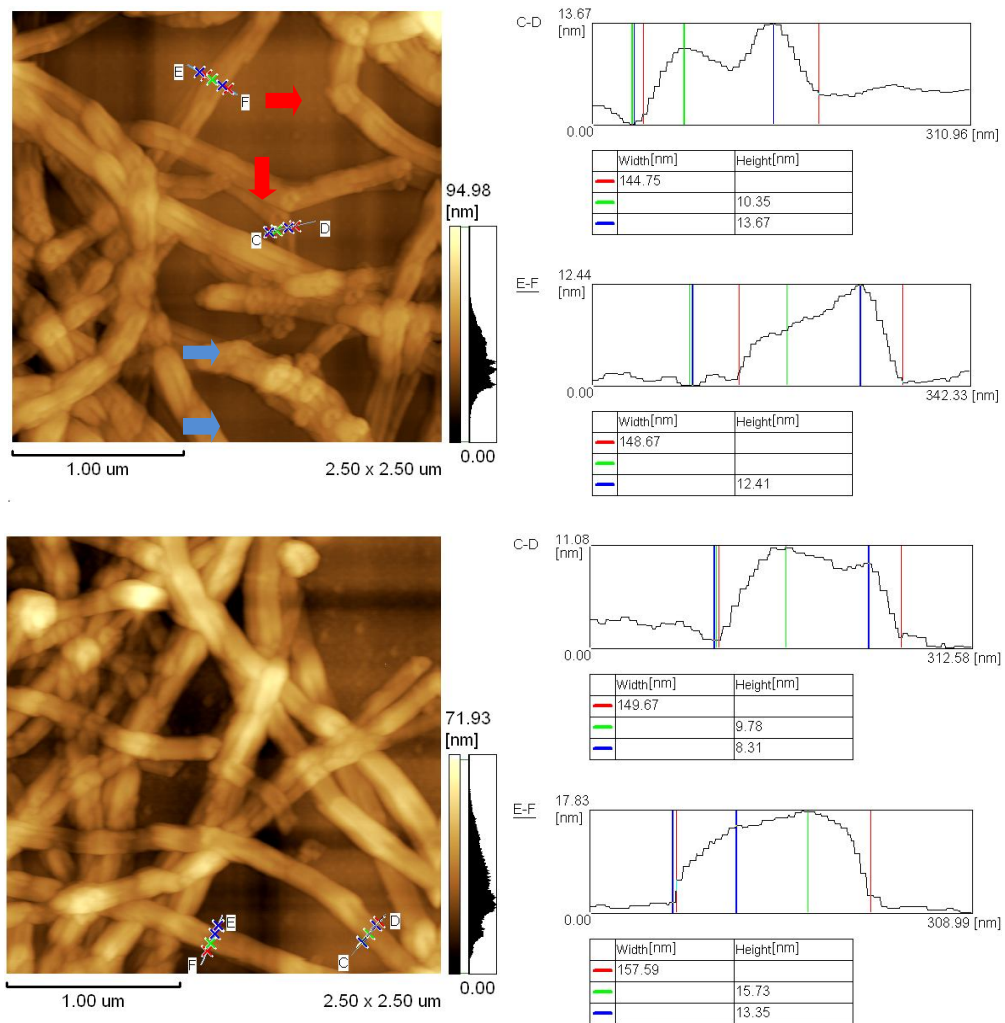


FIGURA 4.27 – MICROGRAFIAS DE FORÇA ATÔMICA DE CELULOSE NÃO TRATADA (ACIMA) E TRATADA COM CBH I/II- POR 60 min (ÁBAIXO), ACOMPANHADAS DE SEUS RESPECTIVOS PERFIS

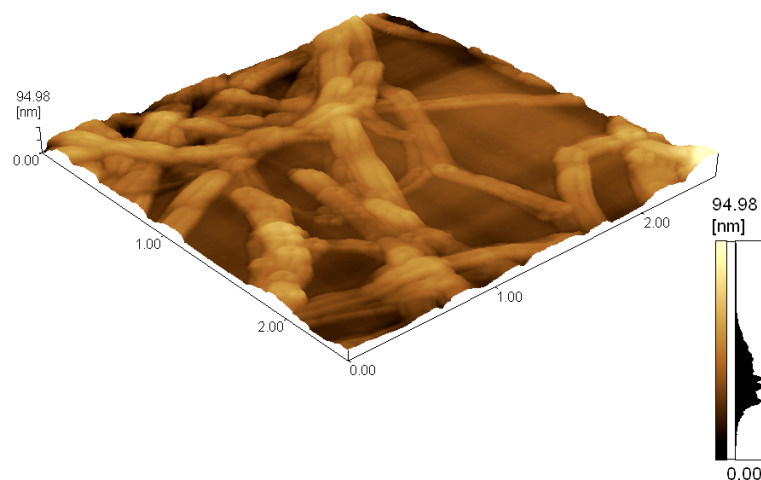


FIGURA 4.28 – MICROGRAFIA DE FORÇA ATÔMICA DA CELULOSE BACTERIANA NÃO TRATADA, PROCESSADA DE FORMA A MOSTRAR SEU RELEVO

#### 4.7.4 Grau de polimerização

A tabela 4.5 mostra o grau de polimerização e a polidispersividade da celulose antes e depois da hidrólise parcial. Observa-se que, após uma súbita redução do grau de polimerização nos primeiros minutos de hidrólise, essa redução torna-se mais gradual. Tal comportamento parece confirmar o que já foi discutido a partir dos cromatogramas do meio de hidrólise da celulose: há uma rápida desintegração das regiões entre as nanofibrilas, seguida de uma erosão mais lenta e gradual das próprias nanofibrilas.

As endoglucanases da CBHI/II- agiram de forma distinta. Houve uma queda do grau de polimerização das amostras (Tab. 4.6) desproporcional à pequena conversão da celulose em açúcares solúveis observada nas hidrólises com endoglucanases. Pode-se atribuir essa queda ao rompimento das cadeias de celulose em pontos aleatórios que, embora tenha um limitado efeito erosivo sobre os cristalitos, produz uma população de cadeias de menor massa molecular. O mecanismo de ação proposto na Fig. 4.7 ajusta-se bem a essas observações.

Na Fig. 4.29, observam-se cromatogramas de permeação em gel de amostras de celulose tricarbamilada obtidas a partir de celulose tratada com mistura CN. Os picos mostrados foram normalizados em relação às suas áreas, de forma a mostrar as alterações na proporção entre populações de maior e menor massa molecular. Como tempos de eluição maiores correspondem a menores massas moleculares, pode-se observar que o início da hidrólise ocorre com uma redução geral do tamanho das cadeias, evidenciado pelo deslocamento dos picos para a direita. Para tempos maiores, esse deslocamento torna-se muito menor, sugerindo uma ação erosiva sobre as fibras semelhante à proposta por RAMOS *et al.* (1999).

TABELA 4.5 – MÉDIA PONDERADA DO GRAU DE POLIMERIZAÇÃO ( $DP_w$ ), MÉDIA ARITMÉTICA DO GRAU DE POLIMERIZAÇÃO ( $DP_n$ ) E POLIDISPERSIVIDADE ( $DP_w/DP_n$ ) DA CELULOSE TRATADA COM MISTURA CN

Tempo de tratamento (min)	$DP_w$	$DP_n$	$DP_w/DP_n$
0 (controle)	2314	647	3,57
20	1186	303	3,91
40	1012	279	3,62
60	1030	242	4,25

TABELA 4.6 – MÉDIA PONDERADA DO GRAU DE POLIMERIZAÇÃO ( $DP_w$ ), MÉDIA ARITMÉTICA DO GRAU DE POLIMERIZAÇÃO ( $DP_n$ ) E POLIDISPERSIVIDADE ( $DP_w/DP_n$ ) DA CELULOSE TRATADA COM CBH I/II-

Tempo de tratamento (min)	$DP_w$	$DP_n$	$DP_w/DP_n$
0 (controle)	2314	647	3,57
60	1439	553	2,60
90	1213	553	2,19
120	1199	373	3,21
150	1047	380	2,76
180	496	218	2,28
240	430	166	2,59

A ação das endoglucanases (Fig. 4.30) é mais gradual, havendo um deslocamento constante em direção a menores graus de polimerização. Em tempos de hidrólise mais longos (240 min) há a formação de um ombro à direita da curva, mostrando a formação de uma população de cadeia de grau de polimerização reduzido.

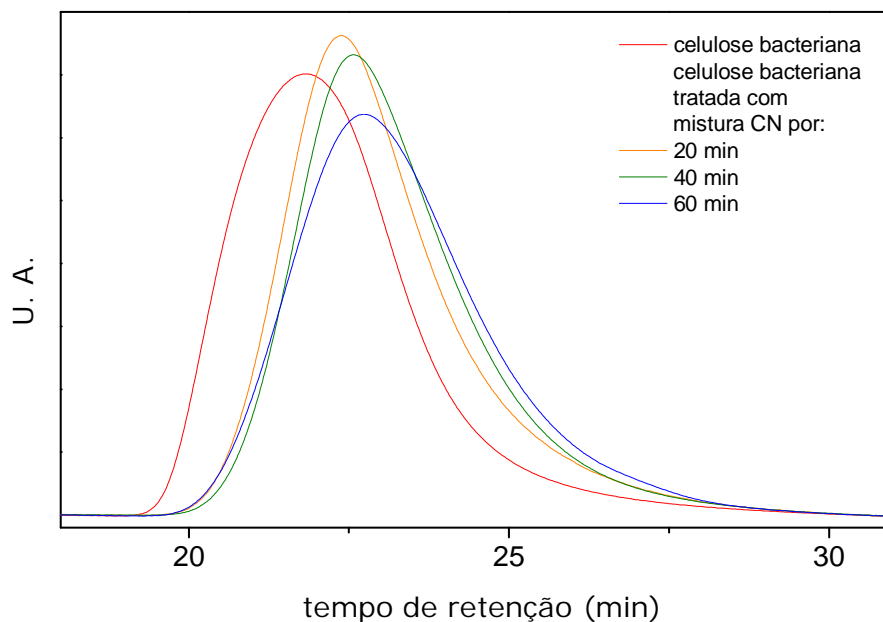


FIGURA 4.29 – CROMATOGRAMAS DE PERMEÇÃO EM GEL DOS TRICARBANILATOS DE CELULOSE OBTIDOS A PARTIR DE AMOSTRAS PARCIALMENTE HIDROLISADAS COM MISTURA CN

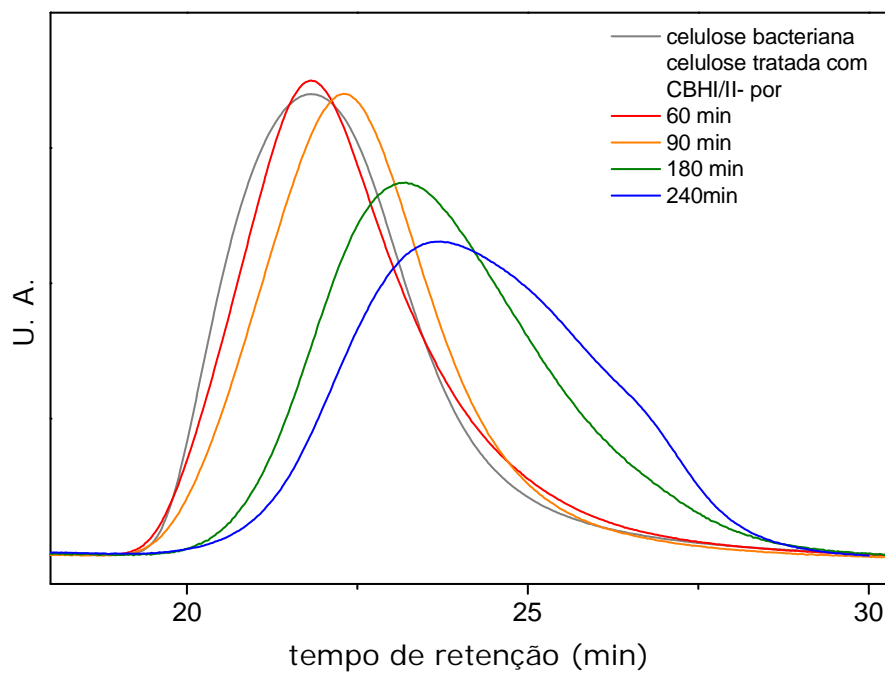


FIGURA 4.30 – CROMATOGRAMAS DE PERMEÇÃO EM GEL DOS TRICARBANILATOS DE CELULOSE OBTIDOS A PARTIR DE AMOSTRAS PARCIALMENTE HIDROLISADAS COM CBH I/II-

## 5 CONCLUSÃO

A celulose bacteriana revelou-se uma fonte de nanofibras com propriedades ideais como reforço de materiais poliméricos. O processo enzimático utilizado para produzir as nanofibras, além de rápido, proporciona ótimos rendimentos, pois uma fração muito pequena da celulose bacteriana – cerca de 1%, no caso da hidrólise com endoglucanases – é perdida por conversão a glucose e celobiose. As nanofibras obtidas apresentam dimensões semelhantes às da celulose bacteriana não submetida a hidrólise, porém dispersam-se muito mais facilmente na matriz polimérica estudada. Modificações na morfologia das nanofibras, observadas por microscopia eletrônica e de força atômica, são responsáveis por essa maior dispersibilidade.

O uso de amido de mandioca nativo na produção dos filmes foi uma escolha acertada. Além de ser uma matéria prima abundante e barata, o uso de *casting* resultou em filmes regulares e muito bem plastificados, como atestam seus difratogramas de raios X. Mesmo após dez dias de acondicionamento, apenas uma cristalinidade residual se desenvolveu nos filmes sem reforço de nanofibras.

A incorporação das nanofibras parcialmente hidrolisadas à matriz de amido plastificado exigiu apenas agitação vigorosa durante o processo de gelatinização do amido em presença da celulose. A esperada compatibilidade entre o amido e a celulose foi confirmada pelas imagens de SEM dos filmes tracionados. A impossibilidade de se observar feixes de fibras na região de ruptura dos filmes confirma que os mesmos tratam-se de *nanocompósitos*, pois qualquer eventual agrupamento de nanofibras deve ter dimensões nanométricas ou seria observado diretamente por SEM. A transparência apresentada pelos compósitos, comparável à do amido termoplástico não reforçado, é mais um indicativo do elevado grau de dispersão das fibras no interior dos compósitos.

As propriedades mecânicas dos nanocompósitos são muito superiores às do amido plastificado sem reforço estrutural. Houve uma drástica redução do alongamento na ruptura – de cerca de 70% em relação ao filme não reforçado. O módulo de Young e o limite de resistência à tração sofreram alterações positivas significativas.

A comparação entre as propriedades mecânicas dos diferentes compósitos é talvez mais interessante que a comparação com o amido termoplástico não

reforçado, uma vez que os resultados acima já eram esperados se levarmos em conta trabalhos semelhantes mencionados na literatura. Apesar de aparentemente não ter havido nenhuma alteração morfológica mais profunda nas nanofibras, o compósito utilizando celulose tratada enzimaticamente alcançou um módulo de elasticidade quatro vezes maior e um limite de resistência à tração duas vezes superior aos do compósito com fibra não tratada. Porém, com a continuidade do tratamento enzimático, tais propriedades decaíram, aproximando-se dos valores iniciais.

Algumas hipóteses em relação ao comportamento acima descrito podem ser inferidas da caracterização tanto dos filmes quanto das nanofibras. Nestas últimas, modificações morfológicas sutis observadas em AFM podem ser resultantes da eliminação de parte dos defeitos superficiais das fibras por ação das enzimas. Por serem muito superficiais, tais alterações não são detectadas pela análise do índice de cristalinidade das fibras ou pela estimativa das dimensões de seus cristalitos. A indução de diferentes padrões de cristalização na matriz polimérica também pode estar relacionada com essas alterações superficiais.

Os resultados de GPC e HPLC parecem confirmar essas hipóteses, ao menos no caso do tratamento com endoglucanases. As diferentes taxas de produção de açúcares solúveis e de modificação do grau de polimerização apontam para dois momentos distintos durante a hidrólise: uma ação inicial sobre as regiões amorfas entre os cristalitos, que embora volumosas contribuem pouco para a massa total das fibras, seguida de uma ação mais efetiva sobre os cristalitos em si. O primeiro momento libera as fibras do seu emaranhamento, além de possivelmente eliminar defeitos na sua estrutura cristalina. A partir dos 60 min de hidrólise, as propriedades mecânicas começam a decair em função de danos mais profundos às nanofibrilas.

## 6 TRABALHOS FUTUROS

As propriedades mecânicas dos bionanocompósitos obtidos até o momento baseiam-se todas em materiais com 2,5% de fibras em relação à massa de amido. No entanto, é importante determinar o quanto a variação dessa proporção influencia nessas propriedades. Experimentos nesse sentido já estão em curso, embora seus resultados não possam ainda ser apresentados por estarem em fase preliminar.

Quanto às características das fibras já obtidas, há a necessidade de se conhecer com maior detalhe o mecanismo que leva ao aumento da capacidade de reforço das mesmas. Ensaio de solubilidade em álcali poderiam revelar a proporção entre a fração amorfa, mais suscetível à solubilização em álcali, e a fração cristalina. Tal informação permitiria esclarecer se o mecanismo de desagregação proposto neste trabalho é de fato o que ocorre.

Os bionanocompósitos obtidos até agora tenham propriedades mecânicas superiores ao amido termoplástico e a biocompósitos de amido plastificado convencionais. Entretanto, sua aplicação tecnológica ainda esbarra em algumas questões fundamentais, como sua sensibilidade à umidade e susceptibilidade ao ataque de fungos e bactérias. Para resolver esses problemas, estuda-se a possibilidade de aplicar-se aos filmes algum tratamento superficial que reduza sua permeabilidade. Entre essas possibilidades estariam o tratamento com plasma ou a hidrofobização da superfície pela deposição de uma camada de um polímero hidrofóbico.

A mudança da matriz polimérica também é uma possibilidade interessante, uma vez que as nanofibras poderiam ser dispersas em acetato de polivinila (PVA) ou outro polímero com propriedades hidrofílicas. Tal mudança poderia trazer melhoras nas propriedades mecânicas e na trabalhabilidade dos compósitos, porém não minimizaria a sua sensibilidade à ação da água. Para tanto, uma nova matriz polimérica teria que ser hidrofóbica, o que exigiria funcionalização da superfície das fibras de forma a compatibilizá-las com a matriz.

## 7 TRABALHOS PUBLICADOS OU EM ELABORAÇÃO

Apresentação de painel: **Propriedades mecânicas de bionanocompósitos de amido plastificado com glicerol, reforçados com nanofibras de celulose bacteriana.** XVI Encontro de Química da Região Sul (SBQSul). Blumenau: Universidade Regional de Blumenau (FURB)/PROPEX, 15 de novembro de 2008.

Patente submetida ao NPI/UFPR em 21 de maio de 2009: **Processo de obtenção de nanocompósitos (...)**

WOEHL, M. A.; MIKOWSKI, A.; RAMOS, L. P.; WYPYCH, F. **Bacterial cellulose nanofibers/thermoplastic starch bionanocomposites. 1. Effect of enzymatic treatment of the cellulose on the mechanical properties of the composites.** Artigo em preparação, a ser submetido à revista **Carbohydrate Polymers.**

WOEHL, M. A.; MIKOWSKI, A.; RAMOS, L. P.; WYPYCH, F. **Bacterial cellulose/thermoplastic starch bionanocomposites. 2. Physical characterization of the composite films.** Artigo em preparação, a ser submetido à revista **Carbohydrate Polymers.**

## REFERÊNCIAS

ABE, K.; IWAMOTO, S.; YANO, H. Obtaining cellulose nanofibers with a uniform width of 15 nm from wood. **Biomacromolecules**, 8, 3276-3278. 2007.

ÀNGLES, M. N.; DUFRESNE, A. Plasticized starch/tunicin whiskers nanocomposites. 1. Structural analysis. **Macromolecules**, 33, 8344-8353. 2000.

ÀNGLES, M. N.; DUFRESNE, A. Plasticized starch/tunicin whiskers nanocomposites. 2. Mechanical behavior. **Macromolecules**, 34, 2921-2931, 2001.

AVÉROUS, L.; FRIGANT, A.; MORO, L. Plasticized starch-cellulose interactions in polysaccharide composites. **Polymer**, 42, 6565-6572. 2001.

BHATNAGAR, A.; SAIN, M. Processing of cellulose nanofiber-reinforced composites. **Journal of Reinforced Plastics and Composites**, 24, 1259-1268. 2005.

BILLMEYER Jr., F. W. **Textbook of Polymer Science**. 2<sup>a</sup>. ed. New York: John Wiley & Sons, 1971.

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

CALLISTER Jr., W. D. **Ciência e engenharia de materiais: uma introdução**. 5<sup>a</sup>. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2002.

CALLISTER Jr., W. D. **Fundamentos de ciência e engenharia de materiais: uma abordagem integrada**. 2<sup>a</sup>. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2006.

CARRAHER Jr., C. H. **Polymer chemistry: an introduction**. 3<sup>rd</sup> ed. New York: Marcel Dekker, 1996.

CHAPLIN, M. F.; KENNEDY, J. F. **Carbohydrate Analysis**. 2a. ed. New York: Oxford University Press, 1994.

CHEETHAM, N. W. H.; TAO, L. Variation in crystalline type with amylase content in maize starch granules: An X-ray powder diffraction study. **Carbohydrate Polymers**, 36, 277-284. 1998.

CHEN, B.; EVANS, J.R. Thermoplastic starch-clay nanocomposites and their characteristics. **Carbohydrate Polymers**, 61, 4, 455-463. 2005.

CHEN, Y.; STIPANOVIC, A. J.; WINTER, W. T.; WILSON, D. B.; KIM, Y.-J. Effect of digestion by pure cellulases on crystallinity and average chain length for bacterial and microcrystalline celluloses. **Cellulose**, 14, 283-293. 2007.

DALMAS, F.; CHAZEAU, L.; GAUTHIER, C.; CAVAILLÉ, J.-Y.; DENDIEVEL, R. Large deformation mechanical behavior of flexible nanofiber filler polymer nanocomposites. **Polymer**, 47, 2802-2812. 2006.

ELAZZOUI-HAFRAOUI, S.; NISHIYAMA, Y.; PUTAUX, J.-L.; HEUX, L.; DUBREUIL, F.; ROCHS, C. The shape and size distribution of crystalline nanoparticles prepared by acid hydrolysis of native cellulose. **Biomacromolecules**, 9, 57-65. 2008.

FENGEL, D.; WEGENER, G. **Wood: chemistry, ultrastructure, reactions**. Berlin: Walter de Gruyter, 1989.

FREITAS, R. A. **Estrutura e interações entre galactoxiloglucanas e amidos**. Tese de doutorado. Curitiba: UFPR, 2003.

FRANCO, C. M. L.; DAIUTO, E. R.; DEMIATE, I. M.; CARVALHO, L. J. C. B.; LEONEL, M.; CEREDA, M. P.; VILPOUX, O. F.; SARMENTO, S. B. S. **Culturas de tuberosas amiláceas latino americanas**. Rio de Janeiro: Fundação Cargill, 2002.

GARCIA, A.; SPIM, J. A.; SANTOS, C. A. **Ensaio dos Materiais**. Rio de Janeiro: LTC – Livros Técnicos e Científicos Editora, s. d.

GHOSE, T.K. Measurement of cellulase activities. **Pure & Applied Chemistry**, 59, 257-268. 1987.

GILBERT, H. J.; STÅLBRAND, H.; BRUMER, H. How the walls come crumbling down: recent structural biochemistry of plant polysaccharide degradation. **Current Opinion in Plant Biology**, 11, 338-348. 2008.

GINDL, W.; KECKES, J. Tensile properties of cellulose acetate butyrate composites reinforced with bacterial cellulose. **Composites Science and Technology**, 64, 2407-2413. 2004.

HAYASHI, N.; SHUGIYAMA, J.; OKANO, T.; ISHIHARA, M. The enzymatic susceptibility of cellulose microfibrils of the algal-bacterial type and the cotton-ramie type. **Carbohydrate research**, 305, 261-269. 1998.

HAYASAH, N.; KONDO, T.; ISHIHARA, M.. Enzymatically produced nano-ordered short elements containing cellulose I beta crystalline domains. **Carbohydrate Polymers**, 61, 191-197. 2005.

HORII, F. Structure of cellulose: recent developments in its characterization. Em HON, D. N.-S. e SHIRAIISHI, N. **Wood and Cellulosic Chemistry**. 2a. ed. Basel: Marcel Dekker. 2001.

HULLEMAN, S. H. D.; KALISVAART, M. G.; JANSSEN, F. H. P.; FEIL, H.; VLIEGENTHART, J. F. G. Origins of B-type crystallinity in glycerol-plasticised, compression-moulded potato starches. **Carbohydrate Polymers**, 39, 351-360. 1999.

HUSSAIN, F.; HOJJATI, M.; OKAMOTO, M.; GORGA, R. E. Polymer-matrix nanocomposites, processing, manufacturing, and application: an overview. **Journal of Composite Materials**, 40, 1511-1575. 2006.

HSIEH, Y.-C.; YANO, H.; NOGI, M.; EICHHORN, S. J. An estimation of the Young's modulus of bacterial cellulose filaments. **Cellulose**, 15, 507-513. 2008.

IGUCHI, M.; YAMANAKA, S.; BUDHIONO, A. Bacterial cellulose – a masterpiece of nature's arts. **Journal of Materials Science**, 35, 261-270. 2000.

KLECHKOVSKAYA, V. V.; BAKLAGINA, Y. G.; STEPINA, N. D.; KHRIPUNOV, A. K.; BUFFAT, P. A.; SUVOROVA, E. I.; ZANAVESKINA, I. S.; TKACHENKO, A. A.; GLADCHENKO, S. V. Structure of cellulose *Acetobacter xylinum*. **Crystallography Reports**, 48, 755-762. 2003.

KOIZUMI, S.; YUE, Z.; TOMITA, Y.; KONDO, T.; IWASE, H.; YAMAGUCHI, D.; HASHIMOTO, T. Bacterium organizes hierarchical amorphous structure in microbial cellulose. **The European Physical Journal E**, 26, 137-142. 2008.

KOYAMA, M.; HELBERT, W.; IMAI, T.; SUGIYAMA, J.; HENRISSAT, B. Parallel-up structure evidences the molecular directionality during biosynthesis of bacterial cellulose. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 94, 9091-9095. 1997.

LÓPEZ-RUBIO, A.; LAGARON, J. M.; ANKERSFORS, M.; LINDSTRÖM, T.; NORDQVIST, D.; MATTOZZI, A.; HEDENQVIST, M. S. Enhanced film forming and film properties of amylopectin using micro-fibrillated cellulose. **Carbohydrate polymers**, 68, 718-727. 2007.

LU, Y.; LIHUI, W.; XIAODONG, C. Morphological, thermal and mechanical properties of ramie crystallites-reinforced plasticized starch biocomposites. **Carbohydrate Polymers**, 63, 198-204. 2006.

MALAININE, M. E.; MAHROUZ, M.; DUFRESNE, A. Thermoplastic nanocomposites based on cellulose microfibrils from *Opuntia ficus-indica* parenchyma cell. **Composites Science and Technology**, 65, 1520-1526. 2005.

MANN, A. B. Nanomechanical properties of solid surfaces and thin films. Em: BHUSHAN, B (editor). **Springer Handbook of nanotechnology**. 2<sup>a</sup> ed. Berlin: Springer, 2007.

MARCHESSAULT, R. H.; MOREHEAD, F. F.; WALTER, N. M. Liquid crystal systems from fibrillar polysaccharides. **Nature**, 184, 632-633. 1959.

MARTINS, L. F. **Caracterização do complexo celulásico de *Penicillium echinulatum***. Dissertação de Mestrado. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 2005.

MATHEW, A. P.; DUFRESNE, A. Morphological investigation of nanocomposites from sorbitol plasticized starch and tunicin whiskers. **Biomacromolecules**, 3, 609-617. 2002.

MATTOS, P. L. P.; CARDOSO, E. M. R. **Cultivo da mandioca para o estado do Pará**. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 2003. Disponível em: [http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/fontesHTML/Mandioca/mandioca\\_para/importancia.htm](http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/fontesHTML/Mandioca/mandioca_para/importancia.htm). Acesso em 12 jan. 2009.

MATVEEV, Y. I.; GRINBERG, V. Y.; TOLSTOGUZOV, V. B. The plasticizing effect of water on proteins, polysaccharides and their mixtures. Glassy state of biopolymers, food and seeds. **Food Hydrocolloids**, 14, 425-437. 2000.

MUKHERJEE, S. M.; WOODS, H. J. X-ray and electron microscope studies of the degradation of cellulose by sulfuric acid. **Biochimica et Biophysica acta**, 10, 499-511. 1953.

MUNK, P. **Introduction to Macromolecular Science**. New York: John Wiley & Sons, 1989.

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

ORTS, W.J.; SHEY, J.; IMAM, S.H.; GLENN, G.M.; GUTTMAN, M.E.; REVOL, J.F. Application of cellulose microfibrils in polymer nanocomposites. **Journal of polymer and the environment**, 13, 4, 301-306. 2005.

PÄÄKÖ, M.; ANKERSFORS, M.; KOSONEN, H.; NYKÄNEN, A.; AHOLA, S.; ÖSTERBERG, M.; RUOKOLAINEN, J.; LAINE, J.; LARSSON, P. T.; IKKALA, O.; LINDSTROM, T. Enzymatic hydrolysis combined with mechanical shearing and high-pressure homogenization for nanoscale cellulose fibrils and strong gels. **Biomacromolecules**, 8, 1934-1941. 2007.

PETERSON, L.; OKSMAN, K. Biopolymer based nanocomposites: comparing layered silicates and microcrystalline cellulose as nanoreinforcement. **Composite Science and Technology**, 66, 2187-2196. 2006.

PITARELO, A. P. **Avaliação da susceptibilidade do bagaço e da palha da cana-de-açúcar à bioconversão via pré-tratamento a vapor e hidrólise enzimática**. Dissertação de Mestrado. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 2007.

RAMOS, L. P. **Steam pretreatment and enzymatic hydrolysis of *Eucalyptus viminalis* chips**. Ph. D. Thesis. Ottawa: University of Ottawa, 1992.

RAMOS, L. P. Celulose: estrutura, propriedades e bioconversão. *In* **Química e tecnologia de fitobiomassas**. Curitiba: UFPR. 2000.

RAMOS, L. P. Determination of cellulose degree of polymerization using universal calibration and gel permeation chromatography. *In*: **Proceedings of the VII Brazilian Symposium on the chemistry of lignin and other wood components**. Belo Horizonte, 2001.

RAMOS, L. P. The chemistry involved in the steam treatment of lignocellulosic materials. **Química Nova**, 26, 863-871. 2003.

RAMOS, L.P; ZANDONÁ Filho, A.; DESCHAMPS, F. C.; SADDLER, J. N. The effect of *Trichoderma* cellulases on the fine structure of a bleached softwood kraft pulp. **Enzyme and Microbial Technology**, 24, 371-380. 1999.

RÄTTÖ, M; RITSCHKOFF, A. C.; VIIKARI, L. The effect of oxidative pretreatment on cellulose degradation by *Poria placenta* and *Trichoderma reesei* cellulases. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 48, 53-57. 1997.

ROMERO-BASTIDA, C. A.; BELLO-PÉREZ, L. A.; GARCÍA, M. A.; MARTINO, M. N.; SOLORZA-FERIA, J.; ZARITZKY, N. E. Physicochemical and microstructural characterization of films prepared by thermal and cold gelatinization from non-conventional sources of starches. **Carbohydrate Polymers**, 60, 235-244. 2005.

SAMEJIMA, M.; SUGIYAMA, J.; IGARASHI, K.; ERIKSSON, K.-E. L. Enzymatic hydrolysis of bacterial cellulose. **Carbohydrate Research**, 305, 281-288. 1998.

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

SIMONSEN, J. **Bio-based nanocomposites: challenges and opportunities.**

Disponível em:

<http://woodscience.oregonstate.edu/faculty/simonsen/Nanocomposites>. Acesso em: 19 mar. 2007.

SJÖSTRÖM, E. **Wood chemistry: fundamentals and applications.** 2a. ed. San Diego: Academic Press, 1993.

SOLOMONS, T. W. G. Carbohydrates. In: **Organic Chemistry.** 2a. ed. New York: John Wiley, 1996.

STAEL, G.C.; TAVARES, M.I.B.; D'ALMEIDA, J.R.M. Impact behavior of sugarcane bagasse waste-EVA composites. **Polymer Testing**, 20, 8, 869-872. 2001.

STURCOVA, A.; DAVIES, G. R.; EICHHORN, J. Elastic modulus and stress-transfer properties of tunicate cellulose whiskers. **Biomacromolecules**, 6, 1055-1061. 2005.

SUGIYAMA, J.; VUONG, R.; CHANZY, H. Electron-diffraction study on the 2 crystalline phases occurring in native cellulose from an algal cell-wall. **Macromolecules**, 24, 4168-4175. 1991.

TALJA, R. A.; HELÉN, H.; ROOS, Y. H.; JOUPILLA, K. Effect of various polyols and polyol contents on physical and mechanical properties of potato starch-based films. **Carbohydrate polymers**, 67, 288-295. 2007.

**TAPPI Test Methods.** Atlanta: TAPPI Press, 1994.

TEERI, T. T. Crystalline cellulose degradation: new insight into the function of cellobiohydrolases. **Tibtech**, 15, 160-167. 1997.

TEIXEIRA, E. M. **Utilização de amido de mandioca na preparação de novos materiais termoplásticos**. Tese de Doutorado. São Carlos: Universidade de São Paulo, 2007.

THIRÉ, R. M. S. M.; ANDRADE, C. T.; SIMÃO, R. A. Effect of aging on the microstructure of plasticized cornstarch films. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, 15, 130-133. 2005.

TJONG, S.C. Structural and mechanical properties of polymer nanocomposites. **Materials Science and Engineering Reports**, vol.53, p. 73. 2006.

TOMME, P.; WARREN, R. A. J.; GILKES, N. R. Cellulose hydrolysis by bacteria and fungi. In Poole, R. K. **Advances in microbial physiology**. London: Academic Press, 1995.

USUKI, A.; KOJIMA, Y.; KAWASUMI, M.; OKADA, A.; KURAUCHI, T.; KAMIGAITO, O. Characterization and properties of nylon-6-clay hybrid. **Abstracts of papers of the American Chemical Society**, vol.200, p.218. 1990.

VALTASAARI, L.; SAARELA, K. Determination of chain length distribution of cellulose by gel permeation chromatography using the tricarbanilate derivative. **Paperi ja Puu**, 57, 5-10. 1975.

VAN SOEST, J. J. G.; Vliegenthart, J. F. G. Crystallinity in starch plastics: consequences for material properties. **Tibtech**, 15, 208-212. 1997.

WILHELM, H. M.; SIERAKOWSKI, M.R.; SOUZA, G. P.; WYPYCH, F. Starch films reinforced with mineral clay. **Carbohydrate Polymers**, 52, 101-110. 2003.

YANO, S.; MAEDA, H.; NAKAJIMA, M.; HAGIWARA, T.; SAWAGUCHI, T. Preparation and mechanical properties of bacterial cellulose nanocomposites loaded with silica nanoparticles. **Cellulose**, 15, 111-120. 2008.

YU, L.; DEAN, K.; LI, L. Polymer blends and composites from renewable resources. **Progress in Polymer Science**, 31, 576-602. 2006.

ZANDONÁ Filho, A. **Caracterização de celulasas derivadas de cepas recombinantes de *Trichoderma reesei* e uso no tratamento de fibras celulósicas comerciais**. Tese de Doutorado. Curitiba: UFPR, 2001.

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