

DANIELA LEOCÁDIO SILVA

**INFLUÊNCIA DA ADIÇÃO DE NANOCRISTAIS E NANOFIBRILAS DE
CELULOSE EXTRAÍDAS DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR NAS
PROPRIEDADES DE EMBALAGENS BIODEGRADÁVEIS ATIVAS À BASE
DE PECTINA.**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2016**

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

S586i

2016

Silva, Daniela Leocádio, 1979-

Influência da adição de nanocristais e nanofibrilas de celulose extraídas de bagaço de cana-de-açúcar nas propriedades de embalagens biodegradáveis ativas à base de pectina / Daniela Leocádio Silva. – Viçosa, MG, 2016.

xvii, 168f. : il. ; 29 cm.

Orientador: Nilda de Fátima Ferreira Soares.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Tecnologia de alimentos. 2. Embalagens. 3. Bagaço de cana. 4. Celulose. 5. Biopolímeros. 6. Nanotecnologia. 7. Nisina. 8. Pectina. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Tecnologia de Alimentos. Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. II. Título.

CDD 22. ed. 664.09

DANIELA LEOCÁDIO SILVA

**INFLUÊNCIA DA ADIÇÃO DE NANOCRISTAIS E NANOFIBRILAS DE
CELULOSE EXTRAÍDAS DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR NAS
PROPRIEDADES DE EMBALAGENS BIODEGRADÁVEIS ATIVAS À BASE
DE PECTINA.**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 18 de novembro de 2016.

Nathália Ramos de Melo

Eber Antonio Alves Medeiros
(Coorientador)

Graciela Ines Bolzon de Muniz

Washington Azevedo da Silva

Jorge Luiz Colodette
(Presidente)

“ A gente precisa continuar acreditando: que vale a pena ser honesto. Que vale a pena estudar. Que vale a pena trabalhar. Que é preciso construir: a vida,o futuro, o caráter, a família, as amizades e os amores”

Ly Luft

AGRADECIMENTOS

Tenho muito a agradecer. Nada disso seria possível sem a ajuda de muita gente! Em primeiro lugar, agradeço a Deus por me dar capacidade e força, por ser meu amigo, por iluminar sempre meu caminho e por ser minha fonte de equilíbrio e paz.

À minha mãe Maria das Graças por me ensinar tanto, e por ser fonte coragem, força e fé.

Ao meu Marido Camilo por seu amor e por sua paciência que parece ser infinita, principalmente nas épocas de correria, estresse e por me ensinar tanto, cuidar de mim e me motivar sempre. Sua compreensão e seu amor foi essencial em todos os momentos.

A toda minha família e amigos, que torcem muito por mim, especialmente Joesse Krüge, Debora, Ranieli, Conceição, Mayra, Silma, Elenice, Vitor, Marcelo, Shirley, João Paulo, Maju, Angelo Bruno, Paulinha, Rozimar, Nani, Flávia, Rosilene, Pedrinho, Hernani, Maria Cristina, Fábio, minha sogra Eva, meu sogro Tião, Eliana, Daniela Lana.

À minha orientadora, Dra. Nilda de Fátima Ferreira Soares, pela oportunidade, orientação, confiança, amizade e pela competência que sempre nos motiva a seguir em frente. Serei eternamente grata.

Ao Dr. Jorge Luiz Colodette por me co-orientar, me ensinar, me apoiar sempre e acreditar no meu trabalho. Pelas palavras de incentivo nas horas certas e pelo grande exemplo de competência, dedicação e profissionalismo. Sou sua grande fã!

Ao Dr. Eber pela co-orientação, conselhos, apoio e preciosa participação.

Ao Dr. Washington pela valiosa participação e sugestões na minha qualificação e defesa de doutorado.

À professora Dra. Graciela Ines Bolzon de Muniz, pela atenção, carinho, disponibilidade de ajuda, com certeza foi essencial para realização deste trabalho.

À Dra. Adriana Ferreira de Faria pela oportunidade de recomeço, me ensinar, me motivar a voltar a estudar e fazer o doutorado, pelas palavras de incentivo e pelo grande exemplo de competência e profissionalismo, serei eternamente grata

À Dra Cláudia Lúcia da Epamig pelo incentivo e pelas nossas conversas, sempre motivadora e pelo carinho sempre demonstrou comigo.

A toda equipe do Laboratório de Polpa e Papel (UFPR) em especial, Livia Viana, Danielle e Thalita, pela ajuda, carinho e dedicação no experimento.

A toda equipe do Laboratório de Embalagens (LABEM) pelo auxílio e pela convivência. A todos que já passaram e aos que permanecem, foi muito bom trabalhar com vocês e tenho muito que agradecer: Victor, Cícero, Allan, Germana, Taíla, Paula Moura, Johana, Michelle, Miriane, Mariana Lamas, Eber, Luciano, Pedro, Thiago Quintão, Gabriel, Carol, Ludmila, Nelson, Juliana, Adassa, Rosilene, Madê e Laís.

Ao técnico do labem Fernando pelo auxílio, sempre atencioso e dedicado na contribuição das pesquisas.

A toda equipe do Laboratório Celulose e papel pelo auxílio e pela convivência e verdadeiras amizades que ali surgiram. Em especial: Adriana, Thalita, Iara, Fernando, Marcela Coura, Alessandro, Larisse, Sandra, Juliana Silva, Carlinhos, Renato, Cláudio, Diego, Júlia, Dalila, Juliana Ramalho, Bianca, Ciro e D. Conceição. Tenho certeza sem ajuda de vocês seria impossível a realização deste trabalho. Minha eterna gratidão!

Ao pesquisador Dr. Fernando Gomes, pela constante paciência, ajuda, orientação e pelos conselhos durante o desenvolvimento deste trabalho.

A funcionária do núcleo de microscopia, Carla, pelo auxílio nas análises e dicas muito importantes. Obrigado mesmo!

Ao professor Dr. Sukarno Olavo Ferreira pela disponibilidade e atenção na realização das análises de AFM.

À minha família (irmão, tios, primos e sobrinhos) que contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho, para a minha formação pessoal e profissional, meus sinceros agradecimentos.

À Universidade Federal do Paraná (UFPR) e ao Departamento de Engenharia Florestal pela oportunidade de realizar uma parte do meu estudo.

À Universidade Federal de Viçosa (UFV) e ao Departamento de Tecnologia de Alimentos e pela oportunidade de realizar meus estudos e contribuir para o meu crescimento.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de doutorado.

Não cabem aqui todos os nomes que gostaria de agradecer por terem feito parte dessa importante fase da minha vida. Peço desculpas àqueles que não estão presentes nestas palavras, mas podem estar certos que fazem parte do meu pensamento e da minha gratidão.

Muito obrigada!

BIOGRAFIA

DANIELA LEOCÁDIO SILVA, filha de João Edson da Silva e Maria das Graças Leocádio Silva, nasceu em Viçosa, estado de Minas Gerais, em 30 de Outubro de 1979.

Em agosto de 2005, iniciou o Curso de Ciência e Tecnologia de Laticínios na Universidade Federal de Viçosa, graduando-se em julho de 2009.

Em agosto de 2009, iniciou o Mestrado no Programa de Pós- Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos na Universidade Federal de Viçosa, concluindo-o em outubro de 2012.

Em agosto de 2013 iniciou o Doutorado no Programa de Pós- Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos na Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se à defesa de tese em novembro de 2016.

Sumário

APRESENTAÇÃO	xiii
RESUMO	xiv
ABSTRACT	xvi
INTRODUÇÃO GERAL	1
CAPÍTULO 1	3
REVISÃO DA LITERATURA	3
1.1. Embalagens de alimentos	4
1.2. Polímeros Biodegradáveis	5
1.2.2 Pectina	6
1.2.3 Polímero Natural: Bagaço da cana-de-açúcar	9
1.3 Nanocelulose	11
1.3.1 Nanocristal de Celulose (CNC)	12
1.3.2 Celulose nanofibrilada (CNF)	16
1.4 Embalagem ativa	19
1.4.1 Embalagem Antimicrobiana	20
1.5 Nisina	22
2.Referências Bibliográficas	24
CAPÍTULO 2	34
Síntese e caracterização de nanocristais de celulose extraídos da fibra do bagaço de cana-de-açúcar (<i>Saccharum officinarum</i> L.)	34
Resumo	35
Abstract	36
1.Introdução	37
2.Material e Métodos	39
2.1. Matéria-prima	39
2.2 . Caracterização da fibra da polpa Kraft bagaço de cana-de-açúcar	39

2.2.1 . Composição química	39
2.3) Branqueamento pelo método TCF (Totally Chlorine Free)	40
2.4 Preparação dos nanocristais de celulose (CNCs).....	41
2.4.1 Tamanho médio do nanocristal de celulose e potencial zeta (ζ).....	41
2.4.2 Espectroscopia na região de infravermelho.....	41
2.3.4 Análise Termogravimétrica (TGA)	42
2.3.5 Difratometria de Raios-X (DR-X)	42
2.3.6 Microscopia de força atômica (MFA)	43
2.3.7 Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	43
2.3.8 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)	43
3. Resultados e discussão	44
3.2 Branqueamentos TCF (Totally Chlorine Free).....	46
3.3 Tamanho médio do nanocristal de celulose e potencial zeta (ζ)	46
3.4 Rendimento Dos Nanocristais de Celuloses(CNC).....	47
3.5 Espectroscopia na região de infravermelho	48
3.6 Análise Termogravimétrica (TGA)	49
3.7 Difratometria de Raios-X (DR-X).....	51
3.8 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	53
3.9 Microscopia de força atômica (MFA).....	54
3.10. Microscopia eletrônica de transmissão (MET)	55
4. Conclusão	57
5. Referências Bibliográficas.....	57
CAPÍTULO 3	61
Síntese e caracterização da celulose nanofibrilada (CNF) extraída do bagaço de cana- de açúcar (<i>Saccharum officinarum</i> L.)	61
RESUMO	62
ABSTRACT	63
1-INTRODUÇÃO	64

2. Materiais e Métodos	66
2.1. Matéria- prima	66
2.2. Preparação das nanofibriladas	67
2.3.1 Tamanho médio da nanofibrilada e potencial zeta (ζ)	69
2.3.2 Espectroscopia na região de infravermelho	70
2.3.4 Análise Termogravimétrica (TGA)	70
2.3.5 Difractometria de Raios-X (DR-X)	71
2.3.6 Microscopia de força atômica (MFA)	71
2.3.7 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	71
2.3.8 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)	72
3. Resultados e discussão	72
3.1 Branqueamentos TCF (Totally Chlorine Free)	72
3.2 Tamanho médio de celulose nanofibrilada e potencial zeta (ζ)	73
3.3 Espectroscopia na região de infravermelho	73
3.4 Análise Termogravimétrica (TGA)	75
3.5 Difractometria de Raios-X (DR-X)	76
3.6 Microscopia de força atômica (MFA)	78
3.7 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	81
3.8 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)	81
4. Conclusão	83
5. Referências Bibliográficas	83
CAPÍTULO 4	88
Desenvolvimento e aplicação dos nanocristais de celulose extraídos do bagaço da cana-de-açúcar (<i>Saccharum officinarum</i> L.) embalagem ativa biodegradável	88
RESUMO	89
ABSTRACT	91
1. Introdução	93
2. Material e Métodos	95

2.1. Avaliação da atividade antimicrobiana da Nisina Z	95
2.1.1 Micro-organismos.....	95
2.2 Delineamento Experimental.....	95
2.3. Produção do filme a base de pectina	96
2.3.1 Atividade antimicrobiana “in vitro” dos filmes	97
2.4.1 Espessura.....	97
2.4.2 Caracterização morfológica e topográfica dos filmes.....	98
A) Microscopia de força atômica.....	98
B) Propriedades mecânicas	98
C) Propriedades de barreira ao vapor de água.....	98
D) Termogravimétrica (TGA).....	99
E) Espectroscopia de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).	99
3. Resultados e Discussão	100
3.1 Avaliação da atividade antimicrobiana dos filmes adicionado com nisina z.	100
3.2 Espessura.....	103
3.3 Caracterização morfológica e topográfica dos filmes	105
A) Morfologia de força atômica	105
B) Propriedades Mecânicas	109
C) Estudo das propriedades de barreira a vapor de água.....	113
D) Análise termogravimétrica (TGA).....	116
E) Espectroscopia na região do Infravermelho – FTIR.....	119
4. Conclusão	121
5. Referências Bibliográficas.....	122
CAPÍTULO 5	127
Desenvolvimento e aplicação da celulose nanofibrilada extraída de bagaço da cana-de-açúcar (<i>Saccharum officinarum</i> L.) embalagem ativa biodegradável.	128
RESUMO	128

ABSTRACT	130
1.Introdução	132
2.Materiais e Métodos	134
2.1. Avaliação da atividade antimicrobiana da Nisina Z	134
2.2.1 Micro-organismos.....	134
2.3 Delineamento Experimental.....	134
2.4. Produção do filme a base de pectina	135
2.4.1 Atividade antimicrobiana “ <i>in vitro</i> ” dos filmes	136
2.5 Caracterizações dos filmes de pectina produzidos incorporados com celulose nanofibrilada e nisina z.....	136
2.5.1 Espessura.....	136
2.5.2 Caracterização morfológica e topográfica dos filmes.....	137
A)Microscopia de força atômica.....	137
B) Propriedades mecânicas	137
C) Taxa de permeabilidade a vapor d’água (TPVA).....	137
D) Termogravimétrica (TGA).....	138
E) Espectroscopia de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)	138
3.Resultados e Discussão	139
3.1.Atividade antimicrobiana “ <i>in vitro</i> ” dos filmes.....	139
3.2.Espessura.....	142
3.3 Caracterização morfológica e topográfica dos filmes.....	143
B) Propriedades Mecânicas	149
C) Espectroscopia na região do Infravermelho – FTIR.....	152
D) Análise Termogravimétrica.....	154
E) Taxa de permeabilidade ao vapor d’água.....	158
4. Conclusão	160
5.Referências Bibliográficas	160

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	167
CONSIDERAÇÕES FINAIS.	168

APRESENTAÇÃO

O trabalho encontra-se dividido em cinco capítulos, sendo eles:

✓ **Capítulo 1: Revisão de literatura para os tópicos envolvidos:**

Embalagens para alimentos; polímeros biodegradáveis; pectina; polímero natural: bagaço de cana-de-açúcar; nanocelulose; nanocristal de celulose; celulose nanofibrilada; embalagem ativa; embalagem antimicrobiana; nisina.

✓ **Capítulo 2 : Síntese e caracterização de nanocristais de celulose (CNC) extraídos da fibra do bagaço de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.).**

✓ **Capítulo 3: Síntese e caracterização da celulose nanofibrilada (CNF) extraída da fibra do bagaço de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.).**

✓ **Capítulo 4: Desenvolvimento e aplicação dos nanocristais de celulose extraídos do bagaço da cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) embalagem ativa biodegradável.**

✓ **Capítulo 5: Desenvolvimento e aplicação da celulose nanofibrilada extraída de bagaço da cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) embalagem ativa biodegradável.**

RESUMO

SILVA, Daniela Leocádio, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, novembro de 2016. **Influência da adição de nanocristais e nanofibrilas de celulose extraídas de bagaço de cana-de-açúcar nas propriedades de embalagens biodegradáveis ativas à base de pectina.** Orientadora: Nilda de Fátima Ferreira Soares. Coorientadores: Jorge Luiz Colodette e Eber Antonio Alves Medeiros

Os polímeros biodegradáveis constituem um campo de pesquisa emergente na área de embalagens, as maiores barreiras para a aceitação destes materiais como substitutos para os tradicionais polímeros não biodegradáveis estão no desempenho mecânico limitado e alto custo. Diante disso, as nanoceluloses têm sido estudadas como biopolímeros de alta tecnologia para aplicação em nanoreforço em diversos materiais. A primeira etapa deste trabalho foi sintetizar e caracterizar os nanocristais de celulose CNC extraídos a partir do bagaço de cana-de-açúcar. Após a síntese com a hidrólise ácida, o rendimento foi estimado em 40 %, o tamanho variou de 6 a 20 nm de diâmetros e comprimento médio dos cristais variam de 150-300 nm. A avaliação da medida de potencial elétrico superficial mostrou valor médio -19,4 mV, apresentou morfologia de bastonete, temperatura inicial de degradação dos nanocristais de celulose foi de 268 °C, o índice cristalinidade foi de 71 % do CNC. A segunda etapa foi sintetizar celulose nanofibrilada CNF extraída do bagaço de cana-de-açúcar processo mecânico de desfibrilação no moinho *Super Masscolloider Masuko Sangyo*. A celulose nanofibrilada foi caracterizada tendo um rendimento estimado de 90 %, possui seu comprimento alongado 350 nanométrico e seu diâmetro na escala 11 a 16 nanométrico. A avaliação da medida de potencial elétrico superficial mostrou valor médio -26,2 mV. A análise de difração de raios X e análise térmica revelaram que NCFs possui cristalinidade 64,3 % e a temperatura inicial de degradação celulose nanofibriladas foi 240 °C, provavelmente devido à estrutura amorfo. A próxima etapa foi desenvolver uma embalagem ativa biodegradável com pectina (PEC) e adicionar o antimicrobiano nisina z e nanocristais de celulose com nanoreforço. Os resultados obtidos mostraram que os filmes de pectina (PEC) com nisina z (NIS) inibiram o crescimento das bactérias avaliadas a *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. A temperatura inicial de degradação dos filmes variou (260 °C a 290 °C). O

alongamento na ruptura não obteve diferença significativa ao nível de ($P>0,05$) na interação. O alongamento na ruptura reduziu com adição das concentrações máximas de NIS e CNC e, conseqüentemente, houve aumentos do módulo de elasticidade, tornando os filmes mais rígidos e mais fortes. A resistência à máxima tração do filme foi afetado pelos níveis de CNC (8,55 % e 10 %) estudados, no entanto, quanto maior concentração de nisina (8,55 %) e CNC maior foi a resistência a máxima dos filmes. A taxa de permeabilidade do vapor de água foi influenciada por uma maior concentração de nanocristais de celulose (10 %) nos filmes de pectina ocorreu um aumento significativo da taxa de permeabilidade ao vapor d'água (TPVA), mostrando que os nanocristais de celulose em alta concentração não funcionaram como uma barreira para impedir a passagem de gases. A última etapa foi desenvolver uma embalagem ativa biodegradável à base de pectina com nisina e celulose nanofibrilada (CNF). No teste de difusão em agar para todos os tratamentos testados ocorreu diferença significativa ao nível ($P>0,05$), observou-se atividade antimicrobiana *in vitro* da nisina (NIS) para os micro-organismos *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. As propriedades mecânicas dos filmes mostraram que a resistência máxima foram afetada pela adição de celulose nanofibrilada (CNF) nos níveis estudados e obteve diferença significativa ao nível ($P>0,05$). O alongamento na ruptura obteve diferença significativa ao nível ($P>0,05$) e também foi afetado pela presença de CNF e NIS. O módulo de elasticidade não obteve diferença significativa ao nível ($P>0,05$) em concentrações máximas de NIS e CNF. As análises termogravimétricas dos filmes apresentaram uma temperatura de degradação variando de 241 °C a 349 °C entre os tratamentos. A taxa de permeabilidade do vapor de água (TPVA) reduziu com a concentração máxima de 10 % de CNF nos filmes de pectina. A CNF funcionou com uma barreira física formada com a dispersão nanofibrilas na matriz polimérica dificultando a passagem de vapor de água. Essa propriedade é essencial para embalagens para alimentos.

ABSTRACT

SILVA, Daniela Leocádio, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, November, 2016. **Influence of the addition of nanocrystals and cellulose nanofibrils extracted from sugarcane bagasse on the properties of active biodegradable packages based on pectin.** Advisor: Nilda de Fátima Ferreira Soares. Co-advisors: Jorge Luiz Colodette and Eber Antonio Alves Medeiros

Biodegradable polymers constitute an emergent research field in the area of packages. The biggest barriers for the approval of these materials as substitute for the traditional non-degradable polymers lay on the limited mechanical performance and the high cost. Thereof, the nanocellulose has been studied as high tech biopolymers for the application in nanoreinforcement in several materials. The first stage of this work was to synthesize and characterize the cellulose nanocrystals (CNC) extracted from the sugar cane bagasse. After the synthesis with acid hydrolysis, the yield was estimated in 40 %, the size varied from 6 to 20 nm diameter and the crystals average length varied from 150 to 300 nm. The superficial electric potential measure assessment showed an average value -19,4 mV, presented rods morphology, initial temperature of cellulose nanocrystal degradation was of 268 °C, the crystallinity index was 71 % from the CNC. The second stage was to synthesize nanofibrillated cellulose CNF extracted from the sugar cane bagasse, mechanical process of defibrillation in the mill *Super Masscolloider Masuko Sangyo*. The nanofibrillated cellulose was characterized with a yield estimated at 90 %, and it has its length elongated 350 nanometric and its diameter in the scale of 11 to 16 nanometric. The superficial electric potential measure assessment showed an average value -26,2 mV. The X-Ray diffraction analysis and the thermal analysis revealed that CNFs have crystallinity 64.3 % and the nanofibrillated cellulose degradation initial temperature was of 240 °C, probably due to the amorphous structure. The next stage was to develop a biodegradable active package with pectin (PEC) and to add the nisin Z antimicrobial as well as the cellulose nanocrystals with nanoreinforcement. The results that were obtained showed that the pectin films (PEC) with nisin Z (NIS) inhibited the growth of the evaluated bacteria *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. The films degradation initial temperature varied from 260 °C to 290 °C. The elongation in the rupture did not obtain significant

difference at the level of $P>0.05$ in the interaction, but it was affected when the presence of CNC and NIS were evaluated separately. That elongation reduced with the addition of the maximum concentration of NIS and CNC and, consequently, there were increase of the elasticity modules, making the films stronger and more rigid. The maximum resistance of the film was affected by the studied levels of CNC (8.55 % and 10 %); however, the bigger the concentration of nisine (8.55 %) and CNC the bigger the maximum resistance of the films. The water vapor permeability rate was influenced by a larger concentration of cellulose nanocrystals (10 %); in the pectin films, a significant increase in the water vapor permeability rate (TPVA) took place, showing that the cellulose nanocrystals in high concentration did not function as a barrier to impede the gas passage. The last stage was to develop a biodegradable active package pectin-based with nisin Z and nanofibrillated cellulose (CNF). In the diffusion test in agar for all the tested treatments, a significant difference at the level $P>0.05$ took place and an antimicrobial activity *in vitro* of the nisin Z was observed for the microorganisms *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. The films mechanical properties showed that the maximum resistance was affected by the addition of nanofibrillated cellulose (CNF) in the studied levels and it obtained a significant difference at the level ($P>0.05$). The bigger the concentration of NIS and CNF the bigger was the films maximum resistance. The elongation in the rupture obtained significant different at level ($P>0.05$) and was also affected by the presence of CNF and NIS. The elasticity module did not obtain significant difference at level $P>0.05$ in maximum concentration of NIS and CNF. The films thermogravimetric analyses presented a degradation temperature varying from 241 °C to 349 °C among the treatments. The water vapor permeability rate (TPVA) reduced with the maximum concentration of 10 % of CNF in the pectin films. The CNF worked as a physical barrier formed with the dispersion of the nanofibrillated in the polymeric matrix making the passage of water vapor difficult. This property is essential in food packages.

INTRODUÇÃO GERAL

Nos últimos anos tem ocorrido o aumento da população e da economia mundial. Consequentemente, há uma tendência do crescimento natural da produção de resíduos sólidos não biodegradáveis, devido ao aumento do consumo de alimentos e a utilização de polímeros sintéticos. Estes resíduos são aqueles que não degradam rapidamente, em grande parte compostos de plásticos derivados do petróleo.

As embalagens de origem sintéticas ou não naturais estão entre os vários resíduos sólidos urbanos descartados no meio ambiente que levam maior tempo para se decomporem. As embalagens plásticas são utilizadas em larga escala para embalar alimentos por estarem disponíveis em grandes quantidades, a baixo custo e com boas características mecânicas e de barreira. Entretanto, a poluição do meio ambiente devido ao descarte de filmes plásticos constituídos de polímeros sintéticos sem nenhum controle é um grande problema mundial, tendo como desvantagem o fato de não serem biodegradáveis, e estarem envolvidos em problemas de gerenciamento de resíduos

Devido às características dos plásticos sintéticos demorarem muito tempo para se degradar no meio ambiente, tem se tornado cada vez mais necessária a busca de novas tecnologias emergentes. Uma nova opção que surge é a produção de polímeros biodegradáveis de origem animal, microbiana e vegetal. O polímero de origem vegetal como a pectina cítrica de baixa metoxilação é muito utilizada na área de alimentos com espessantes e gelificantes, outra alternativa para seu uso é constituição de filmes quando solubilizado água devido a sua capacidade filmogênica

As embalagens ambientalmente degradáveis, obtidas a partir de fontes renováveis, como os polímeros de origem vegetal, constituem opção adicional ao gerenciamento de resíduos, além disso, a degradabilidade destes materiais que, após seu uso, permite sua permanência no ciclo natural do carbono. Só que grande desafio para quem vai trabalhar com embalagem biodegradável é o alto custo e não possui boas propriedades mecânicas.

As fibras naturais extraídas de diversas fontes como o bagaço de cana-de-açúcar têm mostrado resultados promissores de utilização como nanoreforços em embalagens na escala micrométrica e nanométrica.

Nas últimas décadas vem crescendo os estudos das nanoceluloses como reforço em compósitos e nanocompósitos em diversas áreas. As nanoceluloses podem ser isoladas a partir de diferentes fontes de fibras celulósicas de fonte vegetal e como isso vêm conquistando espaço nos meios industriais e na área de embalagens, principalmente por suas características ópticas e de resistência mecânica. Quando aplicadas na produção de materiais nanoestruturados, elas não somente alteram o comportamento físico-mecânico exibido pelos materiais, mas também afetam suas propriedades ópticas. Além disso, as nanoceluloses são materiais biodegradáveis.

Sendo o Brasil é um país caracterizado pela economia agroindustrial e um dos maiores produtores mundiais de cana-de-açúcar. Assim, surge grande expectativa na busca por adaptar as fibras vegetais como o resíduo do bagaço da cana-de-açúcar no uso como nanoreforço em matrizes poliméricas, biopolímeros ou blendas poliméricas.

Nesse contexto, objetivou-se com o presente trabalho desenvolver uma embalagem ativa biodegradável a base de pectina incorporado com antimicrobianos e nanoceluloses extraídos do bagaço da cana-de-açúcar. Os objetivos específicos deste estudo foram (i) síntese e caracterização de nanocristais de celulose extraídos do bagaço da cana-de-açúcar, (ii) síntese e caracterização de celulose nanofibrilada extraídos do bagaço da cana-de-açúcar, (iii) caracterizar a embalagem ativa biodegradável com nanocristal de celulose e celulose nanofibrilada quanto às propriedades mecânicas e estruturais e (iv) avaliar a influência da nisina Z no filme com nanocelulose para inibição dos micro-organismos *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* “in vitro”.

CAPÍTULO 1
REVISÃO DA LITERATURA

1.1. Embalagens de alimentos

As embalagens desempenham um papel muito importante na conservação dos alimentos. De acordo com a Resolução RDC nº 91, de 11 de maio de 2001, embalagem para alimentos é o artigo que está em contato direto com alimentos, destinado a contê-los, desde a sua fabricação até a sua entrega ao consumidor, com a finalidade de protegê-los de agentes externos, de alterações e de contaminações, assim como adulterações (BRASIL, 2001). Além de proteger o alimento de poeira, oxigênio, luz, micro-organismos patogênicos, substâncias químicas e físicas, a embalagem deve ser inerte, leve, fácil de eliminar ou reutilizar, resistir ao processamento, atuar como barreira a gases e vapor de água, ser resistente, conservar as características do alimento e apresentar informações ao consumidor (DUNCAN, 2011; YOUSSEF *et al.*, 2015).

A fim de exercer essas funções, as embalagens proporcionam proteção física e cria condições físico-químicas adequadas para os produtos que são essenciais para estender a vida de prateleira e manter a qualidade e segurança dos alimentos (DUNCAN, 2011; GOMES, 2015).

Os materiais plásticos à base de petróleo são os mais utilizados na produção de embalagens de alimentos por serem baratos, possuírem boa propriedade de processamento, maior flexibilidade, diversidade de materiais, formatos, estruturas e barreira (FABRIS *et al.*, 2006; RHIM *et al.*, 2013). Mais de 40 % dos materiais plásticos são utilizados para embalagens e quase 20 % deles são usados para embalagens de alimentos, resultando em sérios problemas ambientais devido à geração de resíduos sólidos não degradáveis no ambiente (SOTHORNVIT e PITAK, 2007; RHIM *et al.*, 2013). Diversas alternativas têm sido pesquisadas para minimizar o impacto ambiental dos polímeros convencionais, uma delas é a utilização de biopolímeros, que são biodegradáveis (pectina), renováveis e de baixo custo (UGALDE, 2014; OJIJO e RAY, 2013).

Entretanto, as embalagens tradicionais necessitam de melhorias para estender a vida de prateleira dos produtos alimentícios e atender às exigências dos consumidores que buscam por produtos seguros, saudáveis, mais naturais e com menos conservantes sintéticos, além de fornecer embalagens modernas, práticas,

que preservem os alimentos e que ao mesmo tempo sejam ecologicamente corretas (SOARES *et al.*, 2009; RHIM *et al.*, 2013).

1.2. Polímeros Biodegradáveis.

Atualmente, um dos produtos mais importantes da indústria são os polímeros devido a suas diversas aplicações na área de embalagens para alimentos. A poluição causada pelo descarte de plásticos produzidos a partir de polímeros sintéticos no meio ambiente é preocupante. Pois, o tempo necessário para biodegradação de um polímero como por exemplo o polietileno está estimado em 200 anos (BRANDELERO *et al.*, 2013).

Os padrões de consumo atuais fazem com que esses produtos sejam cada vez mais não reutilizáveis sendo depois descartados, causando acúmulo nos aterros sanitários (REIS *et al.*, 2011). Além disso, por serem produzidos a partir de fontes petroquímicas não são biodegradáveis, acabam por ficar no meio ambiente por centenas de anos. Contudo, os esforços feitos para reciclar e incinerar estes materiais possuem empecilhos econômicos e ecológicos.

A demanda por materiais plásticos produzidos a partir de fontes renováveis tem apresentado um crescimento contínuo tanto em função de interesses econômicos quanto por razões ambientais. Apesar de ainda apresentar custos de produção superiores aos polímeros convencionais, estes materiais designados como biodegradáveis, têm sido objeto de extensas pesquisas e avaliações (MARTELLI *et al.*, 2014).

Uma alternativa ambientalmente correta é a utilização de polímeros biodegradáveis, que oferecem oportunidades para a redução dos resíduos sólidos urbanos com reciclagem biológica no ecossistema e substituição dos convencionais plásticos sintéticos não degradáveis (DOMB *et al.*, 2011; PELISSARI *et al.*, 2013). Desta forma, espera-se que estes materiais tenham fácil degradação e menor toxicidade.

Estes polímeros biodegradáveis constituem um campo de pesquisa emergente e foram desenvolvidos inicialmente para serem utilizados na indústria de embalagens, no setor agrícola e de liberação de fármacos. Tais aplicações não requerem alta resistência mecânica (PANYAM, LABHASETWAR, 2012), as maiores

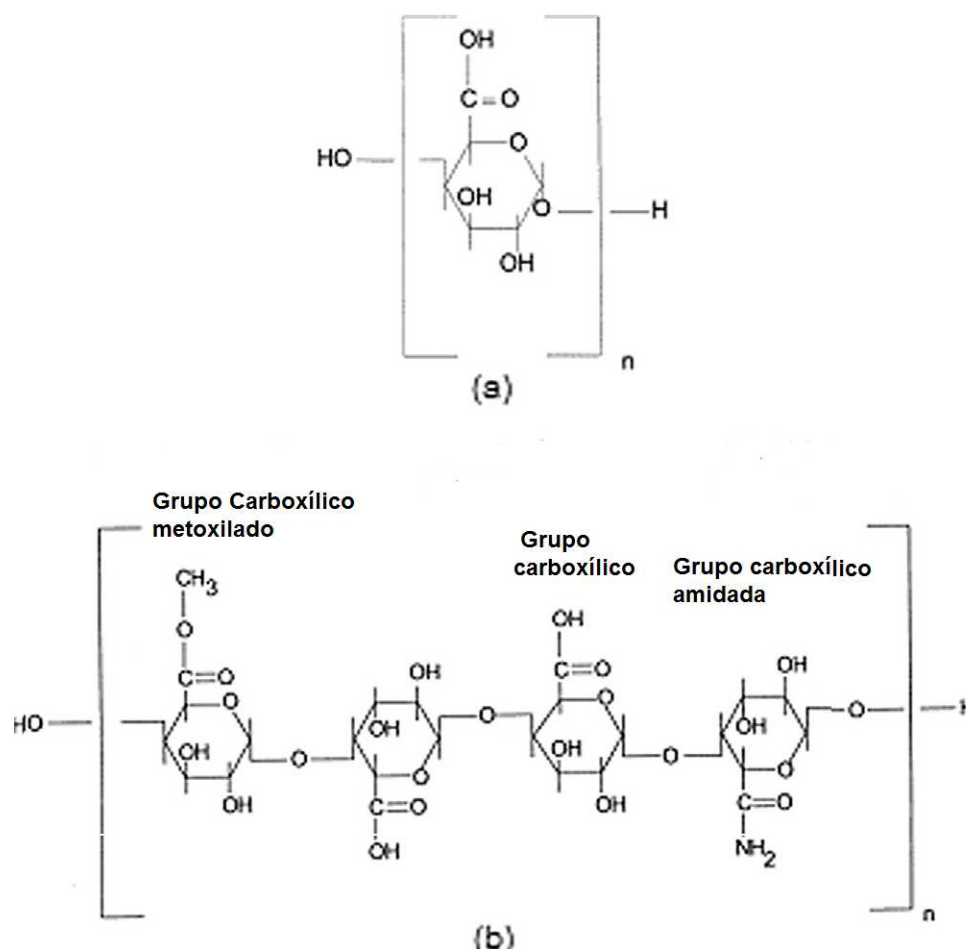
barreiras para a aceitação destes materiais como substitutos para os tradicionais polímeros não biodegradáveis estão no desempenho mecânico limitado e no seu alto custo, o qual é ocasionado, principalmente, pelo baixo volume de produção e não propriamente pelo custo do material bruto.

1.2.2 Pectina

A pectina é um polissacarídeo presente na parede celular dos vegetais, sendo constituída por unidades de ácidos D-galacturônicos (SILVA *et al.*, 2015). É amplamente empregada pelas indústrias alimentícias e apresenta diversas atividades como espessantes e gelificantes, (PEREIRA *et al.*, 2014). A pectina é um polímero biodegradável formado basicamente de unidades α -1,4-D ácido galacturônico, sendo uma importante família de carboidratos de fonte renovável. Este carboidrato complexo têm inspirado estudos recentes de novas tecnologias por sua não-toxicidade (BARBOZA *et al.*, 2014).

Diferentes materiais estruturais têm sido utilizados na elaboração de filmes tais como proteínas, lípideos e polissacarídeos. Os polissacarídeos incluem celulose, quitosana, amido e pectina. A pectina é um dos principais componentes da parede celular vegetal, contribuindo para a integridade do tecido e rigidez, e é considerada uma das macromoléculas mais complexos na natureza (JOLIE, DUVETTER, VAN LOEY e HENDRICKX, 2010).

Segundo Espitia *et al.* (2014) as principais fontes industriais e extração de pectina são de polpa de maçã e cascas de frutas cítricas. A estrutura molecular da pectina é composta predominantemente por cadeias helicoidais de poli- α -1-4 ácidos galacturônico como grupos ácido ocorrendo parcialmente como ésteres metílicos, com vários graus de metilação de resíduos de ácidos carboxílicos e, ou ácidos poligalacturônico amidada (Figura 1) (MISHRA *et al.*, 2012).

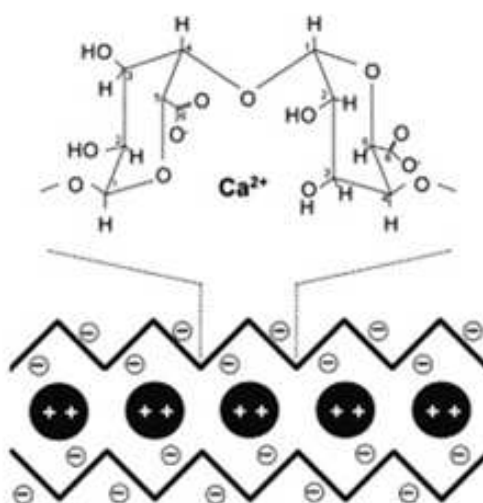


Fonte. Mishra et al. (2012).

Figura 1. Estrutura química do ácido poligalacturónico (a),b) estrutura química da pectina mostrando seus grupamentos

Grupos carboxílicos metoxilados são obtidos por grau de esterificação (GE) com metanol. De acordo, com o grau de esterificação (GE) é a proporcional aos grupos de ácido galacturónico esterificado (FARRIS *et al.*, 2009 e SILA *et al.*, 2009), a pectina pode ser classificada como elevado grau metoxilação (HMP) ou baixa grau de metoxilação pectina (LMP). O HMP tem mais de 50 % dos seus grupos carboxílicos esterificados (GE>50), enquanto LMP tem uma GE < 50. Sua GE afeta propriedades das pectinas durante a gelificação. Deste modo, para formar o gel LMP em presença de íons divalentes é necessário que atue como uma ponte entre os pares de grupos carboxila das cadeias diferentes da pectina. Segundo Mishara *et al.* (2012) para o HMP para formar gel em meio ácido é necessário a adição de diversos açúcares, tais como sacarose ou glicose .

Diferentes interações intermoleculares estão envolvidas na gelificação das pectinas. A gelificação de LMP envolve interações eletrostáticas entre os cátions e as cavidades carregadas negativamente formados por cadeias poliméricas, no qual os cátions são adicionados durante o processo de gelificação. Isto é conhecido como o modelo de "Egg Box" ou `caixa de ovo (Figura 2), este processo é semelhante ao de gelificação de alginato. Além disso, o modelo "Egg Box" formado entre duas cadeias paralelas são estabilizados por força de Van der Waals e ligações de hidrogênio, além de interações eletrostáticas (FRAEYE *et al.*,2010).



Fonte: FRAEYE *et al.* (2010).

Figura 2. Representação do modelo de "Egg Box". Cadeias de ácido galacturônico estão representados por linhas pretas, os íons de cálcio e os grupos carboxílicos por círculos.

A pectina é um ingrediente muito utilizado na indústria de alimentos e é geralmente reconhecido como seguro (GRAS) pelo FDA (FDA, 2013) e tem sido utilizado como aditivo em alimentos, principalmente como gelificante, estabilizante ou agente espessante em produtos como compotas, iogurtes, bebidas lácteas, doces frutas e sorvete (LAURENT e BOULENGUER, 2003). A produção de filmes a base de pectina pode ser realizados por diferentes métodos como "casting", extrusão. Outro componente importante na elaboração do filme à base de pectina é o plastificante. O plastificante é geralmente uma pequena molécula de baixa volatilidade que, quando adicionado ao material polimérico, modifica a sua organização tridimensional, diminui as forças intermoleculares, e aumenta o volume livre e mobilidade da cadeia.

Estas alterações na organização das cadeias poliméricas pode ser causadas pela a adição do plastificante e com isso favorece o aumento da extensibilidade e flexibilidade do filme desenvolvido, e também reduzindo a coesão e a rigidez do filme (KOKOSZKA, *et al.*, 2010). Os plastificantes que podem ser utilizados para o desenvolvimento de embalagens para alimentos, incluem o glicerol e o sorbitol, o glicerol com plastificante ser o mais popular utilizado nas técnicas de produção de filmes, devido à estabilidade e compatibilidade com a cadeia de embalagem biopolimérico hidrofílico (CHILLO *et al.*, 2008).

As matrizes dos biopolímeros tem sido amplamente exploradas no desenvolvimentos de embalagens biodegradáveis para alimentos. A pectina é um biopolímero que quando adicionados em polpas de frutas e conservantes tem grande potencial para a produção de embalagens ativas antimicrobianas comestíveis, as quais liberam gradativamente o conservantes para os alimentos (OTONI *et al.*, 2014).

Vários estudos têm demonstrado a utilização da pectina como matriz polimérica para embalagens ativas e comestíveis. Moura *et al.* (2014) desenvolveram uma embalagem comestível de pectina contendo polpa de fruta de cacau. Já Otoni *et al.* (2014) desenvolveram filmes biodegradáveis de pectina com polpa de mamão, incorporados com antimicrobiano em nanoemulsões de cinamaldeído para controle do crescimento de micro-organismos.

1.2.3 Polímero Natural: Bagaço da cana-de-açúcar

O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar. Na safra estimada para 2016/2017, 684,774 milhões de toneladas de cana-de-açúcar serão processadas pelas usinas brasileiras (CONAB, 2016). Estima-se que uma tonelada de cana-de-açúcar gere 280 kg de bagaço. Deste total, estima-se que 1/3 seja correspondente à geração de bagaço, que é uma potencial fonte para a produção de etanol. O bagaço é um subproduto abundante e contém teores elevados de carboidratos, sendo composto por 40-45 % de celulose e 30-35 % de hemicelulose. O restante é composto principalmente por lignina, além de menores quantidades de minerais, ceras e outros componentes.

Estima-se que até 2020 cerca de 90 novas unidades de indústrias sucroenergéticas devem ser implantadas em diferentes regiões do país para suprir a expectativa de crescimento do setor (UNICA, 2012). Sendo assim, a cana-de-açúcar ganha mundialmente espaço nas mais diversas áreas, de formas inovadoras e para variados fins. Aliado ao desenvolvimento científico e tecnológico está a preocupação com o impacto ambiental, a globalização da produção e do mercado que exige produção em larga escala em todos os setores da indústria, gerando grande diversidade de resíduos que devem receber destinação adequada (SUN *et al.*, 2004).

O bagaço resultante da moagem da matéria prima é considerado, atualmente, o maior resíduo da agricultura brasileira (CONAB, 2014). A principal finalidade desse bagaço é para a cogeração de energia, que é pouco utilizada no Brasil, tendo em vista que em 2011 apenas 30 % das usinas estavam ligadas a rede elétrica como geradoras de energia (UNICA, 2012). O restante do resíduo é utilizado para os mais diversos fins como na produção de ração animal, bioplásticos, papel, cimento, cosméticos e adsorventes.

Em decorrência da crescente atividade sucroalcooleira no Brasil, vários subprodutos do processo industrial, como levedura, vinhaça, torta de filtro e bagaço têm sido produzidos em quantidades expressivas. O bagaço, subproduto obtido em maior quantidade, é queimado para geração de energia elétrica dentro das próprias usinas ou usado para produzir ração animal, álcool de segunda geração, papel, telhas e chapas de partículas aglomeradas, o que evidencia diversas possibilidades de aplicação e significativo interesse de pesquisadores no aproveitamento desse matéria (COSTA e BOCCHI, 2012).

O bagaço de cana-de-açúcar já é utilizado na área de embalagem como matéria-prima na produção de papelão ecológico o qual apresenta significativa eficiência em reter calor (SOUZA *et al.*, 2013). Essa característica do papelão de bagaço de cana, se combinada com a propriedade térmica-isolante da placa de embalagem cartonada, pode resultar em protótipo de placa de isolamento residencial, que por ser produzida com matérias-primas de baixo custo, sendo acessível a comunidades de baixa renda.

No que se refere a estudos científicos, uma das descobertas mais recentes nessa área é o polímero polihidroxibutirato (PHB), que pode ser sintetizado a partir

do bagaço da cana-de-açúcar (TELLES *et al.*, 2011). Este polímero é obtido por meio da ação de bactérias que se alimentam do bagaço e formam dentro de si o polímero. O PHB pode ser usado na fabricação de vasos, colheres e sacolas plásticas, entre outros objetos (TELLES *et al.*, 2011).

Com o desenvolvimento da nanotecnologia muitas pesquisas estão sendo realizadas com nanocompósitos para reforço em polímeros biodegradáveis, um destes materiais é a fibra vegetal, como a do bagaço de cana-de-açúcar, têm gerado grandes perspectivas para substituir as fibras sintéticas em materiais compósitos, principalmente em países que tem vocação agrícola, como é o caso do Brasil (COSTA e BOCCHI, 2012). Estes nanocompósitos de origem vegetal têm chamado a atenção dos pesquisadores devido às vantagens que oferecem quando utilizadas como reforço em relação às fibras inorgânicas, pois contribuem para a biodegradação e a renovação do ciclo ecológico, por possuírem baixa densidade e, possibilitarem a redução de custos na fabricação de compósitos, pois são subprodutos agrícolas amplamente disponíveis, visto que são fontes renováveis, não-abrasivas e moldáveis.

1.3 Nanocelulose

A indústria mundial tem passado por inúmeras mudanças em busca de matérias primas, processos e produtos mais sustentáveis. A utilização de materiais biodegradáveis e/ou com potencial de reuso na cadeia produtiva tem ganhado espaço e, lentamente, se tornando realidade para muitas indústrias de transformação e conversão (SILVA, 2015). Nesse contexto surgem as biorrefinarias, que visam integrar processos e equipamentos para geração de bioprodutos de maneira sustentável. Dentre esses produtos destacam-se as chamadas nanoceluloses, que podem ser produzidas de qualquer fonte de biomassa lignocelulósica (DAMASIO, 2015).

Entende-se como nanocelulose a parte dos materiais lignocelulósicos que compreende a celulose cristalina e a celulose amorfa, com pelo menos uma dimensão na escala nanométrica – *i.e.* menor ou igual a 100 nm (SILVA, 2015). Em virtude disso, diversos são os nomes que a literatura fornece para os diferentes

tipos de nanoceluloses, dependendo da sua razão de aspecto e da composição cristalina e amorfa.

Inúmeros processos podem ser usados para extração de nanoceluloses. Dependendo do processo utilizado, têm-se diferentes tipos de nanoceluloses. Segundo Khalil et al. (2014) as nanoceluloses podem ser classificadas em três subcategorias: de acordo com suas dimensões, suas funções e os métodos de extração empregados em sua síntese. Esses métodos, por sua vez, dependem não só da fonte do material celulósico, mas também das condições de processamento empregadas na obtenção desses nanomateriais. Klemm *et al.* (2011) e Khalil *et al.* (2014) dividem as nanoceluloses em três classes: (1) nanocristais de celulose (CNC), (2) celulose nanofibrilada(CNF) e (3) nanocelulose bacteriana (CBN). A CBN é sintetizada pela família de bactérias conhecida como *Gluconoacetobacter xylinus* (KLEMM *et al.*, 2011). A CBN não será discutida nesta tese, pois a atenção concentrada aqui foi nas nanoceluloses produzidas a partir de biomassa ou de culturas agrícolas/florestais.

As nanoceluloses vêm conquistando espaço nos meios industriais, principalmente por suas características ópticas e de resistência mecânica. Quando aplicadas na produção de materiais nanoestruturados, elas não somente alteram o comportamento físico-mecânico exibido pelos materiais, mas também afetam suas propriedades ópticas. Além disso, as nanoceluloses são materiais biodegradáveis.

1.3.1 Nanocristal de Celulose (CNC)

O nanocristal de celulose (CNC), também chamada na literatura de nanocristais de celulose, cristalitos, *whiskers* e *nanorods*, apresenta-se geralmente na forma de cristais com diâmetro de 5 nm a 70 nm. Seu comprimento varia de 100 nm a 250 nm quando a origem são plantas lignocelulósicas, e de 100 nm a vários micrômetros quando as fontes são bactérias, algas e animais marinhos (LAVORATTI,2015). As propriedades do CNC dependem do material de origem. Nanocristais de celulose oriundos da madeira, algodão e da celulose microcristalina comercial (Avicel ®) possuem alta cristalinidade (90 %) e tamanho relativamente uniforme, com diâmetro entre 5-10 nm e comprimento até 300 nm. Já os nanocristais obtidos de bactérias, algas e tunicados são mais polidispersos, com

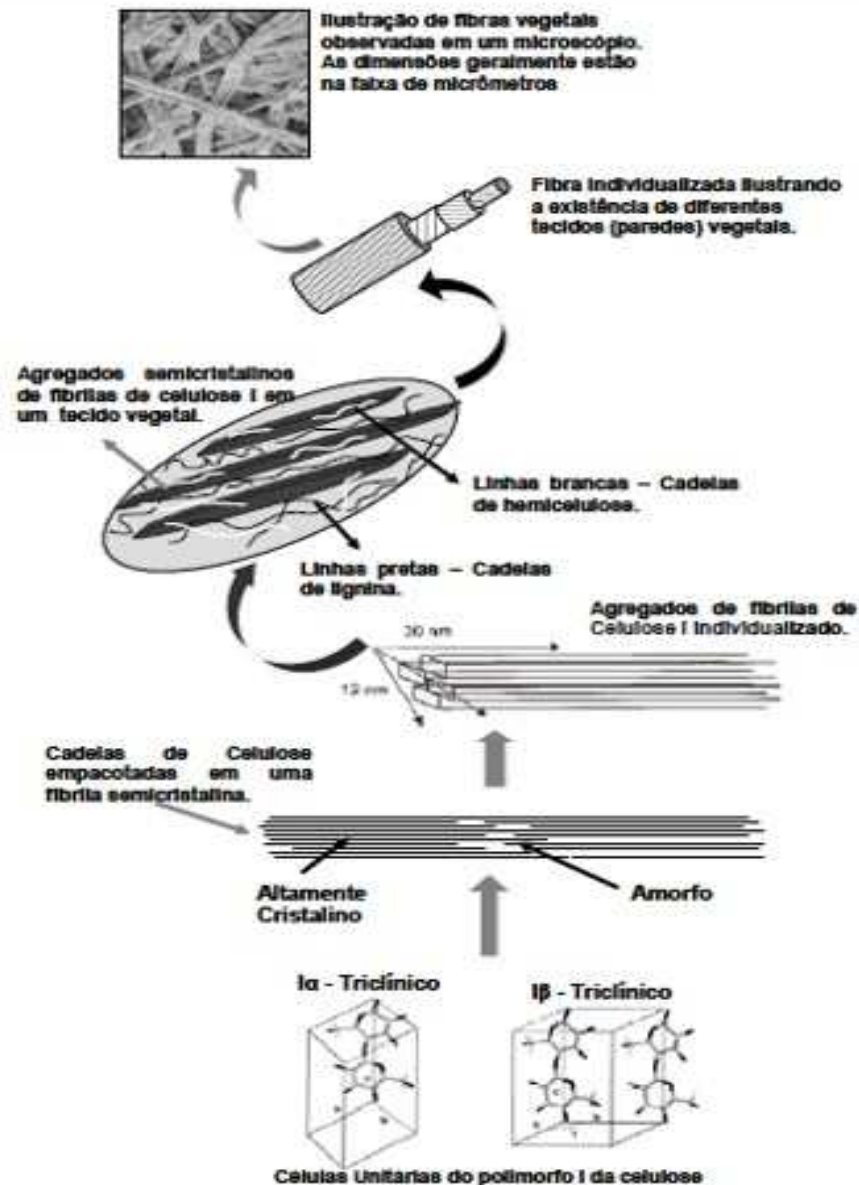
diâmetro de 5 60 nm e comprimento que varia desde 100 nm até vários micrômetros (KLEMM *et al.*, 2011).

Atualmente, diversos estudos têm sido desenvolvidos para a produção de novos materiais provenientes de fontes renováveis. Os nanocristais (*nanowhiskers*) de celulose são estruturas de celulose altamente cristalinas, com grande número de grupos hidroxila e podem ser compatíveis com a pectina (BARBOZA *et al.*, 2014).

Inseridos neste contexto, os últimos 15 anos têm sido cenário de estudos importantes sobre o uso da celulose como agente de reforço para matrizes poliméricas (EICHHORN *et al.*, 2010). Isto se deve a ocorrência de fragmentos nanométricos de celulose, referidos como fibrilas, de elevada resistência mecânica, na construção hierárquica das fibras vegetais (BIAO *et al.*, 2011; CARRASCO *et al.*, 2011).

A localização e construção desses fragmentos na estrutura de uma fibra são ilustradas no esquema da Figura 3. As fibrilas são formadas pelo empacotamento de um conjunto de cadeias celulósicas, o qual se baseia no arranjo cristalino do seu polimorfo natural, denominado como celulose I. Este polimorfo apresenta célula unitária monoclinica (I) e triclinica (I) cuja proporção na fibrila depende unicamente da matéria-prima de origem (EICHHORN *et al.*, 2010). Por conseguinte, as fibrilas se agregam para formar estruturas maiores, denominadas de agregados fibrilares. Estes agregados por sua vez atuam como agentes de reforço naturais na matriz amorfa constituída de lignina e hemicelulose, sustentando, por fim, os diferentes tecidos das fibras vegetais (SILVA *et al.*, 2009).

O elevado grau de empacotamento das cadeias de celulose, devido as ligações de hidrogênio inter e intramoleculares, tornam difícil a desestruturação dos agregados fibrilares e isolamento das fibrilas por simples métodos de desmontagem. Todavia, os defeitos de desordem (regiões amorfas) existentes nestes fragmentos têm sido utilizados como pontos de quebra em processos mecânicos e químicos específicos permitindo, dessa forma, a obtenção das nanoestruturas celulósicas (EICHHORN *et al.*, 2010; OKAHISA *et al.*, 2011).



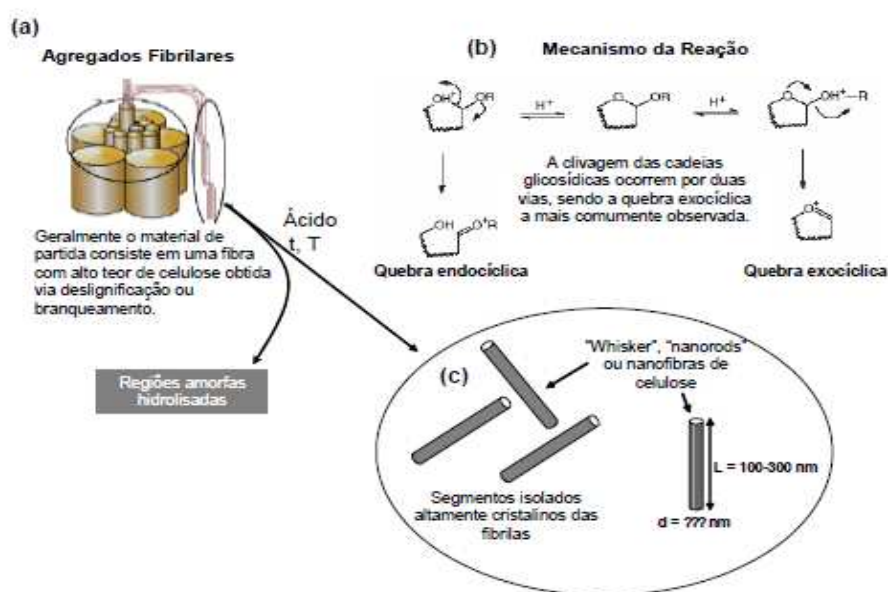
Fonte: FRAEYE et al. (2010).

Figura 3. Esquema ilustrativo da ocorrência das fibrilas de celulose na estrutura hierárquica de uma fibra vegetal de eucalipto. Figuras adaptadas das referências.

A desordem nas fibrilas está associada principalmente a dois tipos de regiões amorfas. A primeira resulta de imperfeições de empacotamento das cadeias de celulose localizadas na superfície da nanoestrutura. A segunda, e de maior importância, resulta do término de encadeamento das cadeias de celulose ao longo da direção longitudinal das fibrilas, como ilustrado na Figura 4, o que gera

regiões amorfas intercaladas com as regiões altamente cristalinas (IKKALA *et al.*, 2005).

Em geral, as características das nanoestruturas de celulose nas aplicações como agente de reforço, tais como morfologia, dimensões e cristalinidade são então altamente dependentes do método de preparação. A hidrólise ácida tem sido um dos métodos mais utilizados para obtenção de nanocristais de celulose (Figura 4).



Fonte: IKKALA *et al.* 2005.

Figura 4. Esquema ilustrativo do método da Hidrólise ácida. (a) Regiões amorfas em evidência numa fibrila. (b) Mecanismo envolvido na hidrólise ácida. (c) Nanoestruturas altamente cristalinas obtidas no processo.

Sob condições controladas, a hidrólise provoca a dissolução das regiões amorfas (superficiais e intercaladas), sem danos significativos das regiões cristalinas da fibrila. Isto ocorre devido a maior facilidade de permeação do ácido nas regiões amorfas, o que gera uma cinética de hidrólise diferenciada das cadeias de celulose nestas regiões (SIQUEIRA *et al.*, 2009).

Os segmentos cristalinos obtidos por este método apresentam, geralmente, formato de bastão, ou agulhas, e são denominados como *whiskers* de celulose (HUGGE *et al.*, 2007).

As condições de hidrólise afetam as características finais dos nanocristais de celulose. Por exemplo, tempos longos de hidrólise resultam em nanocristais mais curtos. Diferentes tipos de ácido também afetam as propriedades dessas nanoestruturas: hidrólise por ácido clorídrico (HCl), por exemplo, resulta em nanocristais de celulose com carga superficial mínima, enquanto o uso de ácido sulfúrico (H₂SO₄) promove a formação de suspensões aquosas estáveis, devido à reação dos grupos hidroxila das cadeias de celulose com os grupos sulfatos ionizáveis. A repulsão eletrostática em determinados valores de pH entre os grupos sulfato evita a agregação e precipitação dos nanocristais (BECK- CANDANEDO *et al.*, 2005). Utilizando o método da hidrólise ácida, suspensões de nanocristais têm sido obtidas a partir várias fontes como celulose bacteriana, algodão, tunicina (celulose animal), polpas celulósicas e fibras vegetais como de sisal e bagaço de cana-de-açúcar (BHATTACHARYA *et al.*, 2008).

Dentre as fontes, o bagaço da cana-de- açúcar seria indicado para extração de nanocristais de celulose. Representa uma fonte abundante de celulose, geralmente, com um teor de 50 % do polímero, dependente da variedade e maturidade da cana-de-açúcar, além da qualidade do solo.

O bagaço também representa o maior subproduto gerado nas indústrias açucareiras e de etanol. O destino comum do bagaço é geralmente a incineração para cogeração de energia e vapor nas indústrias da cana (KIATKITTIPONG *et al.*, 2009). Contudo, a quantidade que é gerada deste resíduo torna atrativo seu uso como fonte de nanocristais de celulose.

1.3.2 Celulose nanofibrilada (CNF)

A celulose nanofibrilada (CNF), também chamada na literatura de nanofibras, microfibras, celulose nanofibrilar e celulose microfibrilar, consiste em nanofibras de celulose longas, flexíveis e emaranhadas, com diâmetro variando entre 1 e 100 nm, e comprimento na escala micrométrica. Seu aspecto visual é o de um gel viscoso, de coloração branqueada observado na Figura 5 (KLEMM *et al.*, 2011; ABDUL KHALIL *et al.*)



Figura 5 . Micrografia da CNF obtida por fibrilação mecânica aspecto visual do gel de CNF (adaptada de DUFRESNE, 2013).

Ao contrário do CNC, a CNF possui regiões cristalinas e amorfas e sua morfologia se assemelha a uma rede de fibras. Por isso, sua razão de aspecto é geralmente alta, devido ao diâmetro reduzido e ao maior comprimento das fibras, na ordem micrométrica (LAVORATTI, 2015). Devido tanto a essa característica quanto a sua morfologia, a CNF consegue formar uma rede de fibras muito rígida (LAVOINE *et al.*, 2012). Os métodos mais comuns de obtenção da celulose nanofibrilada são os que envolvem desintegração mecânica da fibra, tais como homogeneização de alta pressão/alto cisalhamento, explosão a vapor e micronização (LAVOINE *et al.*, 2012).

A desintegração mecânica das fibras celulósicas, sobretudo de suas superfícies, promovendo o rompimento da parede celular e a posterior exposição das fibrilas e microfibrilas, que estavam anteriormente situadas no interior das fibras (TURBAK *et al.*, 1983, citados por SYVERUD *et al.*, 2011). Esse processo resulta em aumento da superfície externa, possibilitando maior área de contato e melhor ligação entre as microfibrilas de celulose nos grupos hidroxílicos terminais reativos.

As microfibrilas que formam a parede celular apresentam dimensões nanométricas com cerca de dezenas de nanômetros de diâmetro. As fibrilas elementares que originam a celulose nanofibrilada compõem agregados de fibrilas elementares que, em conjunto, formam as microfibrilas (CHINGA-CARRASCO, 2011).

Quanto às dimensões, o comprimento das cadeias de celulose nanofibrilada é vários micrômetros maior que o seu diâmetro. A CNF apresenta diâmetro entre 5 e 60 nm e seu comprimento varia na escala micrométrica (KLEMM *et al.*, 2011).

A CNF apresenta zonas com elevada intensidade de fibrilações devido às forças de cisalhamento que as fibras são submetidas no processo de obtenção, enquanto os nanocristais são exclusivamente as regiões cristalinas da molécula de celulose. A celulose nanofibrilada apresenta regiões amorfas e cristalinas que compõem sua cadeia mais alongada no sentido longitudinal. Dessa forma, o longo comprimento das cadeias de celulose nanofibrilada, associado à sua superfície que contém vasta gama de grupos hidroxílicos expostos, acaba potencializando a formação de inúmeras ligações de hidrogênio (PÄÄKKÖ *et al.*, 2007).

A parede celular das células do vegetal é composta por camadas formadas por agregados de microfibrilas combinados com hemiceluloses e lignina (SJÖSTRÖM, 1993). A obtenção e a separação de nanofibrilas de celulose a partir da parede celular necessitam de algum tipo de tratamento químico e/ou mecânico.

A fibrilação de fibras vegetais tem, em sua grande maioria, empregado tratamentos mecânicos, utilizando homogeneização, moagem e refinação (ABE *et al.*, 2007). Todos esses métodos levam à produção de gel com elevado teor de água, que pode ainda ser transformado em pó, por secagem por aspersão (KOLAKOVIC *et al.*, 2011).

A celulose kraft branqueada tem sido frequentemente utilizada como material de partida para produção de celulose nanofibrilada (IWAMOTO *et al.*, 2005; JANARDHANAN e SAIN, 2006; SAITO *et al.*, 2006; SAITO *et al.*, 2007; SAITO *et al.*, 2009). Recentemente pesquisadores conseguiram o isolamento de nanofibrilas de celulose a partir de polpa celulósica, utilizando o processo mecânico de moagem, o que permitiu a obtenção de nanofibrilas com largura média de 15 nm e alguns micrômetros de comprimento (ABE *et al.*, 2007; ABE e YANO 2010; WANG *et al.*, 2013).

O princípio físico-mecânico de atuação do equipamento para isolamento da CNF consiste no desempenho de um conjunto de discos: um disco rotatório e um disco fixo, em um compartimento pressurizado. Há uma abertura ajustável entre os discos para que, por meio do contato mecânico, as fibras de celulose sejam

desfibriladas por forças de alto cisalhamento geradas pelos discos de moagem (VIANA, 2013).

Durante o processo de desfibrilação mecânica ocorrem a diminuição significativa no tamanho das fibras e o consequente aumento de sua área específica, devido à constante exposição das microfibrilas de celulose componentes da parede celular. Uma área específica maior permite o maior número de ligações entre as nanofibrilas e o menor espaço vazio ou menor tamanho dos poros entre elas, resultando em maior densidade e maior transparência (JONOOBI *et al.*, 2009; VIANA, 2013).

Apesar disso, deve-se levar em conta o alto consumo de energia requerido nos processos que utilizam o princípio mecânico de moagem, uma vez que influencia os custos de produção (VIANA, 2013).

A deslignificação das fibras celulósicas favorece a fibrilação e reduz a energia consumida durante o processo de moagem e obtenção de CNF (ABE *et al.*, 2007; IWAMOTO *et al.*, 2008; MORÁN *et al.*, 2008). Dessa forma, a remoção da lignina das fibras por processos de deslignificação é etapa de grande importância para obtenção das nanoceluloses. Zimmermann *et al.* (2010) afirmam que o mais importante para o potencial de reforço é a qualidade da fibrilação. Uma fibrilação de alta qualidade pode ser obtida com a escolha do pré-tratamento e da matéria-prima adequados.

Vários setores industriais, como o automobilístico, de construção civil e de embalagens, vêm desenvolvendo produtos à base de biopolímeros (compósitos e nanocompósitos), utilizando como reforço mecânico as fibras naturais e seus derivados. Portanto, pode-se antecipar que o uso comercial das CNF terá um crescimento exponencial nos próximos anos.

1.4 Embalagem ativa

Embalagem ativa é um dos inovadores conceitos de embalagem de alimentos mais utilizadas atualmente para preservar a qualidade, segurança e propriedades sensoriais dos alimentos (BARBOSA-PEREIRA *et al.*, 2014).

A função da embalagem ativa é interagir com o alimento com o objetivo de melhorar as características físicas, sensoriais e microbiológica, estendendo a vida

de prateleira dos alimentos e aumentando a segurança e qualidade do alimento embalado (SOARES, 1998; AHVENAINEN, 2003).

Dentre as principais técnicas de embalagens ativas, podemos citar as antimicrobianas que inibem ou retardam o crescimento microbiano nos alimentos (HAN, 2005), as substâncias absorvedoras de etileno, oxigênio, dióxido de carbono e umidade (MIHINDUKULASURIYA e LIM, 2014), as antioxidantes e aromatizantes (MARKARIAN, 2006).

1.4.1 Embalagem Antimicrobiana

O desenvolvimento de embalagens antimicrobianas apresenta uma abordagem promissora para controlar ativamente o crescimento microbiano na superfície dos alimentos embalados e consequentemente estender sua vida de prateleira (Kerry, 2014; COZMUTA *et al.*, 2015; GORRASI *et al.*, 2016).

A embalagem antimicrobiana é um tipo de embalagem ativa em que compostos antimicrobianos são incorporados e, ou imobilizados no material da embalagem com o objetivo de reduzir, inibir ou retardar o crescimento de micro-organismos deteriorantes e ou patogênicos no alimento (HAN, 2005; SOARES *et al.*, 2009; DE AZEREDO, 2013). Esta prolonga a fase lag e reduz a fase de crescimento dos micro-organismos, mantendo a segurança e qualidade dos alimentos (HAN, 2000).

As substâncias antimicrobianas podem ser incorporadas diretamente à matriz polimérica, na forma de rótulos e etiquetas ou estar contidos em sachês (OLIVEIRA e OLIVEIRA, 2004).

Alguns fatores podem afetar a efetividade da embalagem antimicrobiana, como a estrutura química e as características de solubilidade do antimicrobiano, a composição e o estado físico do alimento, as condições de tempo e temperatura de estocagem e de distribuição, o método de preparo do filme e a interação com o polímero (HAN, 2003).

Esse tipo de embalagem pode ser mais eficaz do que as substâncias antimicrobianas aplicadas na superfície do alimento, devido a liberação lenta e controlada dos agentes incorporados no material da embalagem, reduzindo assim a quantidade de aditivos adicionado aos alimentos (PENG *et al.*, 2013).

Os antimicrobianos mais utilizados geralmente são substâncias naturais ativas orgânicas, inorgânicas ou biológicas, dentre elas as bacteriocinas, enzimas antimicrobianas, óleos essenciais, compostos fenólicos, etc (SALARBASHI *et al.*, 2013; WEN *et al.*, 2016). Apesar da disponibilidade de muitos destes compostos, os obtidos a partir de extratos de plantas são particularmente mais atraentes pela indústria de embalagens de alimentos devido às suas propriedades antibacterianas, antifúngicas e antioxidante (KANMANI e RHIM, 2014).

Entretanto, as embalagens tradicionais necessitam de melhorias para estender a vida de prateleira dos produtos alimentícios e atender às exigências dos consumidores que buscam por produtos seguros, saudáveis, mais naturais e com menos conservantes sintéticos, além de fornecer embalagens modernas, práticas, que preservem os alimentos e que ao mesmo tempo sejam ecologicamente corretas (SOARES *et al.*, 2009; RHIM *et al.*, 2013).

Novas tecnologias e inovações em embalagens têm surgido com o objetivo de melhorar e, ou monitorar a qualidade dos produtos, sendo que as que aparecem em maior destaque são as do tipo ativa e inteligente (Figura.6) (GOMES *et al.*, 2015).

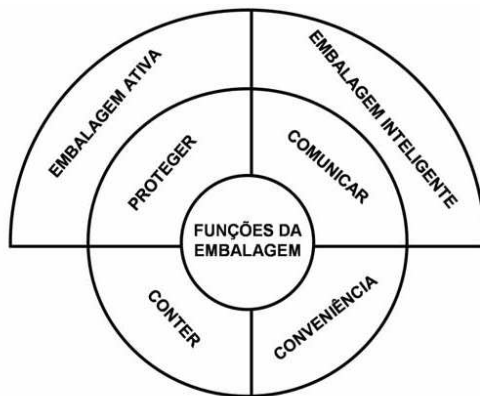


Figura 6. Funções básicas das embalagens e interfaces de atuação das embalagens ativas e inteligentes (YAM *et al.*, 2005)

As embalagens ativas interagem com o produto visando melhorar as características sensoriais, físicas e microbiológicas, prolongar a vida de prateleira dos alimentos e aumentar a sua segurança e qualidade (AHVENAINEN, 2003).

1.5 Nisina

A nisina é uma bacteriocina da classe dos lantibióticos produzida por linhagens de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, uma bactéria amplamente utilizada na indústria de alimentos como cultura “starter” na composição de fermentos lácticos para o processamento de queijos (MAIA *et al.*, 2014).

A introdução da nisina para uso comercial ocorreu na Inglaterra em 1953, e no ano de 1988 foi aprovada pelo FDA (Food and Drug Administration) para o uso como conservante em alimentos e reconhecida como GRAS (Generally Regarded as Safe). Tornou-se então a primeira bacteriocina aprovada para uso comercial em aplicações alimentares no processamento de leite e derivados e, atualmente, tem seu uso aprovado em mais de 50 países (KHAN *et al.*, 2015).

Desde muito tempo as bacteriocinas, e seus micro-organismos produtores correspondentes, têm sido reconhecidos como potenciais agentes bioconservadores de alimentos devido às suas propriedades, como por exemplo a estabilidade às variações de temperatura e pH e espectro de ação amplo (LACROIX *et al.*, 2014).

Estruturalmente, a nisina consiste num pequeno polipeptídeo de característica anfifílica formado por 34 aminoácidos com grupos terminais amina e carboxila e cinco anéis internos envolvendo pontes dissulfeto. Possui os resíduos atípicos de dehidroalanina e dehidrobutirina, além dos anéis de lantionina e β -metil-lantionina já característicos dos lantibióticos (HUQ *et al.*, 2014 e ROHANI *et al.*, 2011).

Há duas variantes naturais de nisina, a nisina A e a nisina Z, que diferem apenas no aminoácido que está presente na posição 27; a histidina na nisina A e a asparagina na nisina Z. Ambas as variantes da nisina apresentam atividade antimicrobiana equivalente, no entanto a nisina Z apresenta maior solubilidade e características de difusão em relação a nisina A, características estas importantes quando se trata da aplicação potencial em alimentos (DE ARAUZ *et al.*, 2009).

Assim, a nisina é considerada um importante aditivo alimentar com potencial de uso especialmente sobre bactérias gram-positivas. Por outro lado, este peptídeo antimicrobiano está sujeito a sofrer influências quanto a sua atividade em função de fatores tais como pH, temperatura, composição e estrutura do alimento bem

como da microbiota natural do alimento (ZHOU *et al.*, 2013). Estes autores citam que já foram verificados casos de resistência das bactérias gram-positivas a esta substância, sendo que os mecanismos de resistências sejam extremamente complexos, variando desde alteração na superfície bacteriana pela alteração na composição de ácidos graxos e fosfolipídios da membrana e da parede até mesmo ação proteolítica de enzimas sobre o peptídeo. Quanto a ação proteolítica, Sun *et al.* (2009) já haviam relatado que este mecanismo de resistência se deve a presença na bactéria resistente do gene *nsr* que codifica uma proteína nisina resistente (NSR).

Melo *et al.* (2006) avaliaram a eficiência antimicrobiana do filme de base celulósica, incorporado com nisina sobre o micro-organismo *Staphylococcus* sp. em diferentes meios de cultura. Os resultados demonstraram satisfatórios quanto à inibição de *Staphylococcus* sp. utilizando filmes antimicrobianos contendo nisina apresentaram como um grande potencial na aplicação como embalagem ativa antimicrobiana para o acondicionamento de alimentos, reduzindo as possíveis contaminações microbiológicas.

Vários autores estudaram a atividade antimicrobiana da nisina em filmes ativos. Segundo Jin *et al.* (2009) estudaram a atividade antimicrobiana de filme biodegradáveis a base pectina com nisina e com compósitos ácido polilático tendo ação antimicrobiana a *Listeria monocytogenes*. Cé *et al.* (2009) verificaram a atividade de filmes ativos a base do quitosana com os agentes antimicrobianos nisina e natamicina para ser usados com revestimentos comestíveis em kiwis e morango minimamente processados e os resultados demonstram que o filme ativo com nisina e natamicina mantiveram os padrões de controle microbiológico.

Segundo Resa *et al.* (2014), a atividade antimicrobiana de filmes contendo nisina e natamicina para o controle de micro-organismos em queijo Port Salu, controlou a atividade da contaminação superficial deste queijo.

2.Referências Bibliográficas

ABDUL KHALIL, H.P.S.; DAVOUDPOUR, Y.; ISLAM, M.I.; MUSTAPHA, A.; SUDESH, K.; DUNGANI R.; JAWAID, M. Production and modification of nanofibrillated cellulose using various mechanical processes: A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 99, p. 649-665, 2014.

ABE, K.; IWAMOTO, S.; YANO, H. Obtaining Cellulose Nanofibers with a Uniform Width of 15 nm from Wood, **Biomacromolecules**, v. 8, p. 3276-3278, 2007.

ABE, K.; YANO, H. Comparison of the characteristics of cellulose microfibril aggregates isolated from fiber and parenchyma cells of Moso bamboo (*Phyllostachys pubescens*). **Cellulose**, v. 17, p. 271–277, 2010.

ABIEF– **Associação Brasileira das Indústrias de Embalagens Plásticas Flexíveis**, 2015.

AHVENAINEN, R. Novel food packaging techniques. Boca Raton: CRC Press LLC, p. 590, 2003.

BARBOSA-PEREIRA, L.; ÂNGULO, I.; LAGARÓN, J. M.; PASEIRO-LOSADA, P.; CRUZ, J. M. Development of new active packaging films containing bioactive nanocomposites. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 26, p. 310-138, 2014.

BARBOZA,R.M.P.CAMARGO,L.A VIEIRA,F.k.M.CORRÊA,A..C. MATTOSO,L.H.C MARCONCINI,J.M. Estudo de propriedades mecânicas de filmes de pectina e nanocompósito pectina/nanowhiskers de celulose provenientes do bagaço de cana-de-açúcar, **Anais da VI Jornada Científica** – Embrapa São Carlos – 05 e 06 de Junho de 2014.

BECK-CANDANEDO, S.; ROMAN, M.; GARY, D. G. Effect of Reaction Conditions on the Properties and Behavior of Wood Cellulose Nanocrystal Suspensions, **Biomacromolecules**, 6, 1048-1054, 2005.

BIAO, H.; LI-RONG, T.; DA-SONG, D.; WEN, O.; TAO, L.; XUE-RONG, C. Preparation of Nanocellulose with Cation–Exchange Resin Catalysed Hydrolysis. In: Rosario Pignatello. **Biomaterials Science and Engineering**. Shanghai: Intech, 2011. p. 139-152,2011.

BOUWMEESTER, H.; DEKKERS, S.; NOORDAM, M. Y.; HAGENS, W. I.; BULDER, A. S.; DE HEER, C.; VOORDE, S. E. C. G.T.; WIJINHOVEN, S. W. P.; MARVIN, H. J. P.; SIPS, A. J. A. M. Review of health safety aspects of nanotechnologies in food production. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 53(1), p. 52-62, 2009.

BHATTACHARYA, D.; GERMINARIO, L. T.; Winter, W. T.; Isolation, preparation and characterization of cellulose microfibers obtained from bagasse, **Carbohydrate Polymers**, 73, 371–377, 2008.

BRANDERO, R. PH, GROSSMANN, M. V. E. Hidrofilicidade de Filmes de Amido/Poli(Butileno Adipato Co Tereftalato) (Pbat) Adicionados de Tween 80 e Óleo de Soja. **Polímeros**, vol.23, n.2, 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 28/2001.

CARRASCO, G. C. Cellulose fibres, nanofibrils and microfibrils: The morphological sequence of MFC components from a plant physiology and fibre technology point of view. **Nanoscale Research Letter**, v. 6, n. 1, 417, 2011.

CÉ, N. **Utilização de filmes de quitosana contendo nisina e natamicina para cobertura de Kiwis e morangos minimamente processados**. 95 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2009.

CONAB- **Companhia Nacional de Abastecimento (Conab)**- Acompanhamento da Safra Brasileira de Cana-de-Açúcar, Quarto Levantamento, Brasília, abr. 2016.

COSTA, W. L. S; BOCCHI, M. L. M; MARC APPLICATIONS OF SUGAR CANE BAGASSE USED IN The PRESENT, Fatec, São Paulo, 2012.

CHILLO, S.; FLORES, S.; MASTROMATTEO, M.; CONTE, A.; GERSCHENSON, L.; & DEL NOBILE, M. A. Influence of glycerol and chitosan on tapioca starch-based edible film properties. **Journal of Food Engineering**, 88(2), 159 e 168, 2008.

COZUMUTA, A. M.; TURILA, A.; APJOK, R.; CIOCIAN, A.; COZMUTA, L. M.; PETER, A.; NICULA, C.; GALI, N.; BENKOVI, T. Preparation and characterization of improved gelatin films incorporating hemp and sage oils. **Food Hydrocolloids**, v. 49, p. 144-155, 2015.

DAMASIO, R. **Caracterização E Aplicações De Celuloses Nanofibrilada (Cnf) E Nanocristalina (Cnc)**. Dissertation, M.Sc. Viçosa/Brazil. 2015.

DE ARAUZA, L. J; JOZALAA, A. F ; MAZZOLAB, P. G and PENNA, T. C. V. Nisin biotechnological production and application: a review. **Trends in Food Science & Technology** 20 , 146 e 154, 2009.

DE OLIVEIRA, T. M., DE FÁTIMA FERREIRA SOARES, N., PEREIRA, R. M., DE FREITAS FRAGA, K. Development and evaluation of antimicrobial natamycin incorporated film in gorgonzola cheese conservation. **Packaging Technology. Science**, v. 20, p. 147–153, 2007.

DE AZEREDO, H. M. C. Antimicrobial nanostructures in food packaging. **Trends in Food Science & Technology**, v.30, n.1, p. 56-69, 2013.

DUFRESNE, A. Nanocellulose: a new ageless bionanomaterial. **Materials Today**, v. 16, p. 220-227, 2013.

DOMB, A. J. & KUMAR, N. - "Biodegradable Polymers in Clinical Use and Clinical Development", Wiley, 2011.

DUNCAN, T. V. Applications of nanotechnology in food packaging and food safety: Barrier materials, antimicrobials and sensors. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 363, p. 1-24, 2011.

DRUMMOND, F, R .**Produção e caracterização de biocompósitos de poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) (phbv)/resíduo da produção de fécula DE mandioca** .Projeto de Graduação apresentado ao Curso de Engenharia de Materiais da Escola Politécnica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Engenheiro, 2016.

EICHHORN, S. J., DUFRESNE, A.; ARANGUREN, M.; MARCOVICH, N. E.; CAPADONA, R; ROWAN, S. J.; WEDER, C.; THIELEMANS, W.; ROMAN, M.; RENNECKAR, S.; RENNECKAR, Gindl, W.; Veigel, S.; Keckes, J.; Yano, H.; Abe, K.; Nogi, M.; NAKAGAITO, A. N.; MANGALAM, A.; SIMONSEN, J.; BENIGHT, A. S.; BISMARCK, A.; BERGLUND, L. A.; Peijs, T., Review: current international research into cellulose nanofibres and nanocomposites, **Journal of Materials Science**, 45, 1-33, 2010.

ESPITIA, PAULA JUDITH PÉREZ; DU, WEN-XIAN; AVENA-BUSTILLOS, ROBERTO DE JESÚS; Soares, Nilda de Fátima Ferreira; MCHUGH, TARA H. Edible films from pectin: Physical-mechanical and antimicrobial properties - A review. **Food Hydrocolloids**, v. 35, p. 287-296, 2014.

FABRIS, S.; FREIRE, M. T.; REYES, F. G. Embalagens plásticas: tipos de materiais, contaminação de alimentos e aspectos de legislação. **Rev. Bras. Toxicol**, v.19, n. 2 , p. 59-70, 2006.

FRAEYE, I.; DUVETTER, T.; DOUNGLA, E.; VAN LOEY, A.; & HENDRICKX, M. Fine-tuning the properties of pectinecalcium gels by control of pectin fine structure, gel composition and environmental conditions. **Trends in Food Science & Technology**, 21(5), 219 e 228,2010.

GUIMARÃES JUNIOR, M.; BOTARO, V. R.; NOVACK, K. M.; TEIXEIRA, F. G.; TONOLI, G. H. D. Starch/PVA based nanocomposites reinforced with bamboo nanofibrils. **Industrial Crops and Products**, v.70, p.72-83, 2015.

GORRASI, G.; BUGATTI, V.; TAMMARO, L.; VERTUCCIO, L.; VIGLIOTTA, G.; VITTORIA, V. Active coating for storage of Mozzarella cheese packaged under thermal abuse. **Food Control**, v. 64, p. 10-16, 2016.

GOMES, R. C.; PASTORE, V. A. A.; MARTINS, O. A.; BIONDI, G. F. Aplicações da nanotecnologia na indústria de alimentos. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v.9, n.1, p. 1-8, 2015.

HAN, J.H. Antimicrobial food packaging. **Food technology**. v, 54, p. 56–65. 2000

HAN, J. H. Antimicrobial Food Packaging. In: AHVENAINEN, R. (Ed.) **Novel Food Packaging Techniques**, cap. 4, p. 50 - 65, Washington: CRC Press, 2003.

HENRIQUE, C. M.; CEREDA, M. P.; SARMENTO, S. B. S. **Características físicas de filmes biodegradáveis produzidos a partir de amidos modificados de mandioca**. Ciência e Tecnologia de Alimentos, v.28, n. 1, p. 231-240, 2008.

HUGGE, M. A.; ROJAS, O. J.; LUCIA, L. A.; SAIN, M., Cellulosic Nanocomposites: A review, **Bioresource**, 3, 928-980, 2008.

HUQ, T.; RIEDL, B.; BOUCHARD, J.; SALMIERI, S. & LACROIX, M. (2014) Microencapsulation of nisin in alginate-cellulose nanocrystal (CNC) microbeads for prolonged efficacy against *Listeria monocytogenes*. **Cellulose**, 21, 6, 4309-4321, 2014.

JANARDHANAN, S; SAIN, M. Isolation of cellulose microfibrils - an enzymatic approach. **Bioresources**, v. 1, p. 176–188, 2006.

JIN, O.; LIU, L.; HOWARD ZHANG H, KEVIN HICKS, K. Antimicrobial activity of nisin incorporated in pectin and polylactic acid composite films against *Listeria monocytogenes*, **International Journal of Food Science & Technology**. Volume 44, Issue 2, pages 322–329, February, 2009.

JOLIE, R. P.; DUVETTER, T.; VAN LOEY, A. M.; & Hendrickx, M. E. Pectin methylesterase and its proteinaceous inhibitor: a review. **Carbohydrate Research**, 345(18), 2583 e 2595, 2010.

JONOOBI, M.; HARUN, J.;SHAKERI, A.; MISRA, M.; OKSMAND, K. Chemical composition, crystallinity, and thermal degradation of bleached and unbleached kenaf bast (*Hibiscus cannabinus*) pulp and nanofibers. **BioResources**, v. 4, n. 2, p. 626-639, 2009.

FDA (Food and Drug Administration). Code of Federal Regulations. Title 21: Food and Drugs, Parts 170 to 190. v. 3. Chapter I: Food and drug administration department of health and human services; subchapter b--food for human consumption (continued). Part 170: **Food Additives**. Subpart §170.3 (o) 3: Definitions - Antioxidants. 2012. Accessed 19.02.14.

FARRIS, S.; SCHAICH, K. M.; Liu, L., PIERGIOVANNI, L.; & YAM, K. L. Development of polyion-complex hydrogels as an alternative approach for the production of bio-based polymers for food packaging applications: a review. **Trends in Food Science & Technology**, 20(8), 316 e 332, 2009.

FRAEYE, I.; DUVETTER, T.; DOUNGLA, E.; VAN LOEY, A.; & HENDRICKX, M. Fine-tuning the properties of pectinecalcium gels by control of pectin fine structure, gel composition and environmental conditions. **Trends in Food Science & Technology**, 21(5), 219 e 228,2010.

FRONE, A.N.; PANAITESCU, D.M.; DONESCU, D. Some aspects concerning the isolation of cellulose micro- and nano-fibers. UPB Scientific Bulletin, Series B: **Chemistry and Materials Science**, v. 73, p. 133-152, 2011.

HUQ, T.; RIEDL, B.; BOUCHARD, J.; SALMIERI, S. & LACROIX, M. (2014) Microencapsulation of nisin in alginate-cellulose nanocrystal (CNC) microbe-ads for prolonged efficacy against *Listeria monocytogenes*. **Cellulose**, 21, 6, 4309-4321, 2014.

IWAMOTO, S.; NAKAGAITO, A. N.; YANO, H. Nano-fibrillation of pulp fibers for the processing of transparent nanocomposites. **Applied Physics A**, v. 89, n. 2, p. 461- 466, 2007.

IKKALA, O.; RAS, R. H. A.; HOUBENOV, N. RUOKOLAINEN, J.; PÄÄKÖ, M.; LAINE, J.; LESKELÄ, M.; BERGLUND, L. A.; LINDSTROM, T.; BRINKE, G. T.; LATROU, H.; FAULH, C. F. J., **Solid state nanofibers based on self-assemblies: from cleaving from self-assemblies to multilevel hierarchical constructs**, 2005.

IWAMOTO, W. A. **Estudos das propriedades magnéticas dos filmes finos de GaAs dopado com Mn e Zn_{1-x}CoxO**. 2007. 100f. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual de Campinas, Instituto "Gleb Wataghin", SP, 2008.

JONOOBI, M.; HARUN, J.;SHAKERI, A.; MISRA, M.; OKSMAND, K. Chemical composition, crystallinity, and thermal degradation of bleached and unbleached kenaf bast (*Hibiscus cannabinus*) pulp and nanofibers. **BioResources**, v. 4, n. 2, p. 626-639, 2009.

KANMANI, P.; RHIM, J. W. Development and characterization of carrageenan/grapefruit seed extract composite films for active packaging. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 68, p. 258-266, 2014.

KHALIL,A ; DAVOUDPOUR, A,Y;. ISLAMA,N, MUSTAPHA, A; K. SUDESHD DUNGANI ,R; M. Jawaid . Production and modification of nanofibrillated cellulose using various mechanical processes: A review. **Carbohydrate Polymers**. V99 649–665., 2014

KERRY, J. P. New packaging technologies, materials and formats for fast-moving consumer products. In J. H. Han (Ed.), **Innovations in food packaging**. p. 549–584 (2nd Ed.) San Diego, USA: Academic Press. 2014.

KIATKITTIPONG, W.; WONGSUCHOTO, P.; PAVASANT, P., Life cycle assessment of bagasse waste management options, **Waste Management**, Waste Management, 29, 1628–1633, 2009.

KOLAKOVIC, R.; PELTONEN, L.; LAAKSONEN, T.; PUTKISTO, K.; LAUKKANEN, A.; HIRVONEN, J. Spray-Dried Cellulose Nanofibers as Novel Tablet Excipient. **American Association of Pharmaceutical Scientists**, v. 12, n. 4, p. 1366- 1373, 2011.

KOKOSZKA, S., DEBEAUFORT, F., HAMBLETON, A., LENART, A., & VOILLEY, A. Protein and glycerol contents affect physico-chemical properties of soy protein isolate-based edible films. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, 2010.

KHAN, A.; RIEDL, B.; LACROIX, M. Optimization of the antimicrobial activity of nisin, Na-EDTA and pH against gram-negative and gram-positive bacteria. **LWT - Food Science and Technology**. Volume 61, Issue 1, Pages 124–129, April 2015.

KLEMM, D.; KRAMER, F.; MORITZ, S.; LINDSTRÖM, T.; ANKERFORS, M.; GRAY, D.; DORRIS, A. Nanocelluloses: **A New Family of Nature-Based Materials. Angewandte Chemie International Edition**, v. 50, p. 5438-5466, 2011.

LAURENT, M. A., & BOULENGUER, P. Stabilization mechanism of acid dairy drinks (ADD) induced by pectin. **Food Hydrocolloids**, 17(4), 445 e 454, 2003.

LAVOINE, N.; DESLOGES, I.; DUFRESNE, A.; BRAS, J. Microfibrillated cellulose – Its barrier properties and applications in cellulosic materials: A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 90, p. 735-764, 2012.

LAVORATTI, ALESSANDRA, **Desenvolvimento e caracterização de compósitos poliméricos poliéster/nanocelulose**. Dissertação (Mestrado) – Universidade de Caxias do Sul, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos e Tecnologias, 2015.

Li, R., FEI, J.; Cai, Y.; Li, Y.; FENG, J.; YAO, J. Cellulose whiskers extracted from mulberry: A novel biomass production, **Carbohydrate Polymers**, 76, 94–99, 2009.

MAIA, N., I RIGOTTI, R., SILVA, R LANGE, B., MECA, G., MACEDO, R., LUCIANO. F., Nisin Activity Against Contaminant Bacteria Isolated From Bioethanol Fermentation Tanks. In: Anais do 12º Congresso Latino americano de Microbiologia e Higiene de Alimentos - MICROAL 2014 **Food Science Proceedings**, num.1, vol.1]. São Paulo: Editora Blucher, 2014.

MARKARIAN, J. Consumer demands push growth in additives for active packaging. **Plastics, Additives and Compounding**, v. 8, n. 5, p. 30–33. 2006.

MARTELLI, M.R.; BARROS, T.T.; MOURA, M.R. DE; MATOSSO, L.C.H.; ASSIS, O.B.G. Effect of chitosan nanoparticles and pectin content on mechanical properties and water vapor permeability of banana puree films. **Journal of food Science**, V.78, N 98-N103, 2013.

MELO, N, R.; SOARES, N, F, F.; ANDRADE, N, J, A.; LIMA, V, D.; PIRES, A.C.S. Avaliação da eficiência de filme Antimicrobiano incorporado com nissina sobre o crescimento de Staphylococcus sp. **Alimento Nutrição**. Araraquara v.17, n.1, p.91-95, jan./mar. 2006.

MISHRA, R. K., BANTHIA, A. K., & MAJEED, A. B. A. Pectin based formulations for biomedical applications: a review. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, 5(4), 1 e 7, 2012.

MIHINDUKULASURIYA, S. D. F.; LIM, L. T. Nanotechnology development in foods packaging: a review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 40, p. 149-167, 2014.

MOURA M.R.; AOUADA F.A.; SOUZA, J.R.; MATTOS, L.H.C. Preparação de novos nanobiocompósitos comestíveis ativos contendo nanoemulsão de canela e pectina, **Polímeros**. vol.24, no.4, São Carlos, July. /Aug. 2014.

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

OJJO, V.; RAY, S. S. Processing strategies in bionanocomposites. **Progress in Polymer Science**, v. 38, p. 1543-1589, 2013.

OLIVEIRA, L. M.; OLIVEIRA, P. A. P. L. V. Revisão: Principais agentes antimicrobianos utilizados em embalagens plásticas. **Braz. J. Food Technol.**, v.7, p. 161-165, 2004.

OTONI, C.G.; MOURA, M.R.D.E.; AQUADA, F.A.; CAMILTO, G.P.; CRUZ, R.S.; LOREVIC E, M.V.; SOARES, N.D.E. F.F.; MATTOSO, L.H.C. Antimicrobial and physical-Mechanical properties of pectin-papaya puree cinnamaldehyde nanoemulsion edible composite films. **Food hydrocolloids**, V,41, P.188-194, 2014.

OKAHISA, Y.; ABE, K.; NOGI, M.; NAKAGAITO, A.N.; NAKATANI, T.; YANO, H. Effects of delignification in the production of plant-based cellulose nanofibers for optically transparent nanocomposites. **Composites Science and Technology**, v. 71, p. 1342–1347, 2011.

PÄÄKKÖ, M.; ANKERFORS, M.; KOSONEN, H.; NYKANEN, A.; AHOLA, S.; OSTERBERG, 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**, v. 8, n. 6, p. 1934-1941, 2007.

PANYAM, J.; LABHASETWAR, V. Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Philadelphia, v. 64, p. 61-71, Dec. 2012.

PENG, Y.; WU, Y.; LI, Y. Development of tea extracts and chitosan composite films for active packaging materials. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 59, p. 282-289, 2013.

PELISSARI, F. M.; ANDRADE-MAHECHA, M. M.; SOBRAL, P. J. A.; MENEGALLI, F. C. Comparative study on the properties of flour and starch films of plantain banana (*Musa paradisiaca*). **Food Hydrocolloids**, v. 30, p. 681-690, 2013.

PEREIRA, ELAINE CRISTINA; FIGUEIREDO, EVÂNIA ALTINA TEIXEIRA DE; RICARDO, NÁGILA MARIA PONTES SILVA; SANTOS, DENILTON GARCIA; RIBEIRO, ANA CAROLINA BARBOSA; CUNHA, ARCELINA PACHECO; "Atividade Antimicrobiana da Pectina do Noni (*Morinda Citrifolia* L.) Contra Bactérias de Origem Alimentar.", p. 87-88. In: **Proceedings of the XII Latin American Congress on Food Microbiology and Hygiene** [=Blucher Food Science Proceedings, v.1, n.1]. São Paulo: Blucher, 2014.

REIS, L.C.B.; BARCELLOS, A.D.; MACHADO, B.A.S.; DRUZIAN, J.I. FILME BIODEGRADÁVEL INCORPORADO COM GLICEROL E ADITIVOS NATURAIS. **Cadernos de Prospecção** - ISSN 1983-1358 (print) 2317-0026 (online), vol.4, n.4, p.23-32,2011.

RESA,C,P,O;. GERSCHENSON, L,N; JAGUS ,R,J. Natamycin and nisin supported on starch edible films for controlling mixed culture growth on model systems and Port Salut cheese. **Food Control**. 44 (2014) 146 e 151, 2014.

RHIM, J., PARK, H.; SIK HA, C. Bio-nanocomposites for food packaging applications. **Progress in Polymer Science**, v.38, p. 1629– 1652, 2013.

ROHANI, S. M. R., MORADI, M., MEHDIZADEH, T., SAEI-DEHKORDI, S. S., & GRIFFITHS, M. W. (2011). The effect of nisin and garlic (*Allium sativum* L.) essential oil separately and in combination on the growth of *Listeria monocytogenes*. **LWT - Food Science and Technology**, 44(10), 2260e 2265, 2011.

SAITO, T.; NISHIYAMA, Y, PUTAUX, J-L.; VIGNON, M.; ISOGAI, A. Homogeneous suspensions of individualized microfibrils from TEMPO-catalyzed oxidation of native cellulose. **Biomacromolecules**, v. 7, p. 1687–1691, 2006.

SAITO, T.; KIMURA, S.; NISHIYAMA, Y.; ISOGAI, A. Cellulose nanofibres prepared by TEMPO mediated oxidation of native cellulose. **Biomacromolecules**, v. 8, p. 2485–2491, 2007.

SAITO, T.; HIROTA, M.; TAMURA, N.; KIMURA, S.; FUKUZUMI, H.; HEUX, L.; ISOGA, A. Individualization of nano-sized plant cellulose fibrils by direct surface carboxylation using TEMPO catalyst under neutral conditions. **Biomacromolecules**, v. 10, p. 1992–1996, 2009.

SALMIERI, S ;ISLAM,F; RUHUL A. KHAN ; HOSSAIN, F,M; HAYTHAM M. M. IBRAHIM; MIAO,C ;HAMAD W Y; LACROIX,M. Antimicrobial nanocomposite films made of poly(lactic acid)-cellulose nanocrystals (PLA-CNC) in food applications: part A—effect of nisin release on the inactivation of *Listeria monocytogenes* in ham. **Cellulose** .21:1837–1850, 2014.

SILA, D. N., VAN BUGGENHOUT, S., DUVETTER, T., FRAEYE, I., De ROECK, A., VAN LOEY, A., et al. Pectins in processed fruits and vegetables: part IIdstructuree function relationships. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, 8(2), 86 e 104,2009.

SIQUEIRA, G.; BRAS, J.; DUFRESNE, A. Cellulose Whiskers versus Microfibrils: Influence of the Nature of the Nanoparticle and its Surface Functionalization on the Thermal and Mechanical Properties of Nanocomposites, **Biomacromolecules**, 10, 425–432, 2009.

SILVA, R., HARAGUSHI, S. K., MUNIZ, E. C., RUBIRA, A. F., Aplicações de fibras lignocelulósicas na química de polímeros e em compósitos, **Química Nova**, 32, No 3, 661-671, 2009.

SILVA, J.C. **BIOREFINERY OF LIGNOCELLULOSIC MATERIALS: NOVEL PRODUCTS, METHODS AND APPLICATIONS OF FOREST AND AGRICULTURAL FEEDSTOCKS**. Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência Florestal, 2015.

SILVA, G. D. DA; LOCATELLI, G. O.; FINKLER, L.; FINKLER, C. L. L PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE FILMES COMESTÍVEIS À BASE DE ALGINATO E PECTINA.", p. 4658-4665 In: Anais do XX **Congresso Brasileiro de Engenharia Química - COBEQ 2014** [= Blucher Chemistry Engineering Proceedings, v.1, n.2]. São Paulo: Blucher, 2015.

SYVERUD, K.; CARRASCO, G.C.; TOLEDO, J.; TOLEDO, P.G. A comparative study of Eucalyptus and Pinus radiata pulp fibres as raw materials for production of cellulose nanofibrils. **Carbohydrate Polymers**, v. 84 p. 1033–1038, 2011.

SOARES, N. F. F.; HOTCHKISS, J. H. Naringinase immobilization in packaging films for reducing naringin concentration in grapefruit juice. **Journal of Food Science**, 63, 61–65, 1998.

SOARES, N.F.F.; PIRES, A.C.S.; CAMILLOTO, G.P.; SILVA, P.S.; ESPITIA, P.J.P.; SILVA, W.A. Recent patents on active packaging for food application. **Recent Patents on Food, Nutrition & Agriculture**, v. 1, p. 171-178. 2009.

SOTHORNVIT, R.; PITAK, N. Oxygen permeability and mechanical properties banana films. **Food Research International**, v. 40, p. 365-370, 2007.

SUN, Z.; J. ZHONG, X. LIANG, J. LIU, X. CHEN, L. HUAN. Novel mechanism for nisin resistance via proteolytic degradation of nisin by the nisin resistance protein NSR. **Antimicrob Agents Chemother**, 53 (5) (2009), pp. 1964–1973, 2009.

TELLES, M.R.; SARAN, L.M.; UNÊDA-TREVISOLLI, S.H. Produção, propriedades e aplicações de bioplástico obtido a partir da cana-de-açúcar. **Revista Ciência e Tecnologia: FATEC-JB**, v.2, n.1, p.52-63, 2011.

UGALDE, M. L. **Biofilmes ativos com incorporação de óleos essenciais**. 2014. 162 p. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos), Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim, 2014.

ÚNICA- **União da Indústria de Cana-de-Açúcar** UNIÃO DA AGROINDÚSTRIA CANAVIEIRA DE SÃO PAULO. Consecana - Dados. Abr. 2011. Disponível em: <http://www.unica.com.br/>. Acesso em: 09/02/2015.

VIANA, L, C. **Desenvolvimento de filmes celulósicos nanoestruturados a partir da polpa kraft de Pinus sp.** Tese (doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, Curitiba./2013.

ZHOU,H;; FANG, J; TIAN, Y; , LU, X, Y. Mechanisms of nisin resistance in Gram-positive bacteria. **Annals of Microbiology**. Volume 64, pp 413-420, 2014.

ZIMMERMANN, T.; PÖHLER, E.; GEIGER, T. Cellulose Fibrils for Polymer Reinforcement. **Advanced Engineering Materials**, v. 6, p. 754-761, 2004.

WANG, B.; SAIN, M.; OKSMAN, K. Chemical and structural characterization of sisal fibers from Agave sisalana variety. **Applied Composites Materials**, v. 14, p. 89, 2007.

YOUSSEF, A. M.; EL-SAYED, S. M.; SALAMA, H. H.; EL-SAYED, H. S.; DUFRESNE, A. Evaluation of bionanocomposites as packaging material on properties of soft white cheese during storage period. **Carbohydrate Polymers**, v. 132, p. 274-285, 2015.

CAPÍTULO 2

**Síntese e caracterização de nanocristais de celulose extraídos da fibra do
bagaço de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.)**

Síntese e caracterização de nanocristais de celulose extraídos da fibra do bagaço de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.).

Resumo

Este estudo teve como objetivo sintetizar e caracterizar os nanocristais de celulose (CNCs) extraídos da fibra do bagaço de cana-de-açúcar. As técnicas usadas para a caracterização dos CNCs foram microscopia eletrônica de varredura, microscopia de força atômica, microscopia eletrônica de transmissão, potencial zeta, análise elementar (Fourier no infravermelho-FTIR), difração de raios X e caracterização térmica de CNCs. A caracterização morfológica mostrou claramente a formação de CNCs em forma de haste com o tamanho variando de 150-300 nm (comprimento) e 6-20 nm (diâmetro). A análise de difração de raios X e análise térmica revelaram que CNCs têm cristalinidade mais elevada (71 %) do que a fibra do bagaço do cana-de-açúcar *in natura* (69 %), contudo menor estabilidade térmica. Os CNCs sintetizados têm um elevado potencial de aplicação como reforço em bionanocompósitos para diversas áreas (fabricação de papel, aditivos de revestimentos, papéis de segurança e embalagens de alimentos) e gerando valor agregado em aplicações industriais, devido a sua boa estabilidade térmica observado neste estudo.

Palavras-chave: bagaço de cana-de-açúcar, celulose, nanocristais de celulose, nanocelulose, biopolímeros.

Synthesis and characterization of cellulose nanocrystals extracted from fibers of sugar cane bagasse (*Saccharum officinarum* L.).

Abstract

This study aimed to synthesize and characterize cellulose nanocrystals (CNCs) extracted from sugar cane bagasse fiber. The techniques used for the characterization of the CNCs were scanning electron microscopy, Transmission electron microscopy, atomic strength microscopy, zeta potential, elementary analysis (Fourier in infrared -FTIR), X-Ray Diffraction and thermal characterization of CNCs. The morphological characterization clearly showed the formation of CNCs stem-shaped with the size varying from 150 to 300 nm (length) and from 6 to 20 nm (diameter). The X-Ray diffraction analysis and the thermal analysis revealed that CNCs have more elevated crystallinity (71 %) than the sugar cane bagasse fiber *in natura* (69 %), but smaller thermal stability. The synthesized CNCs have an elevated application potential as reinforcement in bionanocomposite in several areas (paper manufacture, coating additive, safe papers and food packages) which generates aggregated value in industrial applications, due its good thermal stability observed in this study..

Key words: sugar cane bagasse, cellulose, cellulose nanocrystals, nanocellulose, biopolymers.

1.Introdução

As pesquisas para o desenvolvimento de materiais biodegradáveis de fontes renováveis são crescentes, devido as preocupações com recursos naturais limitados e impactos ambientais causados pelo uso de polímeros sintéticos (SCHMITT *et al.*, 2015). A disponibilidade de biopolímeros, relativamente mais baratos, que se apresentam em abundância na natureza, pode ser citada como uma razão na pesquisa para obtenção de novos nanomateriais(LUZI,2016).

Os biopolímeros, como a celulose, ganham destaque na substituição de materiais derivados de fontes não renováveis. Dentre os nanomateriais conhecidos e utilizados destacam-se as nanoceluloses são materiais celulósicos que possuem pelo menos uma de suas dimensões na escala nanométrica (DAMASIO, 2015; HAISHUM DU *et al.*,2016). Além disso, as nanoceluloses podem ser produzidas por diferentes métodos, a partir de várias fontes lignocelulósicas (KHALIL *et al.*, 2014).

A celulose nanocristalina são nanoceluloses derivada de fibras celulósicas, após passarem por processo químico. Para obtenção dessas nanoceluloses existem muitos fatores que tange às técnicas de individualização das microfibrilas de celulose, que estão imersas em uma matriz constituída de hemiceluloses e lignina (KHALIL *et al.*, 2014; NG *et al.*, 2015).

As metodologias de obtenção de nanomateriais celulósicos tem procurado aproveitar as estruturas cristalinas já presentes na fibra celulósica natural para o isolamento de materiais ou os nanocristais de celulose (CNC) (BONDESON, METHREW e OKSMAN, 2006), cuja obtenção depende das condições experimentais do processo utilizado. A composição destes materiais varia de acordo com a fonte natural utilizada.

Assim, há diversas particularidades presentes no processo de obtenção destes nanomateriais: quantidade de lignina, hemicelulose e açúcares presentes na fibra, tamanho das regiões cristalinas e condições experimentais para seu isolamento são questões que devem ser analisadas de acordo com a aplicação destinada ao material (DEEPA, ABRAHAM, *et al.*, 2011 e OKSMAN, ETANG, *et al.*, 2011).

No processo de obtenção dos nanocristais de celulose, uma das etapas fundamentais é a retirada de outros componentes presentes na fibra, processo comumente chamando de branqueamento pelo método **TCF** (Totally Chlorine Free), é uma tecnologia de branqueamento onde não se utiliza qualquer reagente à base de cloro. Com essas preocupações ambientais em mente, o uso de novos agentes oxidantes como o peróxido de hidrogênio vem crescendo, permitindo a remoção da maioria das substâncias cromóforas sob condições suaves (REINSTALLER, 2008 e KODA, 2000)

A celulose nanocristalina é isolados a partir da hidrólise ácida das fibras kraft branqueadas pelo método TCF e são similar a pequenos cilindros ou bastonetes de carácter cristalino. Ela é também conhecida como *whiskers* ou nanocristais de celulose. O mecanismo de obtenção da CNC por meio de hidrólise ácida envolve a remoção das regiões amorfas das fibrilas elementares de celulose por hidrólise, restando apenas as regiões cristalinas (DAMASIO, 2015; NETO *et al*, 2016; OUN RHIM, 2016).

Por causa do seu apelo as propriedades intrínsecas, tais como dimensões nanoescala, elevada área superficial, morfologia única, baixa densidade e elevada resistência mecânica. Além disso, os nanocristais de celulose pode ser facilmente modificado e está prontamente disponível, renovável, e biodegradável (KHALIL *et al.*, 2014. DAMASIO, 2015).

Sendo o Brasil um país caracterizado pela economia agroindustrial e um dos maiores produtores mundiais de cana-de-açúcar. É também o primeiro do mundo na produção de açúcar e etanol e conquista, cada vez mais, o mercado externo com o uso do biocombustível como alternativa energética. O Brasil produziu 623.127 milhões toneladas de cana-de-açúcar no ano 2015 é responsável por mais da metade do açúcar comercializado no mundo, o país deve alcançar taxa média de aumento da produção de 3,25 %, até 2018/19 do produto (UNICA-União da Indústria de cana-de-açúcar,2016).

Estima-se que 1 tonelada de cana gera em torno de 280 kg de bagaço. O bagaço também representa o maior subproduto gerado nos programas do etanol e açúcar no país. O destino comum do bagaço é geralmente a incineração para cogeração de energia e vapor nas indústrias da cana (CONAB, 2015). Contudo,

quantidade que é gerada deste resíduo torna atrativo seu uso como fonte de nanocelulose.

Surge grande expectativa na busca por adaptar as fibras vegetais tais como o resíduo do bagaço da cana-de-açúcar, para nanoreforço em várias indústrias (embalagens e automobilística). Sendo assim o objetivou-se isolar e caracterizar os nanocristais de celulose extraídos da fibra do bagaço de cana-de-açúcar.

2. Material e Métodos

2.1. Matéria-prima

A matéria prima utilizada neste estudo foi o bagaço da cana-de açúcar fornecida pela empresa agroindustrial do ramo de açúcar e álcool, proveniente da safra de (2014/2015).

2.2 . Caracterização da fibra da polpa Kraft bagaço de cana-de-açúcar

2.2.1 . Composição química

A caracterização química da fibra do bagaço da cana-de- açúcar foi realizada no Laboratório de Celulose e Papel no Departamento de Engenharia Florestal da Universidade Federal de Viçosa. As seguintes análises químicas foram realizadas em duplicata: teor de carboidratos (xilose, galactose, manose e arabinose), cinzas e metais (Mg, Ca, Mn, Fe e Cu). Os procedimentos analíticos utilizados estão relacionados na Tabela1.

Tabela 1- Procedimentos analíticos realizados na caracterização química da polpa Kraft do bagaço de cana-de-açúcar

Parâmetros	Procedimentos
Teor de Carboidratos *	Wallis et al.(1996)
Teor de cinzas	TAPPI 211om 93
Metais**	TAPPI T 266 om-94

*Glicanas, xilanas, mananas e arabinanas.

** Cálcio, magnésio manganês, ferro e cobre

2.3) Branqueamento pelo método TCF (Totally Chlorine Free)

O branqueamento da polpa kraft do bagaço da cana-de-açúcar foi realizada no Laboratório de Celulose e Papel no Departamento de Engenharia Florestal da Universidade Federal de Viçosa. A polpa passou por um branqueamento pelo método **TCF** (Totally Chlorine Free), é uma tecnologia de branqueamento onde não se utiliza qualquer reagente à base de cloro (MOREIRA, 2010). Este branqueamento foi dividido em quatro estágios:

A pré-deslignificação com oxigênio (O) consistiu em uma posterior deslignificação da polpa após o cozimento (Tabela.2). Ocorreu uma degradação e dissolução da lignina, durante o branqueamento com oxigênio, ocorreu através de reações das estruturas fenólicas livres na lignina.

O segundo estágio de quelação (Q) foram utilizados em processos de branqueamento TCF, visando principalmente a remoção de metais da polpa(Tabela.2).

Os dois últimos estágios com peróxido pressurizado (PO) e peróxido (P95 °C) teve como objetivo branquear a polpa através da reação química do peróxido de hidrogênio sobre a lignina residual (Tabela.2).

Tabela 2- Etapas do branqueamento pelo método TCF (Totally Chlorine Free) da polpa Kraft do bagaço de cana-de-açúcar

Condições	Estágios do Branqueamento TCF			
	O	Q	(PO)	P(95 °C)
Consistência (%)	12	3,5	10	10
Tempo (min)	38	30	120	120
Temperatura (°C)	100	35		-
	-			
Pressão (Kpa)	400	-	750	-
HCl (Kg/odt)	-	1,3	-	-
NaOH (Kg/odt)	15	-	5	9
H ₂ O ₂ (Kg/t)	-	-	40	18
O ₂ (Kg/t)	30	-	10	-
Na ₂ SiO ₂ O ₂ (Kg/odt)	-	-	12	10
MgSO ₄ 7 H ₂ O (Kg/odt)	1	-	1	1
DTPA (Kg/odt)	-	2,5	-	-

Pré-deslignificação com oxigênio (O), quelação (Q), peróxido pressurizado (PO) e peróxido (P95 °C)

2.4 Preparação dos nanocristais de celulose (CNCs)

As suspensões coloidais de CNCs em água desionizada foram preparadas a partir de polpa branqueada pelo método **TCF** (Totally Chlorine Free), Foram utilizadas polpas branqueadas, seguida de hidrólise ácida H_2SO_4 (Synth) realizada durante 45 min á 50 °C sob agitação mecânica. Após essa etapa a solução foi centrifugada (Eppendorf) a 16.000 g por 5min e depois colocada em membrana de diálise (Sigma- alorich dialysis tubing celulose 43mm) por 48 h até o pH da solução ficar entre 6 e 7. A suspensão resultante foi então sonicator (Soni-tech ultrasonic cleaning) durante 5 min e armazenada sob refrigeração (7 °C) para posterior liofilização.

Para estimar o rendimento da hidrólise ácida foi utilizada a equação:

$$Rend (\%) = mf / mi \times 100 \quad (eq. 1)$$

Onde mi representa a massa inicial de FBC branqueada pelo método TCF utilizada na hidrólise ácida e mf representa a massa celulósica obtida na secagem das suspensões (liofilizadas), ambas com relação ao processo da hidrólise ácida.

2.4.1 Tamanho médio do nanocristal de celulose e potencial zeta (ζ)

Os nanocristais de celulose extraídos da fibra do bagaço da cana-de-açúcar por extração ácida foram diluídos em água desionizada conforme procedimento descrito por Damasio (2015) e analisados quanto ao seu tamanho médio e distribuições de tamanhos e medidas de potenciais elétricos superficiais (potencial zeta) com auxílio do Zetasizer Malvern NanoZS. As análises foram realizadas a temperatura ambiente de 25 °C, usando ângulo de detecção de 173°, operando em comprimento de onda de 633 nm (NEVES, 2013). Estes dados foram obtidos em triplicata.

2.4.2 Espectroscopia na região de infravermelho

As análises de espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) foram realizadas para a fibra do bagaço de cana-de-açúcar *in natura* (FBC), fibra do bagaço da cana-de-açúcar branqueada pelo

método TCF (FBCB) e nanocristais de celulose (CNC) com auxílio de espectrômetro FT-IR Nicolet 6700 (Thermo Scientific, EUA). As amostras das fibras e do nanocristal de celulose extraídos do bagaço da cana-de-açúcar foram preparadas segundo Moreira (2010). Os espectros de absorção na região do infravermelho foram obtidos em ampla região de varredura de 4000 cm^{-1} a 400 cm^{-1} , com resolução de 2 cm^{-1} . Onde serão observadas se houve algumas modificações químicas da superfície das fibras e dos nanocristais de celulose.

2.3.4 Análise Termogravimétrica (TGA)

As curvas termogravimétricas foram obtidas por meio de analisador termogravimétrico (modelo 60, Shimadzu, Japão) com programa de temperatura de $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $600\text{ }^{\circ}\text{C}$, taxa de aquecimento de $10\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ e vazão de $60\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, sob atmosfera de nitrogênio (Damasio, 2015). Todas as análises foram realizadas em duplicatas com três repetições.

2.3.5 Difractometria de Raios-X (DR-X)

Os nanocristais de celulose foram caracterizadas por difração de raio-X, a fim de avaliar o índice de cristalinidade da celulose (Ic) as análises foram realizadas no Departamento de Solos na Universidade Federal Viçosa, Brasil, seguindo procedimentos descritos na literatura (BROWNING, 1967; FENGEL; WEGENER, 1989).

As análises de difração de raios-X foram realizadas à temperatura ambiente em difratômetro X-ray Diffraction System modelo X Pert PRO (PANalytical), utilizando filtro de Ni e radiação Co- α ($\lambda = 1,78890\text{ \AA}$), variação angular de 5 a 50° (2θ), velocidade de $3^{\circ}/\text{min}$, tensão de 40 kV e corrente de 30 mA .

Para o cálculo do Ic utilizou-se o software Origin 8.0 (ORIGINLAB, 2007), de acordo com o método de Segal *et al.* (1959), por meio da relação entre os picos de intensidade máxima ($2\theta = 27^{\circ}$) e mínima ($2\theta = 18^{\circ}$) de difração, após correção da linha base.

2.3.6 Microscopia de força atômica (MFA)

As medições em microscópio de força atômica das amostras dos nanocristais de celulose (CNCs) foram realizadas no Departamento de Física da Universidade Federal de Viçosa-MG, Brasil. As topografias da CNC foram estudadas usando microscopia de força atômica (AFM, NT-MDT, Rússia). As imagens de AFM foram adquiridas em modo contato intermitente em áreas aleatórias de $5 \times 5 \mu\text{m}^2$ (DAMASIO, 2015). As amostras de nanocristais de celulose foram analisadas à temperatura ambiente (25 °C).

2.3.7 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As fotomicrografias da superfície das fibras do bagaço de cana-de açúcar e do nanocristal de celulose foram observadas com auxílio de Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV / LEO – Modelo 1430VP, Inglaterra) com aumento de 1000 X. Foram feitas no Núcleo de Microscopia e Microanálise do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Viçosa.

Foram preparadas amostras de 0,5 cm² de cada amostra. Em seguida, foram fixadas em stubs e cobertas com uma camada de ouro (entre 20 nm e 30 nm) com auxílio de um metalizador Sputter Coater (Balzers - Modelo SCD 010), para aumentar a condutividade da superfície das amostras (DAMÁSIO, 2015).

2.3.8 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

A observação da estrutura dos nanocristais de celulose foram realizada em microscópio eletrônico de transmissão modelo Zeiss EM 109 a 80 kV, no Núcleo de Microscopia e Microanálise (NMM) da Universidade Federal de Viçosa (UFV).

Em grids de cobre de 300 mesh recobertos com Formvar (0,5 % em clorofórmio), foi depositada uma gota da suspensão. A solução de acetato de uranila 2 %, utilizada como contraste, foi gotejada sobre o material para facilitar a observação das estruturas (SILVA,2015).

3. Resultados e discussão

3.1 Composição química

Para a determinação da qualidade do material lignocelulósico os parâmetros químicos como teores de celulose e lignina têm sido considerados os mais relevantes (ARANTES, 2009). A polpação química é baseada no princípio de que a lignina pode ser degradada seletivamente, usando reagentes químicos apropriados e permitindo a separação das fibras sem destruir a celulose (ZANATA, 2012).

As composições químicas das amostras foram determinadas pelo padrão TAPPI (2002) e os resultados estão colocados na Tabela 3. Dentre os carboidratos quantificados na polpa kraft do bagaço da cana-de-açúcar, os maiores teores foram da glicose e a hemicelulose. A glicose apresentou teor de (76,9 %) e a hemicelulose (17,5 %). Já a lignina total apresentou baixo teor (1,72 %), a eliminação quase completa de lignina, que é uma substância amorfa, levar a um aumento do grau de cristalinidade das polpas após o processo de branqueamento pelo método TCF. A deslignificação foi favorecida pela utilização de condições severas da polpação, fenômeno semelhante foi observado por Wolf (2011).

Nota-se que o teor de cinzas foi elevado (3,37 %), grande parte das cinzas provêm da sílica destes materiais (Tabela 3). O elevado resultado para o teor de cinzas foi relatado por outros autores (WOLF,2011). Boechat (2010), reportou que o teor de sílica encontrado foi de 1,8 % respondendo por 51,4 % do teor de cinzas do bagaço de cana-de-açúcar, este resultado foi similar ao encontrado neste estudo.

Tabela 3. Composição química da polpa kraft do bagaço-de-cana não branqueada

Constituintes*	Teor (%)
Extrativos totais	0,60
Cinzas	3,37
Lignina total	1,72
Glicose	76,9
Xilose	16,4
Galactose	0,00
Manose	0,00
Arabinose	0,00
Ácidos urônicos	0,80
Grupos acetilas	0,00

*Valores são média de duas repetições.

Estes resultados dessa pesquisa são similares aos valores reportados na literatura (CANILHA *et al.*, 2011, RABELO *et al.*, 2011 e ROCHA *et al.*, 2015). Não se pode considerar estes resultados como fixos para espécie vegetal, pois podem ser verificadas variações devido a posição geográfica do local de plantio, época do ano, idade do vegetal investigado, clima, modo e local de armazenamento, entre outros. Entretanto, a caracterização química é importante no sentido de conhecer o material de estudo e permitir melhor compreensão dos resultados obtidos posteriormente.

A composição inorgânica da fibra está apresentada na Tabela 4. Os elementos minerais têm importância no desenvolvimento dos vegetais e seu papel é bastante conhecido.

A fibra do bagaço de cana-de-açúcar possui compostos minerais que podem interferir na produtividade industrial e, quando se acumulam no processo, são causadores de problemas como corrosões, incrustações e entupimentos e, portanto, reduzem a vida útil dos equipamentos. Parte destes contaminantes permanecem nos efluentes, nos resíduos sólidos e aéreos. Devido aos problemas que os elementos minerais podem causar no nas linhas de produção, a sua quantificação torna-se útil para fornecer subsídios na escolha de medidas preventivas, uma vez que uma grande quantidade destes elementos minerais adentra as indústrias (WOLF, 2011). Durante o branqueamento TCF, no estágio de quelação os minerais são degradados, com isso a polpa branqueada pelo

método TCF usada na síntese dos nanocristais de celulose não possui estes componentes na sua composição.

Tabela 4. Principais minerais da fibra do bagaço de cana-de-açúcar

Minerais*	Teor (mg/kg polpa)
Ca	694
Fe	123
Mn	4,5
Mg	465
Cu	2,70
K	3029
Cl	397

*Valores são média de duas repetições.

3.2 Branqueamentos TCF (Totally Chlorine Free)

No branqueamento é um tratamento químico que visa melhorar as propriedades de alvura, opacidade e clareza da polpa (MOREIRA, 2010). A alvura inicial da polpa kraft do bagaço de cana-de-açúcar foi de 49,99 % de ISSO e uma viscosidade de 970 dm³/kg após passar pelos quatro estágios de branqueamento a alvura final foi de alvura de 91,11 % ISSO e a viscosidade de 718 dm³/kg. Observa-se que a fibra branqueada pelo método TCF adquiriu um elevado grau de alvura o que é reflexo da modificação da sua composição química.

3.3 Tamanho médio do nanocristal de celulose e potencial zeta (ζ)

O tamanho médio encontrado na suspensão de nanocristais de celulosas (CNC) extraídos da fibra Kraft do bagaço de cana-de-açúcar analisados com auxílio de um Zetasizer Malvern NanoZS foi 24,3 nm (Figura 1). O tamanho do CNC foi similares aos resultados já reportados por outros autores (Teixeira et al., 2010), bagaço de cana-de-açúcar (MANDAL e CHAKRABARTY, 2014) e rami (MENEZES, SIQUEIRA, CURVELO e DUFRESNE, 2009).

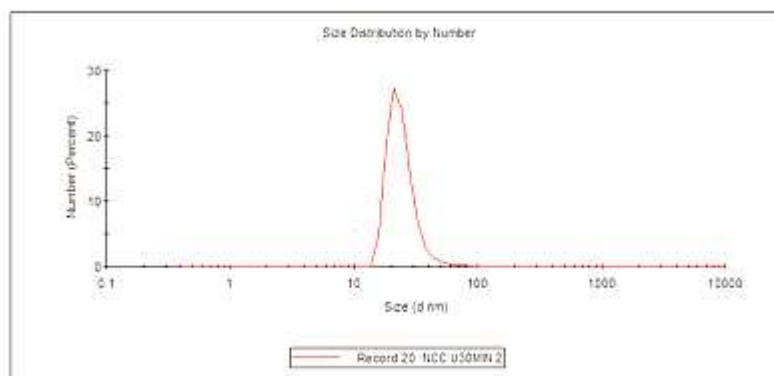


Figura 1- Tamanho do nanocristal de celulose

A avaliação da medida de potencial elétrico superficial mostrou um valor médio -19,4 mV. Como esse valor, em módulo, é abaixo de 25 mV, pode-se considerar que essa suspensão seja instável (MIRHOSSEINI *et al.*, 2008; ZHOU *et al.*, 2012; TEIXEIRA *et al.*, 2010) com tendência a flocular (MIRHOSSEINI *et al.*, 2008). O valor encontrado no potencial Zeta pode ser justificado pelo pH da suspensão que era ligeiramente ácido (pH=6,56). Lu *et al.* (2014) reportaram que elevados valores de potencial zeta indicam alta capacidade de dispersão na água, enquanto valores mais baixos desse parâmetro indicam baixa estabilidade dessa dispersão.

O valor dessa carga superficial é negativo (-19,4 mV) devido às esterificações das hidroxilas dos carboidratos com os grupamentos *sulfatos*, os quais são aniônicos. Os grupamentos sulfatos, que se originaram a partir da hidrólise pelo ácido sulfúrico, agiam como uma força electrostática repulsiva e influenciam diretamente a estabilidade da suspensão (LU *et al.*, 2014).

3.4 Rendimento Dos Nanocristais de Celuloses(CNC).

O rendimento estimado da hidrólise ácida, pela equação (1.1), foi em torno de 40 %. Este valor foi inferior ao obtido para a hidrólise ácida de outras fontes como, por exemplo, nanocristais de celulose obtidas do algodão (rendimento entre 52-65 %) (MOREIRA, 2010). No entanto, tais comparações são limitadas pois devem levar em consideração não só o tipo de fibra celulósica de partida, mas também as condições utilizadas na hidrólise ácida.

3.5 Espectroscopia na região de infravermelho

A espectroscopia FTIR tem sido amplamente utilizada na área de celulose para a investigação, uma vez que apresenta um método relativamente fácil de se obter informação direta sobre modificações químicas que ocorrem durante os vários tratamentos químicos (HARAGUCHI *et al.*, 2013).

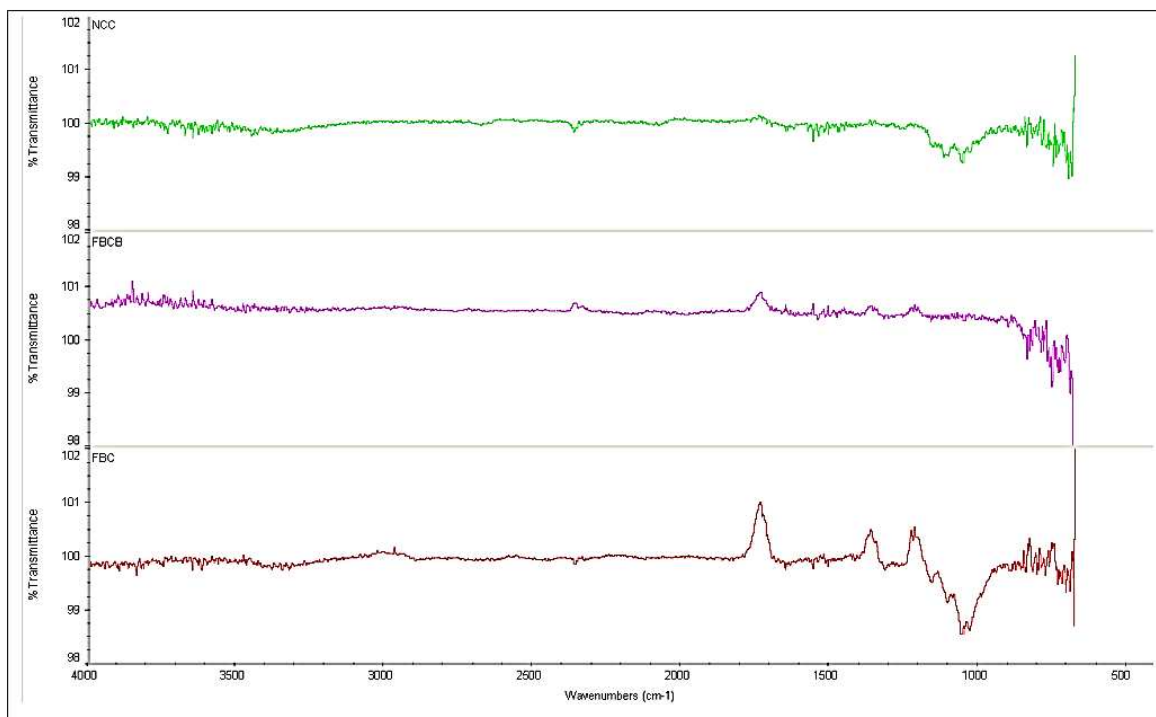


Figura 2- Espectros da região infravermelho (FTIR) dos nanocristais de celulose (CNC), fibra do bagaço da cana-de-açúcar branqueada (FBCB) e fibra do bagaço da cana-de-açúcar *in natura* (FBC).

A Figura 2, mostra os espectros de FTIR da fibra *in natura* (FBC), fibra branqueada (FBCB) e dos nanocristais de celulose (CNC). Os espectros avaliados foram bastante similares, uma vez que se tratam de materiais originados de um mesmo polímero-base fibra do bagaço de cana-de-açúcar. No entanto, existem algumas regiões que podem ser diferenciadas, devido aos diferentes processos de obtenção. A banda larga em 3.351 cm^{-1} no CNC corresponde à vibração das ligações dos grupos-OH os valores foram similares ao reportados por outros autores (CAMARGO *et al.*, 2014).

A amostra FBC apresentou banda em 1.507 cm^{-1} , relativa a ligações C=C presentes nos anéis aromáticos constituintes da lignina, por exemplo. Esta

banda perde intensidade, mas não desaparece-se nas fibras branqueadas (FBCB) e hidrolisadas sugerindo uma remoção parcial da lignina ou alguma degradação da celulose. Durante os dois processos de branqueamento e hidrólise ácida. Outra banda que pode ser observado na fibra *in natura* (FBC) foi aproximadamente de 1.740 cm^{-1} , no espectro correspondeu a absorção da deformação axial de C=O, que é atribuída aos grupos ésteres-urônico e acetil das hemiceluloses ou às ligações ésteres do grupo carboxílico da lignina (NETO *et al.*, 2013). Essas bandas são características de materiais celulósicos e seus valores são consistentes com os encontrados por Lu *et al.* (2014), Liu *et al.* (2014) e Reddy *et al.* (2009).

A banda na região 877 cm^{-1} do infravermelho foi atribuída ao anel de glicose, ligações C-H presentes na celulose e hemicelulose. Observou-se também o aumento deste pico no espectro na fibra branqueada (FBCB), o que se deveu a maior exposição da fibra devido à retirada do material que a revestia a lignina (LEÃO, 2012).

Os espectros dos nanocristais apresentaram bandas na região de 1.055 cm^{-1} e 855 cm^{-1} que correspondem à estrutura da celulose (ROSA *et al.*, 2012). Os nanocristais de celulose apresentam regiões sulfatadas remanescentes da hidrólise ácida sofrida para sua obtenção (PODSIADLO *et al.*, 2005; LU *et al.*, 2014). Essas regiões encontram-se na faixa de 1.055 cm^{-1} por causa da vibração da ligação S=O, que ocorre devido a reações de esterificação (LU e HSIEH, 2010; NETO *et al.*, 2013).

3.6 Análise Termogravimétrica (TGA)

A temperatura inicial de degradação dos nanocristais de celulose foi de (268 °C) provavelmente devido à estrutura cristalina da CNC. A fibra do bagaço de cana-de açúcar *in natura* (FBC) quando comparado com o nanocristal possuiu estabilidade térmica maior.

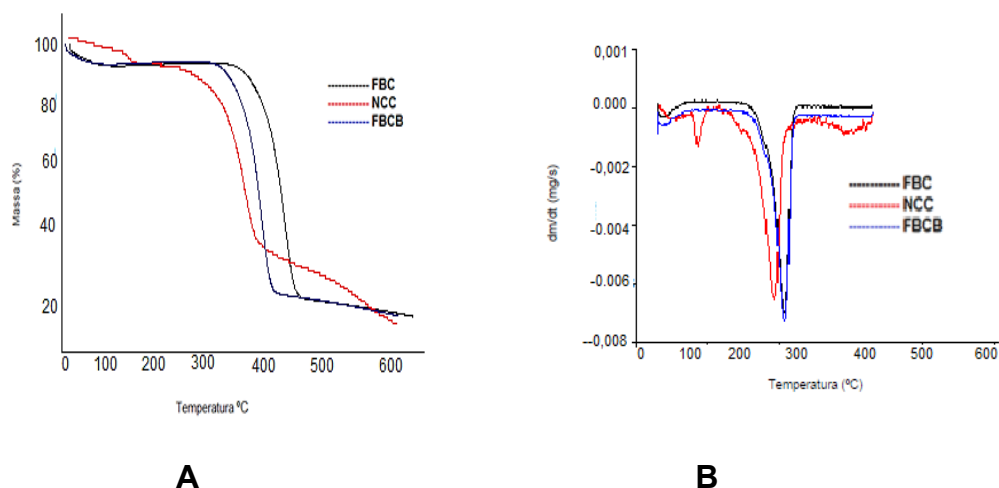


Figura 3- Degradação térmica TGA (3A) e DTG (3B) do bagaço de cana-de- açúcar *in natura* (FBC), nanocristais de celulose (CNC), fibra do bagaço de cana-de- açúcar branqueada (FBCB).

O comportamento térmico e as curvas de TGA (Figura 3A) e de DTG (Figura 3B). Mostraram os eventos térmicos que aconteceram durante a degradação das fibras e dos nanocristais de celulose, pode-se dividi-los em três principais: liberação da água aderida das regiões amorfas e superficiais; degradação das regiões amorfas e liberação de voláteis; e degradação das regiões cristalinas e quebra dos monômeros que formam o polímero(MARIANO, 2016).

As curvas termogravimétricas TG representaram a perda de massa, em porcentagem, em função da temperatura, enquanto as curvas DTG corresponderam à derivada primeira das curvas TG e apresentaram a variação da massa em relação ao tempo, registrada em função da temperatura (DAMASIO, 2015).

A estabilidade térmica é essencial para que as nanoceluloses sejam utilizadas como material de reforço eficaz. A temperatura típica de processamento de materiais termoplásticos é acima de 200 °C, logo os nanocristais de celulose apresentam grande potencial como agentes de reforço devem ser avaliadas quanto ao seu comportamento termomecânico (ROMAN e WINTER, 2004; NETO *et al.*, 2013).

No entanto, existem nos nanocristais de celulosas outros componentes que alteraram as temperaturas de degradação máxima, como por exemplo os grupos sulfatos, que aceleram as reações de degradação (ROMAN e WINTER,

2004). Estas reações podem ser observadas no caso dos nanocristais de celulosos (Figura 3A).

O primeiro evento térmico, que ocorreu entre as temperaturas de 30 e 120 °C, pode ser caracterizado como a perda de umidade superficial ou de água não ligada quimicamente à nanoestrutura.

Mandal e Chakrabarty (2014), ao avaliarem nanocompósitos baseados em poli (álcool vinílico) e nanocelulose de bagaço de cana, constataram que a perda de água ocorreu na faixa de 30 a 140 °C. Esse evento térmico ocorreu devido à retirada de água, que muitas vezes aderida somente à superfície necessita de energia para evaporação, caracterizando um processo endotérmico. Na Figura 3B verificou que os nanocristais de celulose formados apresentaram estas características dessa primeira fase endotérmica.

Os próximos dois eventos de degradação são responsáveis pela perda de massa significativa para os nanocompósitos. Teixeira *et al.* (2010) e Tonoli *et al.* (2012) constataram diminuição da temperatura de degradação devido à presença de grupamentos sulfatos na superfície dos nanocristais de celulose. A substituição de grupos OH por grupos sulfatos diminui a energia de ativação de degradação das cadeias de celulose (WANG *et al.*, 2007). A influência da sulfatação em nanocristais pode ser observada na Figura 3B, em que os picos de maior região de perda de massa estão situados abaixo de 300 °C, enquanto que para a fibra do bagaço de cana-de-açúcar (FBC) e fibra do bagaço de cana-de-açúcar branqueada acima de 300 °C. Os CNCs desenvolvidos neste estudo possuem estabilidade térmica viável para diversas áreas (embalagens, aparatos eletrônicos e camadas de papéis cartões).

3.7 Difratometria de Raios-X (DR-X)

A similaridade entre os difratogramas evidenciou que a estrutura cristalina tipo I da celulose na FBC foi preservada mesmo após o tratamento químico, o que é uma característica positiva para a resistência mecânica da FBC (Figura 4).

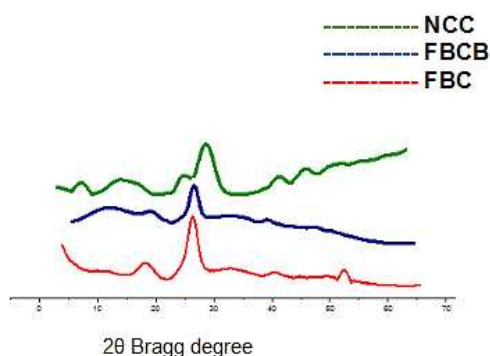


Figura 4– Difratogramas de raio-X do nanocristal de celulose (CNC), fibra do bagaço de cana-de açúcar branqueada (FBCB), fibra do bagaço de cana-de – açúcar (FBC).

O valor encontrado do índice cristalinidade (IC) para a FBC foi aumentou de 69 % para 80 % após o tratamento químico (branqueamento TCF). Este aumento pode ser explicado pela remoção dos componentes amorfos (hemicelulose e lignina) e pelo rearranjo das cadeias de celulose na fibra após o tratamento químico (CAMARGO *et al.*, 2014).

Após o processo de hidrólise destas amostras a cristalinidade diminui de 80 % na fibra branqueada, para 71 % o nanocristal de celulose. Valor similar foi encontrado por Barboza *et al.* (2014). Essas diferenças no índice de cristalinidade entre as amostras podem ser explicadas considerando-se o processo de hidrólise das regiões amorfas ocorreu parcialmente, mas sugere que pode ter ocorrido uma degradação parcial da estrutura cristalina superficial dos nanomateriais, gerando defeitos superficiais que não permitem uma cristalinidade próxima a 100 %. O Ic pode também ter sido influenciado pela possível presença de alguns açúcares na suspensão de nanocristais (KUMAR *et al.*, 2014). O tempo de hidrólise ácida foi um fator importante na síntese do CNC e pode ter contribuído para IC de 71 %, isso ocorreu devido a presença de domínios amorfos remanescentes que não foram hidrolisados. Resultados similares foi encontrado Rosa (2012), evidenciou que o tempo de hidrólise ácida também é um fator determinante na índice cristalinidade.

3.8 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A microscopia eletrônica de varredura foi realizada para avaliar os diferentes tipos de estruturas formadas na superfície dos nanocristais e das fibras. Os tratamentos químicos também podem causar alterações estruturais das fibras lignocelulósicas. Por isso, a morfologia das fibras e do nanocristais de celulose foram avaliadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV), e as micrografias são apresentadas na Figuras 5.

As imagens de MEV permitiram observar que os nanocristais de celulose (CNC) tem a capacidade de formação de filmes mais rugosos (Figura 5C). Enquanto as fibras *in natura* (FBC) possuem morfologia entrelaçada, rígida, compactada e uma estrutura mais homogênea (Figura 5A), quando comparado com o CNC (Figura 5B) exibiu uma morfologia mais desorganizada, com maior exposição das fibras, isso pode ser explicado devido ao tratamento químico (branqueamento TCF) que a fibra sofreu uma hidrólise ácida que expôs algumas das regiões cristalinas da fibra.

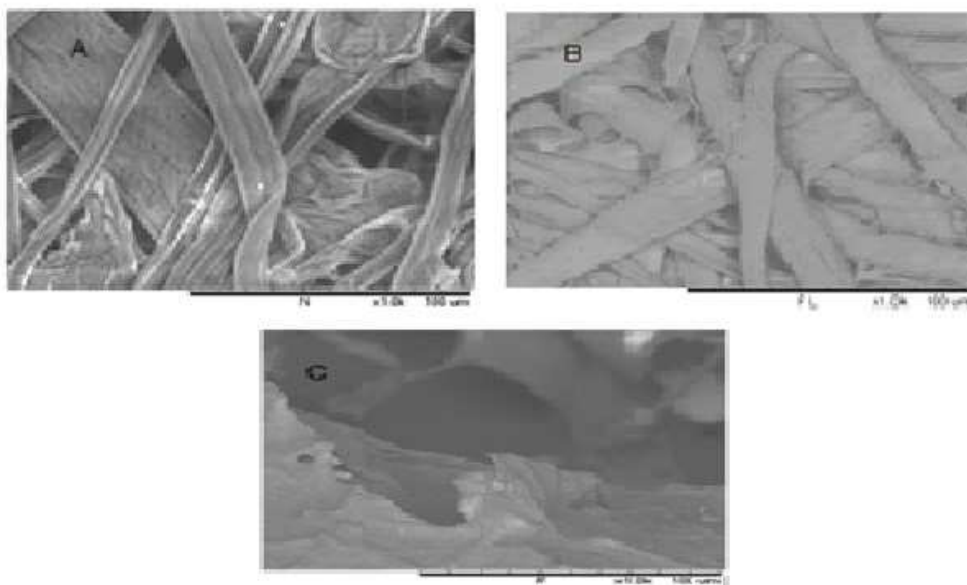


Figura 5 – Micrografia de MEV da fibra do bagaço de cana de açúcar–FBC (A), fibra do bagaço de cana de açúcar branqueada–FBCB (B), nanocristais de celulose–CNC (C).

3.9 Microscopia de força atômica (MFA)

A microscopia de força atômica permitiu a observação física da topografia exata dessas nanoestruturas. À medida que ocorreu a varredura na frequência de oscilação da ponta, vales e picos são desenhados em função da morfologia dos nanocristais de celulose estudados. A estrutura física dos nanocristais de celulose (Figura 6) observados em MFA remeteu a um pequeno cilindro, cujas dimensões (comprimento e diâmetro) estão na escala nanométrica (IBRAHIM *et al.*, 2015). Ao traçar o perfil 3D (Figura 6C e 6D) dos CNCs, observou claramente seu formato similar a bastonetes.

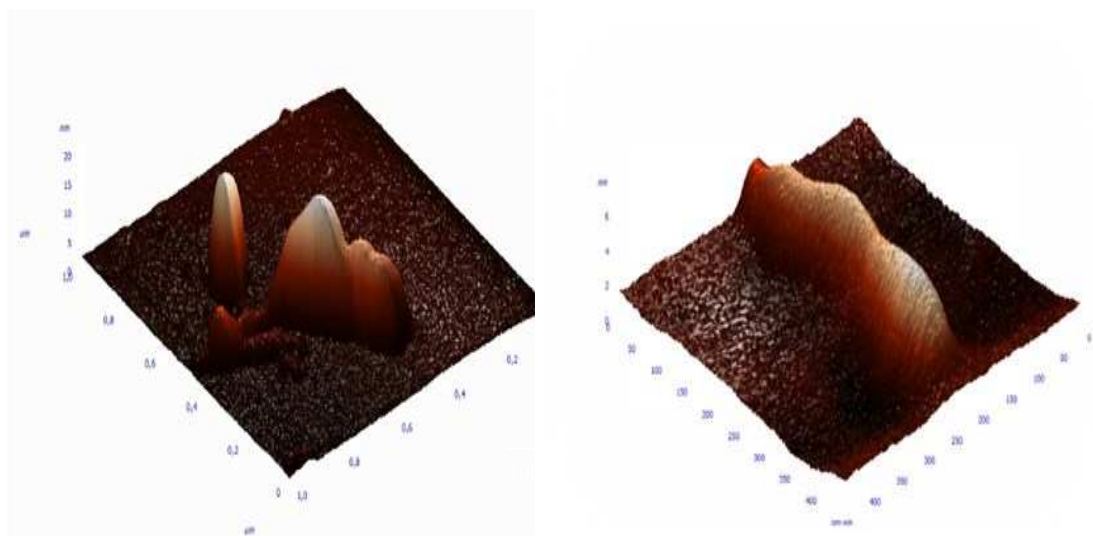
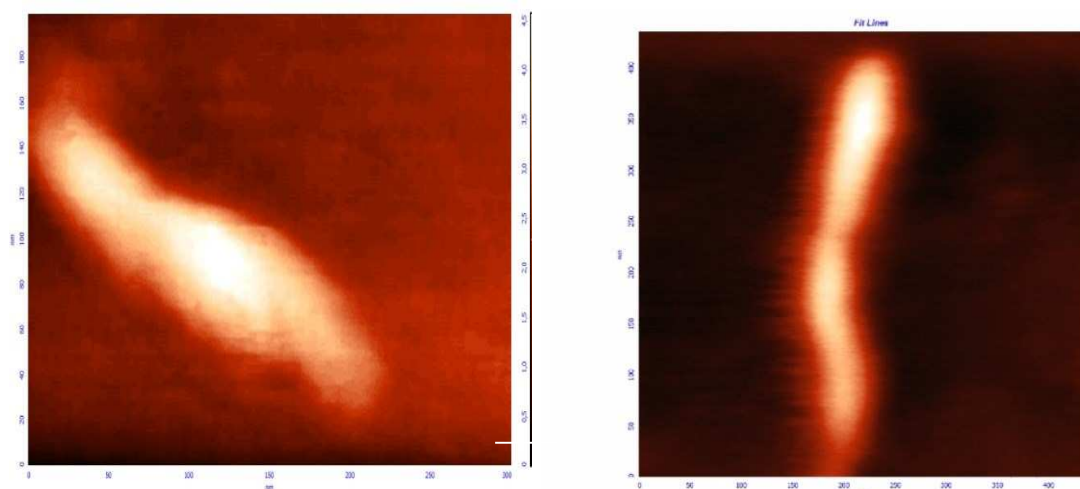


Figura 6— Imagens de MFA de CNC, Micrografia de força atômica varredura no modo de contato intermitente. 6A) e 6B) Imagem 3D da superfície do nanocristais de celulose.



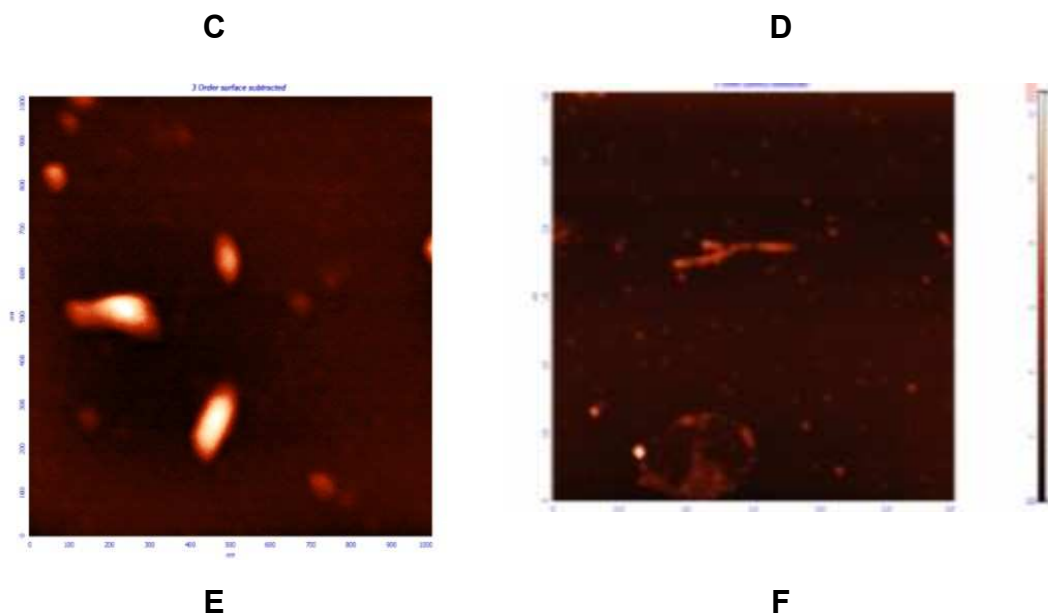


Figura 6–Imagens de MFA de CNC, Micrografia de força atômica varredura no modo de contato intermitente. 6C) e 6D) Varredura de $1 \times 1 \text{ } \mu\text{m}^2$ (detalhe de um nanocristal) em 6D) e 6F) Varredura geral da área de $5 \times 5 \text{ } \mu\text{m}^2$.

Os nanocristais caracterizados acima possuem comprimento médio dos cristais variam da ordem de 150-300 nm. Já os menores nanocristais de celulose possuem diâmetro de 6 nm e os maiores diâmetro de até 20 nm (figura 6A e 6B). Cao *et al.* (2010) afirmam que ao utilizar hidrólise com ácido forte obtêm-se geralmente nanocristais de 100 a 200 nm de comprimento e 20 a 40 nm de largura.

3.10. Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Na Figura 7, mostrou a micrografia de MET apresentaram nanoceluloses com formato de agulha, confirmando que a extração do CNC foi bem sucedida.

As características morfológicas dos CNCs são dependentes da fonte de celulose e das condições experimentais do seu isolamento. Dong *et al.* (1998) foram os primeiros pesquisadores a estudar os efeitos das condições de hidrólise nas estruturas dos CNC de fibras de algodão, hidrolisadas com ácido sulfúrico. Eles relataram que o aumento do tempo de hidrólise conduz a nanocristais mais

curtos e com maior carga superficial, devido à presença de grupos sulfato na superfície dos nanocristais (LEITE,2015).

Os nanocristais de celulose são similares a pequenas agulhas (Figura 7A) de carácter cristalino, isolados a partir da hidrólise ácida das fibras. O mecanismo de obtenção dos nanocristais por meio de uma hidrólise ácida, de acordo com Pääkkö *et al.* (2007), demonstra que a ação dos agentes de hidrólise promove a extração das regiões amorfas das fibrilas elementares de celulose, restando apenas as regiões cristalinas.

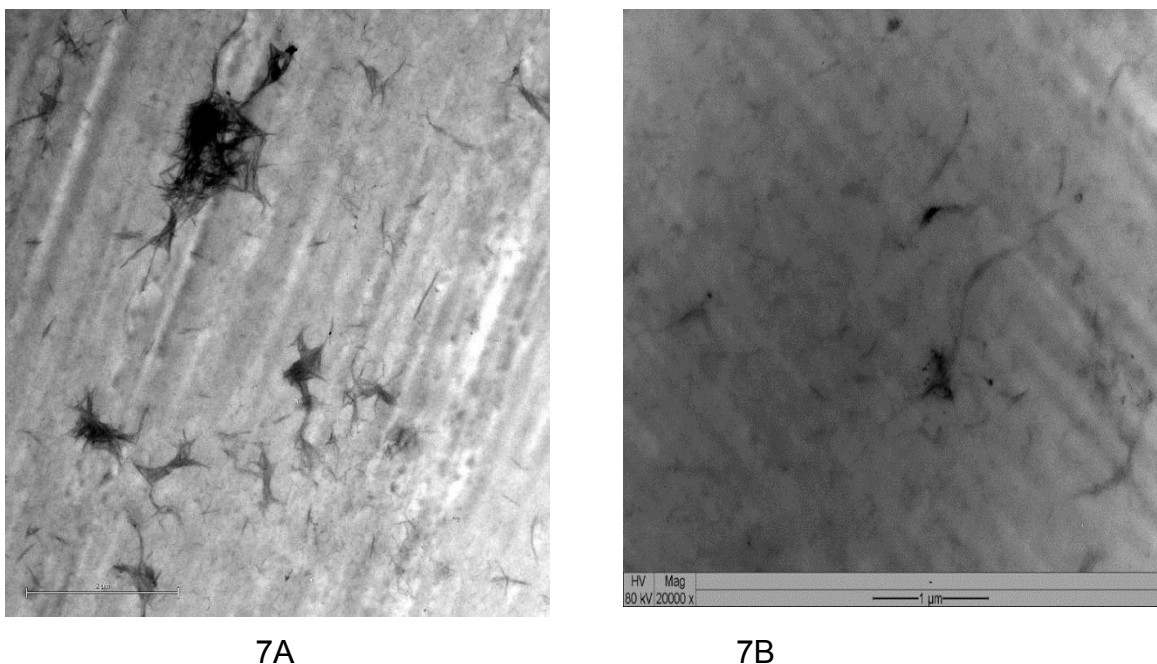


Figura 7. Microscopia electronica de transmissão : imagens dos nanocristais de celulose– 20,000X mag (7A); B) nanocristais de celulose – 20,000X mag (7B)

Estas imagens mostraram nanocristais individuais e alguns agregados . O aparecimento de cristais lateralmente agregados nas imagens MET já era esperado devido á elevada área superficial específica e as fortes interações de hidrogênio estabelecidas entre os CNCs. Estes agregados pode existir mesmo mesmo em suspensão,mas quando o meio de dispersão é removido como no caso da preparação de amostra para o MET, estes agregados podem ser ainda mais numerosos do que os cristais individuais (NETO,2012).

Segundo Leite (2015), no seu estudo mostrou a existência de estruturas maiores (microestruturas) com tamanhos que variam de 10 a 100 µm, aproximadamente. A presença dessas estruturas pode ser devido à hidrólise

incompleta das fibras, como também à aglomeração durante a secagem dos CNC.

De acordo Rosa *et al.*,(2010) micrografias de transmissão eletrônica de uma suspensão de nanocristais de celulose de fibra de coco imaturo obtiveram formato muito similar ao encontrado neste estudo.

4. Conclusão

A partir deste estudo foi possível o isolamento e a caracterização dos nanocristais de celulose extraídos do bagaço de cana-de-açúcar. O método utilizado para produção de nanocristais de celulose apresentou um rendimento de 40 %. Os nanocristais de celulose sintetizados e caracterizados encontra-se na escala nanométrica e têm grande potencial como nanoreforço em bionanocompósitos para diversas áreas e um valor agregado em aplicações industriais, devido a sua estabilidade térmica apresentada neste estudo.

5. Referências Bibliográficas

ARANTES, A.P. **Uso de soluções hidrotrópicas na deslignificação do bagaço de cana-de-açúcar**. Dissertação (Mestrado em Química), Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2009.

AZEREDO, V.M.; DIAS, M.V.; BORGES, S.V.; COSTA, A.L.R.; Silva, E.K.; MEDEIROS; E.A.A.; SOARES, N.F.F. Development of whey protein isolate bio-nanocomposites: Effect of montmorillonite and citric acid on structural, thermal, morphological and mechanical properties. **Food Hydrocolloids**, v. 48, p.179-188, 2015.

BAUMHARDT NETO, R. Raios X. In: **Técnicas de caracterização de polímeros**. São Paulo: Artliber, 2007. p. 41-60,2007.

BARBOZA, R.M.P., CAMARGO, L.A., VIEIRA, F.K.M., CORREA, C.A., MATTOSO, L.H.C. Estudo de propriedades mecânicas de filmes de pectina e nanocompósitos pectina /nanowhiskers de celulose provenientes do bagaço de cana-de-açúcar. **Anais da VI Jornada Científica** – Embrapa São Carlos – 05 e 06 de Junho de 2014.

BOECHAT, J.U.B. **Produção de papel tissue a partir de bagaço de cana-de-açúcar**. Dissertação (Especialização Lato Sensu em Tecnologia de Celulose e Papel) - Universidade Federal de Viçosa, Mg, 2010.

BLANCO, M. A. **Avaliação da incorporação de nanopartículas de quitosana ao cimento endodôntico ah plus™**. 2011. 78 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Metalúrgica e de Materiais) – Instituto Alberto Luiz Coimbra de pós-graduação e pesquisa de engenharia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011.

BROWNING, B. L. **Methods of Wood Chemistry**. New York: Interscience Publishers, v. 2, p. 385-823, 1967.

CAMARGO, L. A. de; PEREIRA, S. C.; FARINAS, C. S.; MARCONCINI, J. M.; MATTOSO, L. H. C.; "Obtenção de nanowhiskers de celulose a partir dos resíduos da hidrólise enzimática do bagaço DE cana-de-açúcar", p. 1848-1853. In: **Anais do XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química - COBEQ 2014 [= Blucher Chemical Engineering Proceedings, v.1, n.2]**. São Paulo: Blucher, 2015.

CANILHA, L.MILAGRES,A.M.F SILVA, S.S;SILVA,J.B, FELIPE, M.G.A, ROCHA,G.J.M; FERRRAZ,A; CARVALHO,W. Sacarificação da biomassa lignocelulósica através de pré hidrólise ácida seguida por hidrólise química enzimática : Uma estratégia de desconstrução da fibra vegetal. **Revista Analytica**, São Paulo, n.44, p.48-54, Jan 2010.

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

DAMASIO, R.A.P. **CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÕES DE CELULOSES NANOFIBRILADA CNF) E NANOCRISTALINA (CNC)**. 2015.88f, Dissertação (Mestrado em Ciência Florestal) – Programa Pós-Graduação em Ciência Florestal, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2015.

DONG, H. Cellulose nanocrystals as a reinforcing material for electrospun poly(methyl methacrylate) fibers: Formation, properties and nanomechanical characterization. **Carbohydr. Polym.** 87, 2488–2495 ,2012.

FENGEL, D.; WEGENER, G. **Wood: chemistry, ultrastructure, reactions**. New York: Gruyter, 613 p, 1989.

HAISHUN DU,CHAO LIU, XINDONG MU, WENBO GONG, DONG LV, YIMEI HONG, CHUANLING SI, BIN LI. Preparation and characterization of thermally stable cellulose nanocrystals via a sustainable approach of FeCl₃- catalyzed formic acid hydrolysis. **Cellulose**, Volume 23, pp 2389-2407, August 2016.

LUZI.F, FORTUNATI.E, JIMÈNES.A,PUGLIA.D. Production and characterization of PLA-PBS biodegradable blends reinforced with cellulose nanocrystals extracted from hemp fibres. **Industrial Crops and Products**. Volume 93,pages 276-289, December, 2016.

REDDY, K.O.; GUDURI, B.R.; RAJULU, A.V. Structural characterization and tensile properties of borassus fruit fibers. **J Appl Polym Sci**, v. 114, n. 1, p .603-611, 2009.

ROCHA, G.J.M., Nascimento, V.M., Gonçalves, A.R., Silva, V.F.N., Martín, C. Influence of mixed sugarcane bagasse samples evaluated by elemental analysis and physical-chemical composition. **Ind. Crops Prod.** 64, 52–58. 2015.

ROSA, S M L. (2012). **Isolamento de nanocristais de celulose de resíduos agrícolas e emprego em nanocompósitos de polipropileno.** Tese de Doutorado (Doutorado em Química). Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 116 p, 2012.

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

SCHMITT, H.; GUIDEZ, A.; PRASHANTHA, K.; SOULESTIN, J.; LACRAMPE, M. F.; KRAWCZAK, P. STUDIES on the effect of storage time and plasticizers on the structural variations in thermoplastic starch. **Carbohydrate Polymers** 115, 364, 2015.

SILVA, J.C. **Biorefinery of lignocellulosic materials: novel products, methods and applications of forest and agricultural feedstocks.** Tese Programa de Pós-Graduação em Ciência Florestal, 2015

SIXTA, H. **Handbook of Pulp.** Wiley-VCH Verlag GmbH & Co, v. 1, 608 p., 2006.

SOUZA, N.F ;PINHEIRO, J.A; SILVA,P; Morais, J.P, Men de sá Moreira de Souza Filho, Ana Iraidy Santa Brígida, Celli Rodrigues Muniz and Morsyleide de Freitas Rosa. Development of Chlorine-Free Pulping Method to Extract Cellulose Nanocrystals from Pressed Oil Palm Mesocarp Fibers **Journal of Biobased Materials and Bioenergy** Vol. 9, 1–8, 2015.

TAPPI-TECHNICAL ASSOCIATION OF PULP AND PAPER INDUSTRY (TAPPI). Ash in wood, pulp, paper and paperboard: combustion at 525°C. T-211 om-93. TAPPI test methods. Atlanta: TAPPI Press. 1996.

TAPPI-TECHNICAL ASSOCIATION OF PULP AND PAPER INDUSTRY (TAPPI). Determination of sodium, calcium, copper, iron, and manganese in pulp and paper by atomic absorption spectroscopy: T 266 om- 94. Atlanta, 1998/1999.

TAPPI – TECHNICAL ASSOCIATION OF THE PULP AND PAPER INDUSTRY. Tappi Standard Methods, Atlanta: TAPPI 2002.

TEIXEIRA, E. M.; CORRÊA, A. C.; MANZOLI, A.; LEITE, F. L.; OLIVEIRA, C. R.; MATTOSO, L. H. C. Cellulose nanofibers from white and naturally colored cotton fibers. **Cellulose**, v. 17, p. 595–606, 2010.

TONOLI, G.H.D.; TEIXEIRA, E.M.; CORRÊA, A.C.; MARCONCINI, J.M.; CAIXETA, L.A.; PEREIRA-DA-SILVA, M.A.; MATTOSO, L.H.C. Cellulose

micro/nanofibres from Eucalyptus kraft pulp: Preparation and properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 89, p. 80– 88, 2012.

ÚNICA. **Úniao da Indústria de cana-de-açúcar**. Disponível em: <http://www.unica.com.br>. Acesso em 20-01-2016.

ZANATA, E. R. **Estudo cinético da pirólise das biomassas bagaço de mandioca, casca de soja e bagaço de cana**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Centro de Engenharias e Ciências Exatas. Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Toledo, 2012.

ZHOU, Y. M., Fu, S. Y., ZHENG, L. M., & ZHAN, H. Y. Effect of nanocellulose isolation techniques on the formation of reinforced poly (vinyl alcohol) nanocomposite films. **Express Polymer Letters**, 6, 794–804, 2012.

WALLIS, A. F. A.; WEARNE, R. H.; WRIGHT, P. J. Chemical analysis of polysaccharides in plantation eucalypt woods and pulps. **Tappi Journal**, v. 49, n. 4, p. 258-262, 1996.

WOLF, L.S. **Pré-tratamento organossolve do bagaço da cana-de-açúcar para a produção de etanol e obtenção de xilooligômeros**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química na área de Pesquisa e Desenvolvimento de processos químico)- Universidade Federal de São Carlos.

CAPÍTULO 3

**Síntese e caracterização da celulose nanofibrilada (CNF) extraída do
bagaço de cana-de açúcar (*Saccharum officinarum* L.).**

Síntese e caracterização da celulose nanofibrilada (CNF) extraída do bagaço de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.)

RESUMO

Este estudo teve como objetivo sintetizar e caracterizar celulose nanofibriladas (CNFs) extraídos da fibra do bagaço de cana-de-açúcar. As técnicas usadas para a caracterização dos CNFs foram microscopia eletrônica de varredura, microscopia de força atômica, microscopia eletrônica transmissão, potencial zeta, análise elementar (Fourier no infravermelho-FTIR), difração de raios X e caracterização térmica de CNFs. As fibras do bagaço de cana-de-açúcar foram branqueada pelo método TCF (com alvura de 91,11 % ISSO e a viscosidade de 718 dm³/kg) e passaram processo mecânico de desfibrilação no moinho *Super Masscolloider Masuko Sangyo* (5 passes) para obtenção das celuloses nanofibriladas. O rendimento encontrado foi em torno de 90 %. A caracterização morfológica de CNF foi formada devido ao entrelaçamento dessas nanofibrilas. Apresentou uma estrutura heterogênea e desorganizada, com maior exposição das fibras devido ao tratamento mecânico. A celulose nanofibrilada possui seu comprimento alongado 350 nanométrico e seu diâmetro na escala 11 a 16 nanométrica. A avaliação da medida de potencial elétrico superficial mostrou um valor médio (-26,2 mV). A análise de difração de raios X e análise térmica revelaram que NCFs possui cristalinidade (64,3 %) e a temperatura inicial de degradação celulose nanofibriladas foi (240 °C), provavelmente devido à estrutura amorfo. AS CNFs sintetizados têm um elevado potencial de aplicação como reforço em bionanocompósitos para diversas áreas (fabricação de papel, aditivos de revestimentos, papéis de segurança e embalagens de alimentos) e gerando valor agregado em aplicações industriais.

Palavras chaves: nanocelulose, celulose nanofibrilada, bagaço de cana-de-açúcar.

Synthesis and Characterization of nanofibrillated Cellulose (CNF) extracted from sugar cane bagasse (*Saccharum officinarum* L.).

ABSTRACT

This study aimed to synthesize and characterize nanofibrillated cellulose (CNFs) extracted from sugar cane bagasse fiber. The techniques used for the characterization of the CNFs were scanning electron microscopy, Transmission electronic microscopy, atomic strength microscopy, zeta potential, elementary analysis (Fourier in infrared -FTIR), X-Ray Diffraction and thermal characterization of CNFs. The fibers of the sugar cane bagasse were whitened using the TCF method (with whiteness of 91.11 % ISSO and viscosity of 718 dm³/kg) and went through disfribilation mechanical process in the *Super Masscolloider Masuko Sangyo Mill* (5 passes) for the obtainment of the nanofibrilada cellulose. There was a yield of about 90 %. The CNFs morphological characterization was formed due to the interlacing of the nanofibrillated, presenting a heterogeneous and disorganized structure, with a bigger exposition of the fibers due to the mechanical treatment. The nanofibrillated cellulose has its elongated length of 350 nanometers and its diameter in the scale of 11 to 16 nanometers. The assessment of the superficial electric potential measure showed an average value of -26,2 mV. The X-Ray diffraction analysis and the thermal analysis revealed that CNFs have crystallinity of 64.3 % and the initial temperature of nanofibrilada cellulose degradation was of 240 °C, probably due to the amorphous structure. The synthesized CNFs have elevated application potential as reinforcement in biocomposite in several areas (paper manufacture, coating additive, safe papers and food packages) which generates aggregated value in industrial applications.

Key Words: nanocellulose, nanofibrilada cellulose, sugar cane bagasse

1-INTRODUÇÃO

Nos últimos anos tem aumentado o número de pesquisadores interessados em estudar a viabilidade de utilização dos recursos naturais renováveis nas mais diversas áreas.

A busca crescente por tecnologias e produtos que proporcionem menor impacto ambiental tem motivado o interesse no estudo e aplicação de matérias primas biodegradáveis e renováveis (AZEREDO *et al.*, 2016). Faz-se necessário, portanto, desenvolver novos materiais capazes de substituir aqueles já existentes por produtos de menor impacto ambiental e com propriedades semelhantes àsquelas dos materiais já utilizados atualmente (ALEMDAR & SAIM, 2008; CHERIAN *et al.*, 2011).

Dentre esses materiais naturais a celulose destaca-se como um material renovável, biodegradável, de baixo custo, mostrando ainda excelentes propriedades físico-mecânicas (VIANA,2013 ;XIÃO *et al.* 2016 and ROSAZLEY *et al.*, 2016).

A nanocelulose pode ser obtida de diversas maneiras, tais como por hidrólise ácida e por síntese bacteriana. No entanto, estes processos são dispendiosos e têm baixo rendimento (TUZZIN *et al.*, 2016). Recentemente, os processos mecânicos de extração da nanocelulose de madeiras e resíduos de celulose industrial vêm ganhando destaque por serem processos que, na maioria das vezes, não exigem que a matéria-prima seja previamente tratada, o que reduz os custos com insumos (JONOOBI *et al.*, 2015; ROSAZLEY *et al.*, 2016).

As celulose nanofibriladas (CNF) são originadas da desintegração das fibras celulósicas, sobretudo de suas superfícies, promovendo o rompimento da parede celular e a posterior exposição das fibrilas e microfibrilas anteriormente situadas no interior das fibras (TURBAK *et al.*, 1983, citados por SYVERUD *et al.*, 2011). As fibrilas elementares que originam a celulose nanofibrilada compõem agregados de fibrilas elementares, que em conjunto formam as microfibrilas (CHINGA-CARRASCO, 2011; GUIMARÃES JUNIOR *et al.*,2015).

Nesse contexto, materiais em tamanho nanométrico, como celulose nanofibradas, podem ser uma alternativa viável devido a suas propriedades

mecânicas e alta cristalinidade, além de serem provenientes de fontes naturais e renováveis (KAUSHIK *et al.*, 2010; CHERIAN *et al.*, 2011).

Diante da necessidade de produtos mais sustentáveis, as celuloses nanofibradas, materiais lignocelulosicos podem ser uma alternativa para o desenvolvimento de novos materiais a serem utilizados em diferentes aplicações (DAMASIO, 2015; KILZILTAS *et al.*, 2016)).

A CNF têm grande potencial de emprego na fabricação de diversos produtos, por exemplo, muitas aplicações em nanocompósitos, fabricação de papel, papéis de segurança e embalagens de alimentos (BELBEKHOUCHE *et al.*, 2011).

Surge grande expectativa na busca por adaptar as fibras vegetais, tais como o resíduo do bagaço da cana-de-açúcar, para nanoreforço em várias indústrias. Sendo assim, objetivou-se isolar e caracterizar celulose nanofibrilada extraídos da fibra do bagaço de cana-de-açúcar.

2. Materiais e Métodos

2.1. Matéria- prima

Neste estudo foi utilizada polpa *Kraft* o bagaço da cana-de açúcar fornecida por uma empresa agroindustrial do ramo de açúcar e álcool proveniente da safra de (2014/2015).

O branqueamento da polpa kraft do bagaço da cana-de-açúcar foi realizada no Laboratório de Celulose e Papel no Departamento de Engenharia Florestal da Universidade Federal de Viçosa. A polpa passou por um branqueamento pelo método **TCF** (Totally Chlorine Free), é uma tecnologia de branqueamento onde não se utiliza qualquer reagente à base de cloro (MOREIRA, 2010). Este branqueamento foi dividido em quatro estágios:

A pré-deslignificação com oxigênio (O) consistiu em uma posterior deslignificação da polpa após o cozimento (Tabela.2). Ocorreu uma degradação e dissolução da lignina, durante o branqueamento com oxigênio, ocorreu através de reações das estruturas fenólicas livres na lignina.

O segundo estágio de quelação (Q) foram utilizados em processos de branqueamento TCF, visando principalmente a remoção de metais da polpa(Tabela.2).

Os dois últimos estágios com peróxido pressurizado (PO) e peróxido (P95 °C) teve como objetivo branquear a polpa através da reação química do peróxido de hidrogênio sobre a lignina residual (Tabela.2).

Tabela 2- Etapas do branqueamento pelo método **TCF** (Totally Chlorine Free) da polpa Kraft do bagaço de cana-de-açúcar

Condições	Estágios do Branqueamento TCF			
	O	Q	(PO)	P(95 °C)
Consistência (%)	12	3,5	10	10
Tempo (min)	38	30	120	120
Temperatura (°C)	100	35		-
	-			
Pressão (Kpa)	400	-	750	-
HCl (Kg/odt)	-	1,3	-	-
NaOH (Kg/odt)	15	-	5	9
H ₂ O ₂ (Kg/t)	-	-	40	18
O ₂ (Kg/t)	30	-	10	-
Na ₂ SiO ₂	-	-	12	10
O ₂ (Kg/odt)				
MgSO ₄ 7 H ₂ O (Kg/odt)	1	-	1	1
DTPA (Kg/odt)	-	2,5		-
	-			

Pré-designificação com oxigênio (O), quelação (Q), peróxido pressurizado (PO) e peróxido (P95 °C)

2.2.Preparação das nanofibriladas

No laboratório de Polpa e Papel da Universidade Federal do Paraná (UFPR) as amostras de polpa celulósica branqueada pelo método **TCF** foram dispersas em água destilada utilizando um liquidificador, durante o tempo de cinco minutos, para obtenção de uma suspensão de fibras homogeneizadas.

As polpas branqueadas pelo método **TCF** formaram uma suspensão juntamente com água destilada na concentração 2 % base massa seca (IWAMOTO *et al.*, 2008), seguiram para o processo mecânico de desfibrilação no moinho *Super Masscolloider Masuko Sangyo* (MKCA6-3; Masuko Sangyo Co., Ltd.) (Figura .1).



Fonte: Viana (2013).

Figura 1 - Moinho Super Masscolloider Masuko Sangyo

O moinho desfibrilador *Super Masscolloider Masuko Sangyo* consiste em duas pedras de desfibrilação com um diâmetro de 150 mm, sendo a pedra inferior rotatória e a superior estacionária. A região periférica da pedra é bastante plana e a parte interior cônica apresentando sulcos (Figura 2).



Fonte: Viana (2013).

Figura 2- Pedra com sulcos

O ajuste das pedras de desfibrilação por meio da distância entre elas permite o controle do tamanho das partículas produzidas. A aproximação das pedras foi feita com o equipamento desligado e sem a suspensão de fibras. Contudo é importante ressaltar que quando o moinho desfibrilador for ligado, com as pedras próximas, que este esteja carregado de material. A presença da suspensão celulósica no moinho desfibrilador permite a—lubrificação das pedras evitando desta forma o chamado—vazio de moagem que pode causar o desgaste das mesmas podendo resultar numa futura contaminação do material.

A separação das microfibrilas da parede das fibras ocorre no moinho desfibrilador por meio de um processo mecânico de compressão e forças de cisalhamento geradas quando a polpa passa através da abertura entre as pedras. A distância entre os discos foi ajustada em cerca de 0,1 mm (NAKAGAITO e YANO, 2005; STELTE e SANADI, 2009).

Além da regulação das distâncias entre as mós, o moinho desfibrilador também permite o controle da frequência que pode ser de até 3000 rpm. Nesta pesquisa adotou a frequência de 1500 rpm conforme sugerido por outros autores (IWAMOTO *et al.*, 2008; IFUKU *et al.*, 2009; IFUKU *et al.*, 2010). Após 5 passes pelo moinho desfibrilador a suspensão celulósica transforma-se numa suspensão estabilizada (Figura.3), adquirindo aspecto de gel conforme observado por Besbes *et al.* (2011).



Figura 3- Celulose nanofibrilada a partir da polpa organossolve do bagaço de cana-de-açúcar branqueada (aspecto de gel)

2.3.1 Tamanho médio da nanofibrilada e potencial zeta (ζ)

No laboratório de Embalagens (Labem) da Universidade Federal de Viçosa (UFV) o gel da celulose nanofibrilada extraídas da fibra do bagaço da

cana-de-açúcar por processo mecânico foram diluídas em água desionizada conforme procedimento descrito por Silva (2015) e analisadas quanto ao seu tamanho médio e medida de potencial elétrico superficial (potencial zeta) com auxílio de um Zetasizer Malvern NanoZS. As análises foram realizadas a temperatura ambiente de 25 °C, usando ângulo de detecção de 173°, operando em comprimento de onda de 633 nm. Estes dados foram coletados em triplicata (DAMASIO, 2015).

Para estimar o rendimento do processo mecânico foi utilizada a equação:

$$Rend (\%) = mf / mi \times 100 \quad (eq. 1)$$

Onde *mi* representa a massa inicial de FBC branqueada pelo método TCF utilizada no processo mecânico e *mf* representa a massa celulósica obtida na secagem do gel nanocelulósicos, ambas com relação ao processo mecânico.

2.3.2 Espectroscopia na região de infravermelho

As análises de espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) foram realizadas com a celulose nanofibriladas liofilizadas com auxílio de um espectrômetro FT-IR Nicolet 6700 (Thermo Scientific, EUA). As amostras de celulose nanofibriladas extraídas do bagaço da cana-de-açúcar foram preparadas segundo Damasio (2015). Os espectros de absorção na região do infravermelho foram obtidos em ampla região de varredura de 4000 cm⁻¹ a 400 cm⁻¹, com resolução de 2 cm⁻¹. Onde foram observadas as modificações químicas da superfície das nanofibriladas.

2.3.4 Análise Termogravimétrica (TGA)

As curvas termogravimétricas foram obtidas por meio de analisador termogravimétrico (modelo 60, Shimadzu, Japão) com programa de temperatura de 25 a 600 °C, taxa de aquecimento de 10 °C·min⁻¹ e vazão de 60 mL·min⁻¹, sob atmosfera de nitrogênio (SILVA, 2015). A análise termogravimétrica possibilitou avaliar a estabilidade térmica e a temperatura de decomposição da amostra da celulose nanofibrilada. Todas as análises foram realizadas com três repetições com duplicatas.

2.3.5 Difractometria de Raios-X (DR-X)

As celulosas nanofibriladas (liofilizadas) foram caracterizadas por difração de raio-X, a fim de avaliar o índice de cristalinidade da celulose (I_c), seguindo procedimentos descritos na literatura (BROWNING, 1967; FENGEL; WEGENER, 1989).

A técnica empregada para o cálculo do índice de cristalinidade das celulosas nanofibriladas foi a difração de raio-X. Essa técnica utiliza o espalhamento da radiação X através de estruturas organizadas (cristais), o que permite realizar estudos morfológicos em materiais, determinando sua estrutura e sua fração cristalina (BAUMHARDT NETO, 2007). As análises de difração de raio-X foram realizadas à temperatura ambiente em difratômetro X-ray Diffraction System modelo X Pert PRO (PANalytical), utilizando filtro de Ni e radiação $\text{Co-K}\alpha$ ($\lambda = 1,78890 \text{ \AA}$), variação angular de 5 a 50° (2θ), velocidade de $3^\circ/\text{min}$, tensão de 40kV e corrente de 30 mA.

Para o cálculo do I_c utilizou-se o software Origin 8.0 (ORIGINLAB, 2007), de acordo com o método de Segal et al. (1959), por meio da relação entre os picos de intensidade máxima ($2\theta = 26,15^\circ$) e mínima ($2\theta = 18^\circ$) de difração, após correção da linha base.

2.3.6 Microscopia de força atômica (MFA)

As medições em microscópio de força atômica das amostras celulose nanofibriladas estudadas foram realizadas no Departamento de Física da Universidade Federal de Viçosa-MG, Brasil. As topografias da CNF foram estudadas usando microscopia de força atômica (AFM, NT-MDT, Rússia). As imagens de AFM foram adquiridas em um modo contato intermitente em áreas aleatórias de $5 \times 5 \text{ }\mu\text{m}^2$ (DAMÁSIO, 2015). As amostras de celulose nanofibriladas foram analisadas à temperatura ambiente (25°C).

2.3.7 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As fotomicrografias da superfície das nanofibriladas foram realizadas com auxílio de Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV / LEO – Modelo 1430VP,

Inglaterra) com aumento de 1000 X. Foram feitas no Núcleo de Microscopia e Microanálise do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Viçosa.

A microscopia eletrônica de varredura foi realizada para avaliar os diferentes tipos de estruturas formadas na superfície das celulose nanofibriladas. Foram preparadas amostras de 0,5 cm² de cada amostra. Em seguida, foram fixadas em stubs e cobertas com uma camada de ouro (entre 20 nm e 30 nm) com auxílio de um metalizador Sputter Coater (Balzers - Modelo SCD 010), para aumentar a condutividade da superfície das amostras (SILVA, 2015).

2.3.8 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

A observação da estrutura da celulose nanofibrilada foi realizada em microscópio eletrônico de transmissão modelo Zeiss EM 109 a 80 kV, no Núcleo de Microscopia e Microanálise (NMM) da Universidade Federal de Viçosa (UFV).

Em grids de cobre de 300 mesh recobertos com Formvar (0,5 % em clorofórmio), foi depositada uma gota da suspensão. A solução de acetato de uranila 2 %, utilizada como contraste, foi gotejada sobre o material para facilitar a observação das estruturas (SILVA,2015).

3. Resultados e discussão

3.1 Branqueamentos TCF (Totally Chlorine Free)

O branqueamento é um tratamento químico que visa melhorar as propriedades de alvura, opacidade e clareza da polpa (MOREIRA,2010). A alvura inicial da polpa kraft do bagaço de cana-de-açúcar foi de 49,99 % de ISSO e uma viscosidade de 970 dm³/kg após passar pelos quatro estágios de branqueamento TCF a alvura final foi de alvura de 91,11 % ISSO e a viscosidade de 718 dm³/kg. Observa-se que a fibra branqueada pelo método TCF adquiriu um elevado grau de alvura o que é reflexo da modificação da sua composição química.

3.2 Tamanho médio de celulose nanofibrilada e potencial zeta (ζ)

As fibras do bagaço de cana-de-açúcar foram branqueadas pelo método TCF e passaram por processo mecânico de desfibrilação no moinho *Super Masscolloider Masuko Sangyo* (5 passes) para obtenção das nanofibriladas. O rendimento encontrado foi em torno de 90 %.

O tamanho médio encontrado na celulose nanofibriladas extraídos do bagaço de cana-de-açúcar analisados com auxílio de um Zetasizer Malvern NanoZS foi de 11,93 nanômetros. Silva (2015) avaliou em seu estudo celulose nanofibrilada extraída de polpa de algodão onde o diâmetro ficou 104,15 nm.

A avaliação da medida de potencial elétrico superficial mostrou um valor médio (-26,20 mV). Como esse valor, em módulo, é acima de 25 mV, pode-se considerar que essa suspensão seja estável (MIRHOSSEINI *et al.*, 2008; ZHOU *et al.*, 2012; TEIXEIRA *et al.*, 2010) com não tendência a flocular (MIRHOSSEINI *et al.*, 2008). Damásio (2015) encontrou na sua CNF de origem de um mix de madeiras de coníferas o valor do potencial Zeta de -26,86 mV valor bem similar a este estudo. Silva (2015) relatou no seu estudo que a sua CNF extraída de fibra de kraft de madeira teve o valor do potencial zeta de -30,1 mv com alta capacidade de dispersão na água.

Lu *et al.* (2014) reportam que elevados valores de potencial zeta indicam alta capacidade de dispersão na água, enquanto valores mais baixos desse parâmetro indicam baixa estabilidade dessa dispersão.

3.3 Espectroscopia na região de infravermelho

A Figura 4, mostra os espectros de FTIR da celulose nanofibrilada. Os espectros avaliados são bastante similares, uma vez que se trata de materiais originados de um mesmo polímero-base. No entanto existem algumas regiões que podem ser diferenciadas, devido aos diferentes processos de obtenção. A banda larga em 3.671 cm^{-1} corresponde à vibração das ligações dos grupos –OH. Em 2.970 cm^{-1} tem-se a vibração das ligações dos grupos C-H. Essas bandas são características de materiais celulósicos e seus valores são consistentes com os encontrados por Lu *et al.* (2014), Liu *et al.* (2014) e Reddy *et al.* (2009), Damásio (2015).

A banda encontrada em 1.788 cm^{-1} para a CNF representa o estiramento de ligações dos grupamentos de ácidos carboxílicos, C=O e C-O. Outros estudos relatam que essa banda foi muito evidente para a nanofibrilada (DAMASIO, 2015).

A vibração axial da ligação O-H da celulose e da água absorvida foi encontrada na banda de 3345 cm^{-1} , o resultado foi similar ao encontrado por ROMANZINI *et al.*, 2012. A banda de 2970 cm^{-1} representa o estiramento da ligação C-H da celulose (JIANG *et al.*, 2013; JONOOBI *et al.*, 2011).

A banda de 1690 cm^{-1} é a deformação da ligação O-H da água absorvida (JONOOBI *et al.*, 2011), a outra banda que também evidencia é 1426 cm^{-1} que é deformação da ligação simétrica dos grupos CH_2 da celulose, os resultados similares foram reportados por CHEN *et al.*, 2011 e GUIMARÃES JUNIOR *et al.*, 2015.

O espectro de 814 cm^{-1} representa a Ligações β -glicosídicas entre os monossacarídeos da celulose, resultado foi muito similar ao encontrado por JIANG *et al.*, 2013.

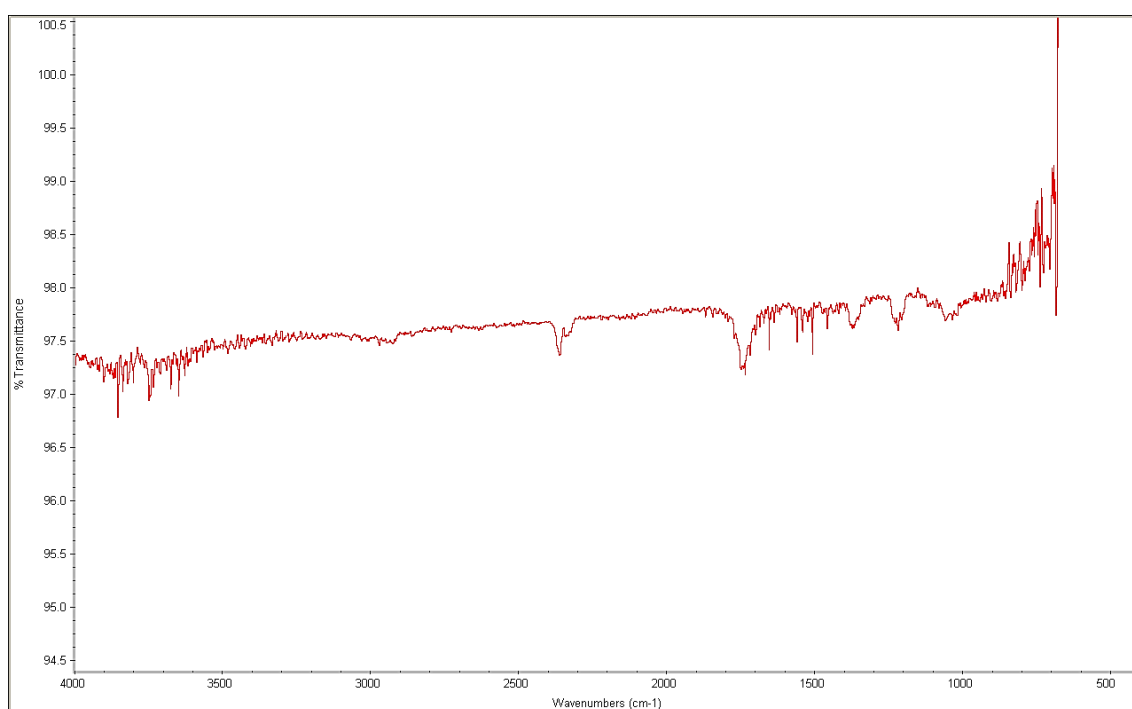


Figura 4- Espectros da região infravermelho (FTIR) da celulose nanofibrilada (CNF)

3.4 Análise Termogravimétrica (TGA)

A temperatura inicial de degradação celulose nanofibrilada foi (240 °C), provavelmente devido à estrutura amorfa. Damasio (2015) obteve o resultado similar a este valor para sua CNF. Além disso, a presença de hemiceluloses na composição orgânica da CNF faz com que as temperaturas iniciais de degradação sejam mais baixas (NETO *et al.*, 2013) quando comparada com outras nanoceluloses sintetizadas por outros métodos, como por exemplo os nanocristais de celulosos.

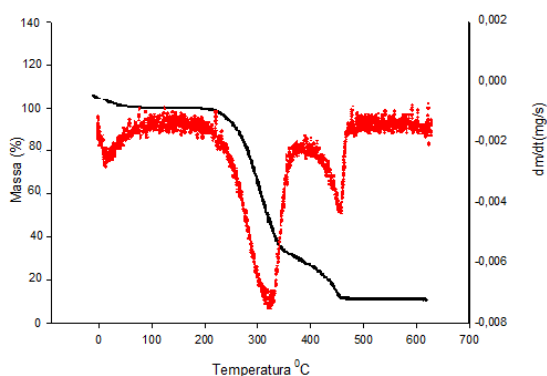


Figura 5- Curvas do comportamento de degradação térmica TGA das celulose nanofibriladas (CNF)

Observam-se três principais eventos de perda de massa na Figura 5. O primeiro evento, com máxima taxa de degradação em 94 °C e perda de massa de 5,9 % está relacionado com a evaporação da água presente nas fibras. O segundo evento, com *onset* em 317 °C e máxima taxa de degradação em 341 °C (tabela.1), segundo De Rosa *et al.* (2011) e Peng *et al.* (2013), pode ser atribuído a dois mecanismos de degradação: primeiramente, a desidratação da celulose causada por um processo endotérmico e, em seguida, a despolimerização térmica da celulose. No último evento de perda de massa, observado a partir de 444 °C, segundo Ashori *et al.* (2014), ocorre a decomposição térmica da celulose em monômeros de D-glucopirranose, que podem ainda se decompor em radicais livres.

Tabela 1 - Análise termogravimétrica da celulose nanofibriladas extraídas da fibra Kraft do bagaço de cana-de- açúcar

Amostra	Primeiro evento	Segundo evento		Terceiro evento	
Tmax (°C)	Perda de massa % (m/m)	Tmax (°C)	Tmax (°C)	Perda de massa % (m/m)	Massa residual % (m/m)
NCF	5,9	94	341	64,28	12,3

De acordo com a Tabela 1, a celulose nanofibrilada apresenta maior percentual de massa residual quando comparada com outros materiais celulósicos. O mesmo comportamento foi encontrado por Peng *et al.* (2013) ao compararem a celulose microcristalina e as CNFs obtidas por secagem supercrítica. Os autores encontraram valores de massa residual para a celulose microcristalina de 5,4 (%m/m) e de 11,5 % (%m/m) para a CNF obtida por secagem supercrítica.

A Tmax é crítica para a aplicação da nanocelulose em compósitos, pois é um indicativo da estabilidade térmica do material (KAUSHIK e SINGH, 2011; PENG *et al.*, 2013). Conforme a Tabela 1, as celulosas nanofibrilada extraída do bagaço de cana-de-açúcar possuem Tmax de 341 °C. O mesmo comportamento foi encontrado por Peng *et al.* (2013). A celulose, quando seca ao ar, forma uma camada sólida na superfície. Durante a degradação térmica, forma-se um filme compacto de cinzas que age como uma proteção para as fibrilas localizadas nas regiões mais internas. Dessa forma, a degradação térmica dessas fibrilas é reduzida. Contudo, na CNF obtida por secagem supercrítica, as fibrilas não permanecem aglomeradas e a degradação é facilitada, justificando assim a menor Tmax (PENG *et al.*, 2013).

3.5 Difratometria de Raios-X (DR-X)

A Figura 6, mostra os difratogramas de raio-X referente à nanocelulose caracterizada neste estudo. O respectivo índice de cristalinidade foi calculada a partir do difratograma. Como esperado, o índice de cristalinidade (IC) da CNF apresentou presença de regiões amorfas na estrutura das fibrilas elementares formadoras da celulose nanonofibrilada. O valor do índice de cristalinidade da CNF foi 64.4 % de acordo com a metodologia utilizada para seu cálculo após a deconvolução das curvas (Figura 6). Este IC foi considerado baixo, uma possível

explicação encontrada foi a de que processos de fibrilação mecânica quebram tanto a região cristalina quanto a região amorfa da celulose, resultando na redução da cristalinidade.

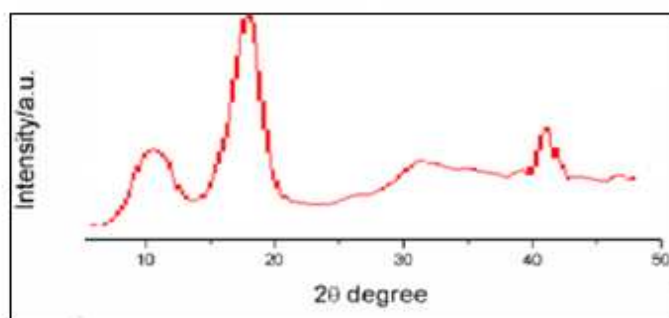


Figura 6. Difratomogramas de raio-X da celulose nanofibrilada(CNF)

Segundo Lavoratti (2015), os valores do índice de cristalinidade diminuíram após a passarem pelo moinho de 83,5 % para 78,3 % na celulose nanofibrilada de *Eucalyptus sp.* e de 74,7 % para 72,8 % na celulose nanofibrilada de *Pinus*. Viana (2013) relatou no seu estudo que um fator determinante para IC são os números de passes no moinho, quanto menor o números passes maior IC.

Pressupõe-se que materiais com maiores índices de cristalinidade são mais resistentes à degradação térmica, o que contribuiria para diversificar a aplicação dos nanocristais de celulose. Esta hipótese é baseada em trabalhos que comprovam que as regiões amorfas da celulose são mais suscetíveis à ação do calor e possuem menor estabilidade térmica, quando comparadas às regiões cristalinas (MAJOR, 1958; CHATTERJEE e CONRAD, 1966; BASCH e LEWIN, 1973; BROIDO *et al.*, 1973; KIM *et al.*, 2010).

Há duas possíveis explicações para esse fenômeno: uma delas é o fato de a celulose nanofibrilada possuir regiões amorfas que, ao contrário da celulose cristalina, não foram atacadas pelo processo químico (CORREA *et al.*, 2010; LAVOINE *et al.*, 2012). A outra é a de que as nanofibradas podem ser danificadas ao passarem pelo processo de nanofibrilação. Iwamoto *et al.* (2007) estudaram o efeito do número de passes em um moinho micronizador na cristalinidade das nanofibras de celulose obtidas e observaram que a cristalinidade diminui consideravelmente com apenas um passe, evidenciando a degradação das nanofibras obtidas.

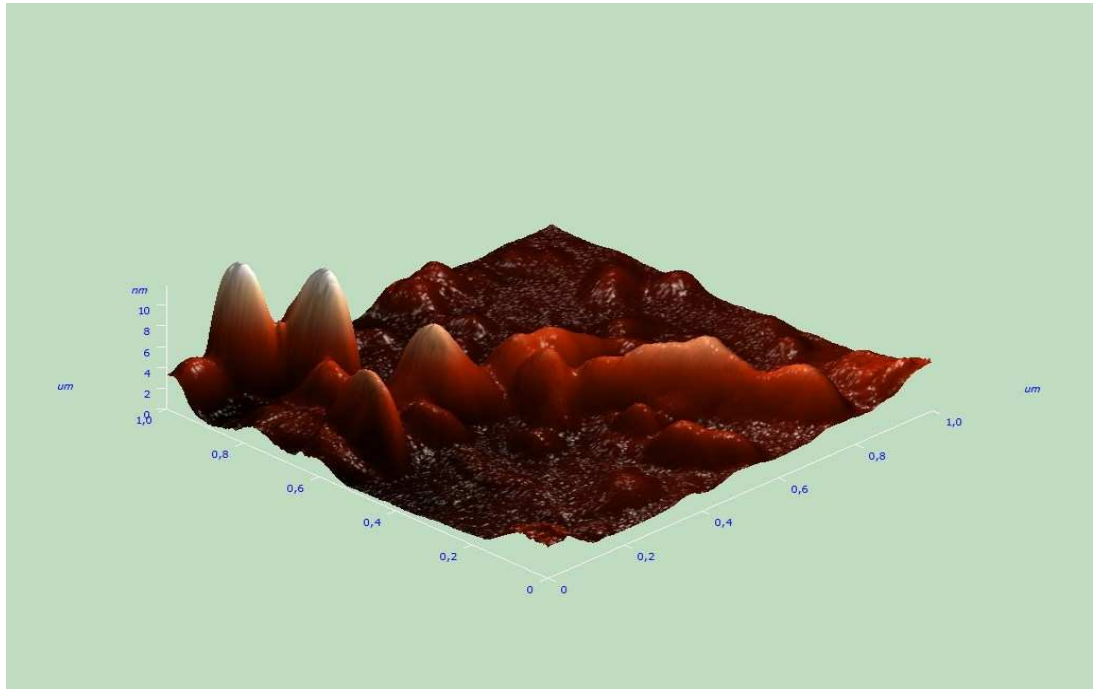
Qing *et al.* (2013) submeteram a polpa de *Eucalyptus* aos processos de micronização e microfluidização e a cristalinidade obtida para a polpa foi de 55 %. Após a micronização, esse valor foi reduzido para 47 %, e diminuiu ainda mais para a polpa micronizada e posteriormente microfluidizada, atingindo um índice de cristalinidade de 44 %. A explicação encontrada pelos autores foi a de que processos de fibrilação mecânica quebram tanto a região cristalina quanto a região amorfa da celulose, resultando na redução da cristalinidade (QING *et al.*, 2013). Dessa forma, possivelmente tenha ocorrido a degradação de parte das estruturas cristalinas e amorfas da celulose durante o processo de mecânico, uma vez que essa estrutura se mostra sensível aos métodos de fibrilação mecânica (LENGOWSKI *et al.*, 2013).

3.6 Microscopia de força atômica (MFA)

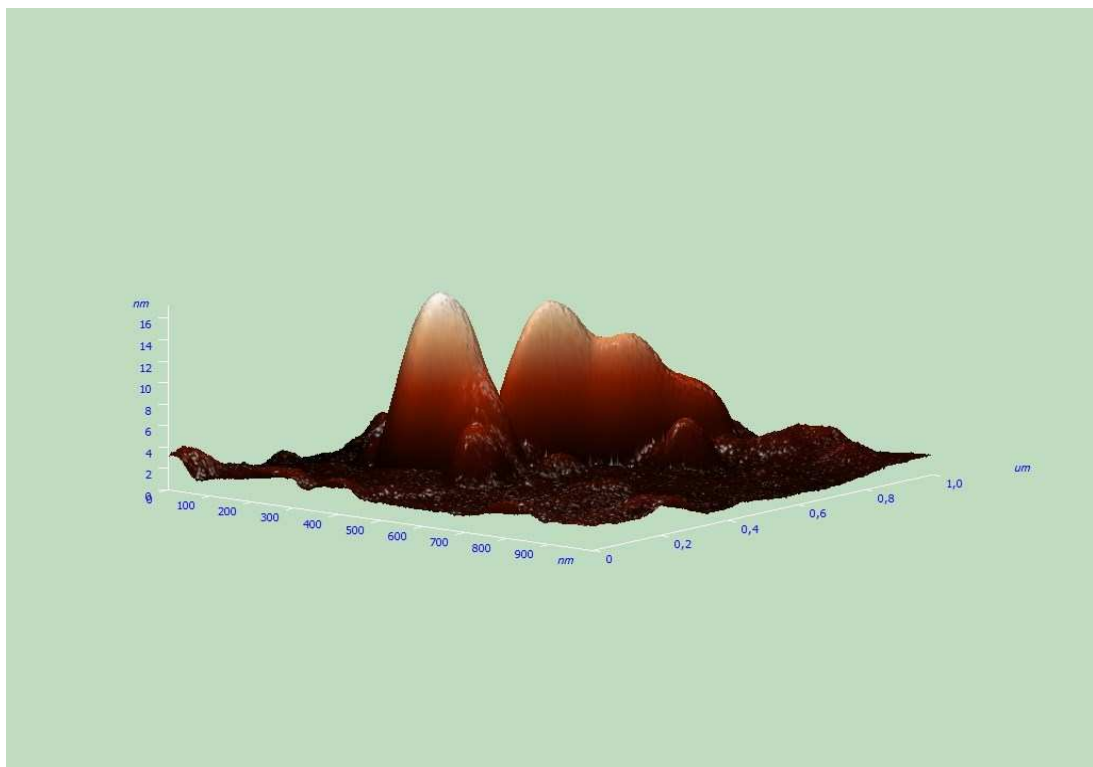
A microscopia de força atômica permite a observação física da topografia exata dessas nanoestruturas. À medida que ocorreu a varredura na frequência de oscilação da ponta, vales e picos foram desenhados em função da morfologia das nanoceluloses estudadas.

A celulose nanofibrilada (CNF) (Figura 7E e 7F) apresentou como uma nanorede. Essa rede de CNF é formada devido ao entrelaçamento dessas nanofibrilas, uma vez que seus sítios ativos de ligação estão expostos. A celulose nanofibrilada possui seu comprimento alongado 350 nanométrico (Figura 4C e 4D) e seu diâmetro na escala 11 a 16 nanométrica (Figura 7A e 7B). Kumar *et al.* (2014), ao isolarem nanofibrilas de celulose de bagaço de cana, madeira de folhosas e coníferas, encontraram diâmetros de 12 a 75 nm, 16 a 80 nm e 21 a 97 nm, respectivamente. Essa grande diferença é devido principalmente aos processos de isolamento utilizados e à natureza das fibras vegetais empregadas.

Segundo Klemm *et al.* (2011), a CNF pode apresentar diâmetro entre 5 e 60 nm e seu comprimento varia na escala micrométrica. A celulose nanofibrilada apresenta regiões amorfas e cristalinas que compõem sua cadeia mais alongada no sentido longitudinal. A utilização das imagens de MFA permitiu o mapeamento topográfico 3D do material estudado (Figura 7A e 7B).

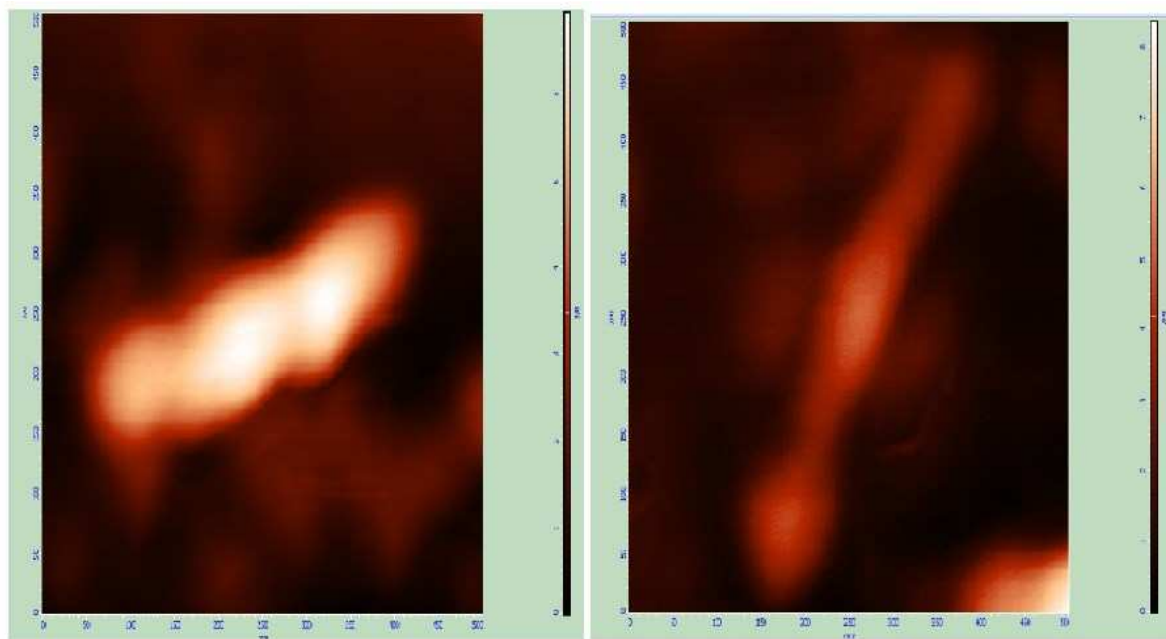


A



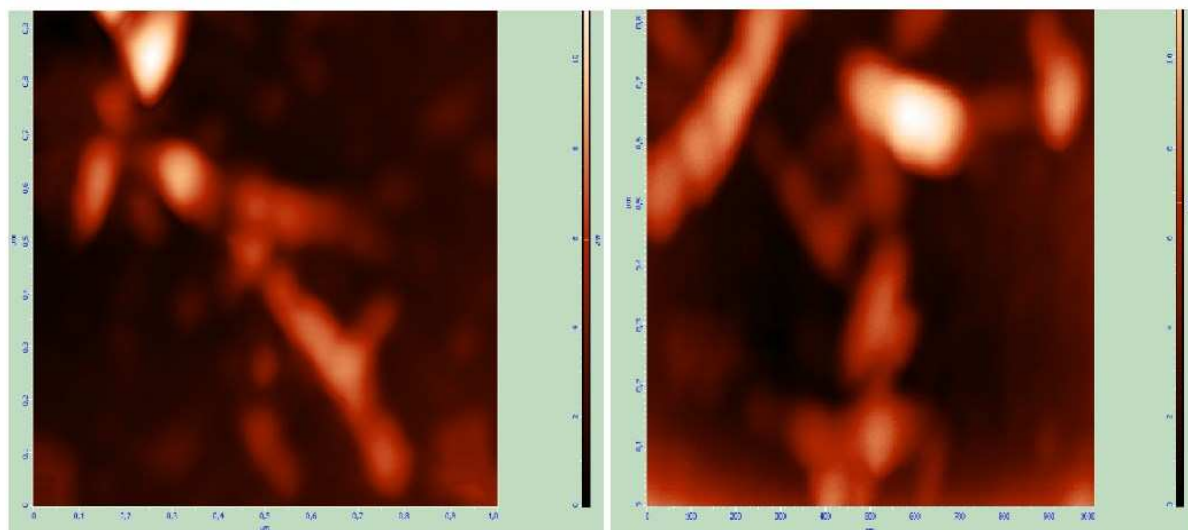
B

Figura 7- Imagens de MFA de CNF, micrografia de força atômica varredura no modo de contato intermitente. 7A) e 7B) Imagem 3D da superfície da celulose nanofibrilada



C

D



E

F

Figura 7- Imagens de MFA de CNF, micrografia de força atômica varredura no modo de contato intermitente. 7C) e 7D) Varredura de $1 \times 1 \text{ } \mu\text{m}^2$ (detalhe de um celulose nanofibriladal) em 6D) e 6F) Varredura geral da área de $5 \times 5 \text{ } \mu\text{m}^2$.

As nanofibras naturais têm um módulo de elasticidade muito elevado, se comparado ao do aço, o que é particularmente relevante para diversas indústrias (DUFRESNE, 2008). Logo, o conhecimento de sua estrutura física e morfológica é importante para definir suas aplicações e o modo mais adequado de sua utilização.

3.7 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As imagens de MEV permitiu observar que a celulose nanofibrilada (CNF) tem a capacidade de formação uma rede com as fibrilas (Figura 8). Apresentou uma estrutura heterogênea e desorganizada, com maior exposição das fibrilas devido ao tratamento mecânico.

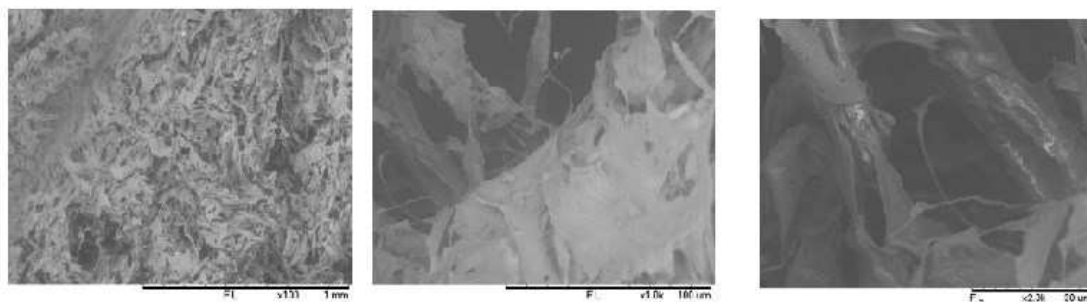


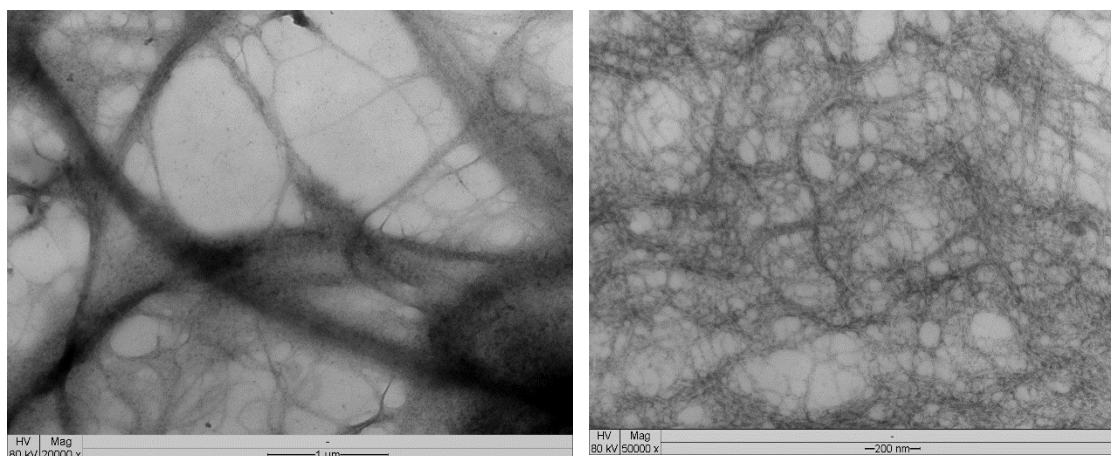
Figura 8. Micrografia de MEV aumento de 1000x -Celulose nanofibrilada extraída do bagaço de cana de açúcar.

A partir das micrografias, observou-se que a celulose nanofibrilada não é homogênea, haja visto que os feixes das nanofibras e fibras que não foram fibriladas. Isso ocorre devido a existência dos grupos hidroxilas, que reagem e causam aglomeração das fibras (PLACKETT *et al.*, 2010).

3.8 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

As Figuras 9.A e 9.B apresentam imagens obtidas por Microscopia Eletrônica de Transmissão, referentes às celulose nanofibriladas.

Ao observar a celulose nanofibrilada nas imagens de MET é possível constatar, por meio da técnica de contraste utilizada, que sua nanoestrutura apresenta-se rede de fibras (Figura 9A), sendo uma de suas dimensões o diâmetro na escala de nanômetros e seu comprimento na escala de micrômetros (Figura 9B).



9.A

9.B

Figura 9 - Imagens de MET: A) CNF aumento de 20.000x – 1 µm; B) CNF aumento de 50.000x – 200 nm

O processo de desfibrilação mecânica resultou na fibrilação da parede celular das fibras produzindo nanofibrilas, como é possível perceber nas Figuras 9.A e 9.B pelo diâmetro das mesmas. Como já citado por alguns autores, as nanoestruturas são elementos que apresentam pelo menos uma de suas dimensões menores que 100 nm (STELTE e SANADI, 2009; QUA e HORNSBY, 2011).

A CNF possui regiões cristalinas e amorfas e sua morfologia se assemelha a uma rede de fibras. Por isso, sua razão de aspecto é geralmente alta, devido ao diâmetro reduzido e ao maior comprimento das fibras, na ordem micrométrica. Devido tanto a essa característica quanto a sua morfologia, a CNF consegue formar uma rede de fibras muito rígida (LAVOINE *et al.*, 2012).

Damasio (2015) e Silva (2015) relataram no seus estudos que a celulose nanofibrilada tinha morfologia de rede de fibra entrelaçadas, a mesma morfologia encontrada neste estudo .

De acordo com Zimmermann *et al.* (2010), há inúmeros grupamentos hidroxílicos expostos ao longo de toda a cadeia da celulose nanofibrilada, portanto inúmeras ligações de hidrogênio e aproximações físicas podem ser realizadas de modo a conferir o aspecto de teia observado nas imagens (Figura 9.B).

Segundo Pääkkö *et al.* (2007), o comprimento das cadeias de celulose nanofibrilada é vários micrômetros maior que o dos nanocristais de celulose, potencializando grandes zonas de redes de fibrilação que garantem inúmeras

ligações de hidrogênio a essas nanofibras, como mencionado anteriormente. Assim, de acordo com Dufresne *et al.* (1997), a adição desses nanomateriais permite a formação de nanorredes como fator de grande importância para a alta eficiência de reforço.

4. Conclusão

A partir deste estudo foi possível o isolamento e a caracterização da celulose nanofibrilada extraída por processo mecânico a partir do bagaço de cana-de-açúcar. O método utilizado para produção de celulose nanofibrilada apresentou um rendimento de 90 %. A celulose nanofibrilada sintetizada e caracterizada encontra-se tamanho nanométrico e têm grande potencial como nanoreforço em bionanocompósitos para diversas áreas e um valor agregado em aplicações industriais, devido ao tamanho nanométrico e a estabilidade térmica encontrado neste estudo.

5. Referências Bibliográficas

ALEMDAR, A.; SAIN, M. Isolation and characterization of nanofibers from agricultural residues – Wheat straw and soy hulls. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 1664-1671, 2008.

ASHORI, A.; BABAEE, M.; JONOBI, M.; HAMZEH, Y. Solvent-free acetylation of cellulose nanofibers for improving compatibility and dispersion. **Carbohydrate Polymers**, v. 102, p. 369-375, 2014.

AZEREDO M.C. MORSYLEIDE F. ROSA, LUIZ HENRIQUE C. MATTOSO Nanocellulose in bio-based food packaging applications Industrial. **Crops and Products**, 2016.

BASCH, A.; LEWIN, M. The influence of fine structure on the pyrolysis of cellulose I: Vacuum pyrolysis., **Journal of Polymer Science and Polymer Chemistry**, v.11, p. 3071-3093, 1973.

BESBES, I.; VILAR, M.R.; BOUFIA, S. Nanofibrillated cellulose from Alfa, Eucalyptus and Pine fibres: Preparation, characteristics and reinforcing potential. **Carbohydrate Polymers**, v. 86, p. 1198-1206, 2011.

BELBEKHOUCHE, S.; BRAS, J.; SIQUEIRA, G.; CHAPPEY, C.; LEBRUN, L.; KHELIFI, B.; MARAIS, S.; DUFRESNE, A. Water sorption behavior and gas barrier properties of cellulose whiskers and microfibrils films. **Carbohydrate Polymer**, v. 83, p. 1740–1748, 2011.

BROWNING, B. L. Methods of Wood Chemistry. New York: **Interscience Publishers**, v. 2, p. 385-823 (1967).

CHATTERJEE, P.K.; CONRAD, C.M. Kinetics of the pyrolysis of cotton cellulose. **Textile Research**, v.36, p.487-494, 1966.

CHINGA-CARRASCO, G., Cellulose fibres, nanofibrils and microfibrils: The morphological sequence of MFC components from a plant physiology and fibre technology point of view. **Nanoscale research letters** 6, 417 (2011)

CHEN, W.; YU, H.; LIU, Y.; CHEN, P.; ZHANG, M.; HAI, Y. Individualization of cellulose nanofibers from wood using high-intensity ultrasonication combined with chemical pretreatments. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, p. 1804-1811, 2011.

CHERIAN, A. B.; VARGHESE, L. A.; THACHIL, E. T. Epoxy-modified unsaturated polyester hybrid networks. **European Polymer Journal**, v. 43, p. 1460-1469, 2007.

DAMASIO, R. **Caracterização E Aplicações De Celuloses Nanofibrilada (Cnf) E Nanocristalina (Cnc)**. Dissertation, M.Sc. Viçosa/Brazil. (2015).

DE ROSA, I.M.; KENNY, J.M.; MANIRUZZAMAN, M.; MONIRUZZAMAN, M.; MONTI, M.; PUGLIA, D.; SANTULLI, C.; SARASINI, F. Effect of chemical treatments on the mechanical and thermal behaviour of okra (*Abelmoschus esculentus*) fibres. **Composites Science and Technology**, v. 71, p. 246-254, 2011.

DUFRESNE, A. Polysaccharide nano crystal reinforced nanocomposites. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 86, p. 484–494, 2008.

DUFRESNE, A. Processing of polymer nanocomposites reinforced with polysaccharide nanocrystals. **Macromolecules**, v. 15, p. 4111–4128, 2010.

DUFRESNE, A. Nanocellulose: a new ageless bionanomaterial. **Materials Today**, v. 16, p. 220-227, 2013.

FENGEL, D.; WEGENER, G. WOOD: chemistry, ultrastructure, reactions. New York: Gruyter, 613 p. (1989).

GUIMARÃES JUNIOR, M.; BOTARO, V. R.; NOVACK, K. M.; FLAUZINO NETO, W. P.; MENDES, L. M.; TONOLI, G. H. D. Preparation of cellulose nanofibrils from bamboo pulp by mechanical defibrillation for their applications in biodegradable composites. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v.15, p.6751- 6768, 2015.

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

JONOOBI, M.; MATHEW, A.P.; OKSMAN, K. Producing low-cost cellulose nanofiber from sludge as new source of raw materials. **Industrial Crops and Products**, v. 40, p. 232– 238, 2012.

JONOOBI, M., OLADI, R., DAVOUDPOUR, Y., OKSMAN, K., DUFRESNE, A., Hamzeh, Y., Davoodi, R., 2015. Different preparation methods and properties of nanostructured cellulose from various natural resources and residues: a review. **Cellulose** 22, 935–969, 2015.

PÄÄKKÖ et al., Enzymatic Hydrolysis Combined with Mechanical Shearing and High- Pressure Homogenization for Nanoscale Cellulose Fibrils and Strong Gels. **Biomacromolecules**, v. 8, n. 6, p. 1934-1941, 2007.

PENG, Y.; GARDNER, D.J.; HAN, Y.; KIZILTAS, A.; CAI, Z.; TSHABALALA, M.A. Influence of drying method on the material properties of nanocellulose I: thermostability and crystallinity. **Cellulose**, v. 20, p. 2379-2392, 2013.

QING, Y.; SABO, R.; ZHU, J.Y.; AGARWAL, U.; CAI, Z.; WU, Y. A comparative study of cellulose nanofibrils disintegrated via multiple processing approaches. **Carbohydrate Polymers**, v. 97, p. 226-234, 2013.

KAUSHIK, A.; SINGH, M.; VERMA, G. Green nanocomposites based on thermoplastic starch and steam exploded cellulose nanofibrils from wheat straw. **Carbohydrate Polymers**, v. 82, p. 337-345, 2010.

KAUSHIK, A.; SINGH, M. Isolation and characterization of cellulose nanofibrils from wheat straw using steam explosion coupled with high shear homogenization. **Carbohydrate Research**, v. 346, p. 76-85, 2011.

KIZILTAS, A., NAZARI, BERBAS KIZILTAS, E., GARDNER, D. J., HAN, Y., and RUSHING, T. S. "Cellulose NANOFIBER-polyethylene nanocomposites modified by polyvinyl alcohol," **Journal of Applied Polymer Science**, vol. 133, no. 6, 2016.

KLEMM, D.; KRAMER, F.; MORITZ, S.; LINDSTRÖM, T.; ANKERFORS, M.; GRAY, D.; DORRIS, A. Nanocelluloses: A New Family of Nature-Based Materials. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 50, p. 5438-5466, 2011.

KUMAR, A.; SINGH, S. P.; SINGH, A. K. Preparation and characterization of cellulose nanofibers from bleached pulp using a mechanical treatment method. **Tappi Journal**, v. 13, n. 5, p. 25-31, 2014

LAVOINE, N.; DESLOGES, I.; DUFRESNE, A.; BRAS, J. Microfibrillated cellulose – Its barrier properties and applications in cellulosic materials: A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 90, p. 735-764, 2012.

LAVORATTI, A. **Desenvolvimento e caracterização de compósitos poliméricos poliéster/nanocelulose**. – Dissertação (Mestrado) – Universidade

de Caxias do Sul, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos e Tecnologias, 2015.

LENGOWSKI, E.C.; MUNIZ, G.I.B.; NISGOSKI, S.; MAGALHÃES, W.L.E. Avaliação de métodos de obtenção de celulose com diferentes graus de cristalinidade. **Scientia Forestalis**, v. 41, p. 185-194, 2013.

MAJOR, W.D. The degradation of cellulose in oxygen and nitrogen at high temperatures, **TAPPI** , v.41, p.530-537, 1958.

MIRHOSSEINI, CHIN Ping, H , TAN , A, A , NAZIMAH S.A. HAMID , SALMAH Yu, Boo HUEY C. Influence of pectin and CMC on physical stability, turbidity loss rate, cloudiness and flavor release of orange beverage emulsion during storage, **Carbohydrate Polymers** 73 ,83–91, 2008

MOREIRA, F, K, V. **Desenvolvimento de nanocompósitos poliméricos biodegradáveis a partir de pectina, amido e nanofibras de celulose.** Dissertação apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais. São Carlos , UFSCar, 2010.

NAKAGAITO, A.N.; FUJIMURA, A.; SAKAI, T.; HAMA, Y.; YANO, H. 2009. Production of microfibrillated cellulose (MFC)-reinforced polylactic acid (PLA) nanocomposites from sheets obtained by a papermaking-like process. **Compos Sci Technol** 69:1293–7, 2009.

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

NEVES, A. L. P. **Preparação e caracterização de nanopartículas de quitosana incorporadas com zinco com potencial atividade cicatrizante e antimicrobiana.** 2013. 150 f. Tese (Doutor em Engenharia Química) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2013.

SIRÓ and PLACKETT. Microfibrillated cellulose and new nanocomposite materials: A review. **Cellulose**, 17(3), 459–494 ,2010.

SILVA, J.C. **BIOREFINERY OF LIGNOCELLULOSIC MATERIALS: NOVEL PRODUCTS, METHODS AND APPLICATIONS OF FOREST AND AGRICULTURAL FEEDSTOCKS .** Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, 2015.

STELTE, W.; SANADI, A.R. Preparation and Characterization of Cellulose Nanofibers from Two Commercial Hardwood and Softwood Pulps. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 48, p. 11211-11219, 2009.

SYVERUD, K.; CARRASCO, G.C.; TOLEDO, J.; TOLEDO, P.G. A comparative study of Eucalyptus and Pinus radiata pulp fibres as raw materials for production of cellulose nanofibrils. **Carbohydrate Polymers**, v. 84 p. 1033–1038, 2011.

TEIXEIRA, E. M.; CORRÊA, A. C.; MANZOLI, A.; LEITE, F. L.; OLIVEIRA, C. R.; MATTOSO, L. H. C. Cellulose nanofibers from white and naturally colored cotton fibers. **Cellulose**, v. 17, p. 595–606, 2010.

ROSAZLEY, R., IZZATI, M. A., FAREEZAL, A. W., SHAZANA, M. Z., RUSHDAN, I., AINUN ZURIYATI, M. A.. Production and Characterization of Nanofibrillated Cellulose from Kenaf Core (*Hibiscus cannabinus*) via Ultrasonic. World Academy of Science, **Engineering and Technology International Journal of Chemical and Molecular Engineering** Vol:3, No:2, 2016.

REDDY, D. H. K., RAMANA, D. K. V., SESHIAH, K., REDDY, A. V. R. Biosorption of Ni(II) from aqueous phase by *Moringa oleifera* bark, a low cost biosorbent. **Desalination**, 268(1-3): 150-157, 2011.

TUZZIN, G., GODINHO, M., DETTMER, A., ZATTERA, A. J. Nanofibrillated cellulose from tobacco industry wastes. **Carbohydr Polym.** 2016.

VIANA, L. C. **Desenvolvimento de filmes celulósicos nanoestruturados a partir da madeira de *Pinus* sp.** Dissertação (Mestrado), Universidade Federal do Paraná, Curitiba-PR, 2013.

XIAO, S., GAO, R., GAO, L., LI, J. Poly (vinyl alcohol) films reinforced with nanofibrillated cellulose (NFC) isolated from corn husk by high intensity ultrasonication. **Carbohydr Polym.** 2016.

ZIMMERMANN, T.; BORDEANU, N.; STRUB, E. Properties of nanofibrillated cellulose from different raw materials and its reinforcement potential. **Carbohydrate Polymers**, v. 79, 2010.

CAPÍTULO 4

**Desenvolvimento e aplicação dos nanocristais de celulose extraídos do
bagaço da cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) embalagem ativa
biodegradável**

Desenvolvimento e aplicação dos nanocristais de celulose extraídos do bagaço da cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) embalagem ativa biodegradável

RESUMO

A utilização de substâncias ativas e de nanoceluloses são alternativas interessantes para preservação de alimentos e melhoria das características físicas das embalagens. Diante disso, foram estudados os efeitos do teor de nanocristais de celulose (CNC) e nisina z (NIS) sobre as propriedades térmicas e mecânicas, no filme de pectina cítrica (PEC) produzido pelo método *casting*. Os resultados obtidos mostraram que os filmes de pectina (PEC) com nisina z (NIS) inibiram o crescimento das bactérias avaliadas, enquanto a adição de 1, 45 % e 10 % (m/m) de NIS na matriz do PEC foi capaz de inibir tanto o crescimento da *E.coli* quanto o do *S. aureus*. A espessura dos filmes de pectina foi influenciada pela adição do antimicrobiano e dos nanocristais de celulose, quando avaliados separadamente, o filme que obteve maior espessura foi com concentração de 10 % de nisina z. As curvas de degradação termogravimétricas foram similares, uma vez que os filmes de pectina adicionados com nanocristais de celulose e nisina z variou (260 °C a 290 °C) este valor vai depender da concentração de nanocristais adicionados aos filmes. O alongamento na ruptura não obteve diferença significativa na interação, mas foi afetado quando avaliado a presença de CNC e NIS separadamente. O alongamento na ruptura reduziu a adição das concentrações máximas de NIS e CNC e, conseqüentemente, houve aumentos do módulo de elasticidade, tornando os filmes mais rígidos e mais fortes. A resistência máxima à tração do filme foi afetada pelos níveis de CNC (8,55 % e 10 %) estudados, no entanto, quanto maior concentração de nisina (8,55 %) e CNC maior foi a resistência máxima à tração do filme. O módulo de elasticidade obteve diferença significativa na interação, mas foi pouco afetado com adição de CNC e NIS. A taxa de permeabilidade do vapor de água foi influenciada por uma maior concentração de nanocristais de celulose (10 %) nos filmes de pectina ocorreu um aumento significativo da taxa de permeabilidade ao vapor d'água (TPVA), mostrando que os nanocristais de celulose em alta concentração não funcionaram como uma barreira para impedir a passagem de

gases. Os espectros do infravermelho (FTIR) dos filmes de pectina (4000 - 500 cm região) mostraram uma semelhança química para todos os filmes do desenho experimental possivelmente devido às concentrações dos tratamentos.

Palavras-chave: nanocelulose, nanocristais de celulose, pectina e nisina z.

Development and application of cellulose nanocrystals extracted from sugarcane bagasse (*Saccharum officinarum* L.) biodegradable active packaging

ABSTRACT

The usage of active substances and nanocellulose are interesting alternatives for food preservation and improvement of package physical characteristics. Accordingly, the content effects of cellulose nanocrystals (CNC) and nisin z (NIS) over the thermal and mechanical properties on the citric pectin film (PEC) produced by the *casting* method were studied. The obtained results showed that the pectin (PEC) films with nisin z (NIS) inhibited the growth of the assessed bacteria, whereas the addition of 1, 45 and 10 % (m/m) of NIS in the PEC matrix was able to inhibit not only the growth of *E. coli* but also the growth of *S. aureus*. The thermogravimetric degradation curves were quite similar, once the pectin films added with nanocrystals and nisin had a degradation initial temperature ranging from 260 °C to 290 °C. This value will depend on the concentration of the nanocrystals added to the films. The elongation at break did not obtain significant difference in the interaction, but it was affected when the presence of CNC and NIS was assessed separately. When NIS and CNC were analyzed separately regarding their maximum concentration values the the elongation at break had lower values. When the two factors were combined in their minimum and maximum concentrations there was a decrease in the value of the elongation at break. For intermediate concentrations of NIS and CNC, the value of elongation had the best results. The elongation at break reduced with the addition of the maximum concentrations of NIS and CNC and, consequently, there was an increase in the elasticity module, making the films stronger and more rigid. The maximum resistance to film traction was affected by the studied levels of CNC (8.55 % and 10 %). However, the bigger the nisin concentration (8.55 %) and CNC, the bigger was the maximum resistance to traction. The elasticity module obtained significant difference in the interaction, but it was little affected by the addition of CNC and NIS. The water steam permeability rate was influenced by a bigger concentration of cellulose nanocrystals (10 %). In the pectin films there was a significant increase in the water steam permeability rate (TPVA), showing that the cellulose nanocrystals in high concentration do not work as a barrier to prevent the passage of gases. The FTIR spectra of the pectin films

(4000 - 500 cm region) showed a chemical similarity for all the films of the experimental drawing probably due to the treatments concentrations.

Key Words: nanocellulose, cellulose nanocrystals, pectin and nisin z.

1.Introdução

Nos últimos anos, os consumidores estão cada vez mais preocupados com a qualidade e segurança alimentar dos alimentos, buscando por produtos nutritivos, mais próximos ao natural, convenientes, com maior vida de prateleira e que não ofereçam riscos à saúde. Desta forma, as embalagens ativas têm atraído muito a atenção das indústrias de alimentos e pesquisadores desta área como uma forma de estender a vida de prateleira e de garantir a segurança dos alimentos (RHIM, 2013).

Dentro do âmbito da conservação de alimentos, a aplicação de peptídeos antimicrobianos de bactérias lácticas em embalagens de alimentos para produção de filmes bioativos têm recebido grande atenção. A nisina tem sido cada vez mais utilizada como bioconservante para incorporação direta em filmes ativos de forma eficaz contribuindo para o aumento da vida de prateleira dos alimentos (KHAN et al., 2015).

Além da preocupação com a qualidade dos alimentos, tem-se preocupado também com as questões ambientais, pois o aumento do uso de embalagens plásticas traz uma série de preocupações quanto à contaminação ambiental, devido ao acúmulo de resíduos. Surge o interesse pela produção de embalagens a partir de materiais biodegradáveis e de recursos renováveis. No entanto, o seu uso como embalagem de alimentos ainda é restrito devido às limitações quanto as suas propriedades mecânicas e de barreira e estabilidade térmica.

Devido às características dos plásticos e ao fato do petróleo ser um mineral não renovável, tem se tornado cada vez mais necessária à produção de polímeros biodegradáveis de origem animal, microbiana e vegetal. A pectina de origem vegetal é muito utilizada na área de alimentos com espessantes e gelificantes, outra alternativa para seu uso é constituição de filmes quando solubilizado água devido a sua capacidade filmogênica (CHOJNICKA-PASZUN et al., 2014).

As embalagens biodegradáveis, obtidas a partir de fontes renováveis, como os polímeros de origem vegetal, constituem opções adicionais ao gerenciamento de resíduos, além disso, a degradabilidade destes materiais que, após seu uso, permitam sua permanência no ciclo natural do carbono.

O Brasil é um país caracterizado pela economia agroindustrial e um dos maiores produtores mundiais de cana-de-açúcar (UNICA,2016). Assim, surge grande expectativa na busca por adaptar as fibras vegetais como o resíduo do bagaço da cana-de-açúcar no uso como reforço em matrizes poliméricas, biopolímeros ou blendas poliméricas. No entanto, fatores relacionados à compatibilidade das fibras com as matrizes poliméricas e com mecanismos para diminuir sua hidrofobicidade devem ser investigados, a fim desta tecnologia ser efetivamente aplicada na fabricação de nanocompósito de baixo custo, biodegradáveis e resistente à umidade.

O objetivo geral deste trabalho foi o desenvolvimento de filmes ativos biodegradáveis com nanocristais de celulose extraídos do bagaço da cana-de-açúcar para o uso em embalagem ativa para alimentos.

2. Material e Métodos

Os filmes foram produzidos no laboratório de Embalagem do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa, Brasil.

2.1. Avaliação da atividade antimicrobiana da Nisina Z

As análises microbiológicas foram realizadas no Laboratório de Embalagens. Todos tratamentos foram realizados com três repetição e em duplicata

2.1.1 Micro-organismos

Culturas puras *Escherichia coli* (ATCC 11229), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) foram usadas para testar a atividade antimicrobiana “*in vitro*” das nisina z.

2.2 Delineamento Experimental

Foi utilizado o delineamento composto central rotacional (DCCR) com duas variáveis para estudar os efeitos combinados da nanocelulose como o nanocristais de celulose (CNC) extraído do bagaço de cana-de-açúcar e nisina z (NIS) sobre as propriedades mecânicas dos filmes de pectina (PEC) e avaliado pela Metodologia de Superfície de Resposta (MSR). O modelo estatístico que representa a influência do CNC e NIS sobre as propriedades mecânicas do filme foi desenvolvido e validado através da análise de variância (ANOVA).

Para melhores resultados no modelo de regressão, utilizou-se o procedimento de exclusão de variáveis “(stepwise)” a partir da análise da estatística t das variáveis, conforme realizado por Li (2012). Neste procedimento, todas as variáveis são incluídas no modelo e vão sendo retiradas uma a uma, em função da contribuição significativa dada pela análise da significância da estatística t. A técnica consiste em eliminar as variáveis não significativas, que correspondem àquelas que apresentam o menor valor da estatística t, em valor absoluto, por se tratar das variáveis de menor importância (HAIR Jr *et al.*, 2009).

Para as variáveis significativas, procedeu-se a análise de correlação para quantificar o grau de correlação com a variável resposta. As análises de microscopia de força atômica foram validadas a rugosidade dos filmes por uma análise de variância (ANOVA) com testes de médias Tukey. Análise termogravimétrica e infravermelho foram submetidos à análise descritiva.

2.3. Produção do filme a base de pectina

Os filmes de pectina foram produzidos pelo método “*casting*”, de acordo com Azevedo (2014) com modificações. As concentrações de nanocristais de celulose (CNC) e nisina z (Handary) foram adicionadas nos filmes de pectina e foram determinadas a partir dos resultados obtidos nos testes difusão em ágar o nanocristal de celulose (CNC) e a nisina z foram incorporados em relação à massa do polímero.

Os filmes pectina (PEC) foram desenvolvidos segundo Azevedo 2014 com modificações, sendo pectina cítrica de baixa metoxilação (Vetec) e glicerol P.a (Isopor) fixados em 6 % (m/v) e 40 % (m/v), respectivamente, baseado em pré-testes. O filme PEC foi preparado dissolvendo-se 3,5 g (m/v) de pectina com 1,4 g de glicerol (GLI) (baseado na massa de PEC) em 120 mL de água desionizada respectivamente, sendo ambos submetidos à agitação contínua em agitador magnético com 2000 rpm durante 30 min, em temperatura de 75 °C. Os demais filmes foram desenvolvidos conforme filme PEC, variando o CNC liofilizado (0 e 10 g/100 g de PEC) e Nisina z (0 e 10 g/100 g de PEC) dispersos com glicerol. Após agitação e dissolução da solução filmogênica, as soluções foram vertidas em placas de vidro. O controle de espessura foi efetuado por volume aplicado no suporte, correspondente a 120 mL. Em seguida, os filmes com dimensões 18 x 30 cm, foram secos em temperatura 30 °C durante 48 h e umidade relativa de 37 % garantindo evaporação lenta do solvente e formação do filme. Os tratamentos estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Tratamentos dos filmes de pectina incorporados com nanocristais de celulose (CNC) e nisina z (NIS).

Tratamentos	Concentrações* (%)
1	CNC1,45 NIS1,45
2	CNC 10,00 NIS5,00
3	CNC 5,00 NIS10,00
4	CNC 5,00 NIS5,00
5	CNC 1,45 NIS1,45
6	CNC 8,55 NIS8,55
7	CNC 5,00 NIS5,00
8	CNC 8,55 NIS1,45
9	CNC 5,00 NIS10,00
10	CNC 5,00 NIS5,00
11	CNC 0,00 NIS5,00

Nanocristais de celulose (CNC) e nisina z (NIS).

2.3.1 Atividade antimicrobiana “in vitro” dos filmes

Para avaliar a atividade antimicrobiana do filme ativo foi aplicado o método de difusão em ágar segundo Hanusová *et al.* (2010) modificado, colocando-se discos ($\varnothing = 1$ cm) do filme ativo incorporado com a nisina z e nanocristal de celulose nas concentrações citados dos item 2.3 (essas concentrações foi em relação a massa do polímero) sobre a superfície do plate count agar –PCA (Merck) contendo suspensão micro-organismos na concentração (10^5 UFC/mL) citados no item 2.1.1. Em seguida, o inóculo foi espalhado sobre a superfície do ágar com auxílio de alça de drigalsky. Posteriormente, as placas foram incubadas a 35 °C por 24 horas. A atividade inibidora foi quantificada por medição (paquímetro) do diâmetro total (diâmetro do disco mais zona de inibição

2.4 Caracterizações do filme de pectina produzido incorporado com nanocristais de celulose e nisina z.

2.4.1 Espessura

A espessura média dos filmes (μm) foi mensurada com auxílio de micrômetro (MITUTOYO, modelo 547-401, Japão). As medidas foram realizadas

em dois corpos de prova de cada tratamento em três repetições, realizando-se as medidas em dez pontos aleatórios e diferentes dos mesmos (CAMILLOTO, 2009).

2.4.2 Caracterização morfológica e topográfica dos filmes

A) Microscopia de força atômica

A microtopografia e a rugosidade da superfície dos diferentes filmes foram avaliadas utilizando-se o Microscópio de Força Atômica (NT-MDT modelo NTEGRA PRIMA) realizada no Departamento de Física da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa - MG, Brasil.

Amostras dos filmes foram cortadas e fixadas no suporte de porta amostras do microscópio, com auxílio de fita dupla-face. Em seguida, cada amostra foi analisada utilizando o modo de contato intermitente com cantilever macio e constante de força $0,02 \text{ N}\cdot\text{m}^{-1}$. Para cada tratamento, foram realizadas varreduras de $60 \mu\text{m} \times 60 \mu\text{m}$, onde foram determinados a rugosidade média e a rugosidade quadrática dos filmes (CAMILLOTO, 2009).

B) Propriedades mecânicas

Os filmes produzidos foram submetidos a testes mecânicos para avaliação da resistência máxima à tração (MPa), alongamento na ruptura (%) e módulo elástico (MPa) de acordo com a norma ASTM D882-91 (ASTM, 2002), utilizando-se a Máquina Universal de Testes Mecânicos (INSTRON Corporation, modelo 3367). Foram testados 5 corpos de prova de cada tratamento com cinco repetições no ponto central, com dimensões de 10 cm de comprimento e 2,5 cm de largura. A máquina foi operada com carga de 1 kN, velocidade de separação das garras de $12,5 \text{ mm}\cdot\text{min}^{-1}$ e distância inicial de 50 mm (ASTM, 2002).

C) Propriedades de barreira ao vapor de água

A Taxa de permeabilidade a vapor d'água (TPVA) dos filmes foram determinadas por meio do método dessecante, seguindo a ASTM E 96/ E 96M

–05 (ASTM, 2005) com algumas modificações. Foram utilizadas cápsulas circulares ($\varnothing = 82,3 \text{ mm}$) com paredes impermeáveis, contendo 30 g de cloreto de cálcio anidro (Vetec) com granulometria entre $600 \mu\text{m}$ e $2,36 \mu\text{m}$. Os filmes foram vedados com parafina histológica (Synth) na junção filme/cápsula. As cápsulas foram acondicionadas em dessecadores contendo solução saturada de cloreto de sódio (Vetec), com o objetivo de manter a umidade relativa em torno de 75 %. O ganho de massa associando a umidade permeada pelo filme foi avaliado por meio de pesagens diárias até massa constante.

A TPVA foi expressa em $\text{g}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{dia}^{-1}$. As análises foram realizadas com três repetições em duplicata.

D) Termogravimétrica (TGA)

As análises termogravimétricas foram realizadas com auxílio de um analisador térmico DTG (modelo 60, Shimadzu - Japão), onde cerca de 5 a 10 mg de amostra de filme de pectina contendo nanocristal de celulose e nisina foram aquecidos na faixa de temperatura de 20°C a 600°C com razão de aquecimento de $10^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ para cada tratamento. A vazão de nitrogênio será mantida em $60 \text{ cm}^3\cdot\text{min}^{-1}$ (CHANG *et al.*, 2010). As análises foram realizadas em duplicata.

E) Espectroscopia de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).

A espectroscopia de absorção na região do infravermelho foi realizada com o objetivo de identificar as interações entre a matriz polimérica (pectina), os nanocristais de celulose e nisina adicionados. Os filmes de pectina com nanocristais de celulose e nisina foram fixados no equipamento FT-IR Nicolet 6700 (Thermo Scientific, EUA) pelo suporte para filmes. Os espectros de absorção na região do infravermelho foram obtidos em ampla região de varredura de 4000 a 400 cm^{-1} , com resolução de 2 cm^{-1} (DAMASIO, 2015).

3. Resultados e Discussão

3.1 Avaliação da atividade antimicrobiana dos filmes adicionado com nisina z.

Os resultados obtidos mostraram que os filmes de pectina (PEC) com nisina z (NIS) inibiram o crescimento das bactérias avaliadas, enquanto a adição de 1,45 % e 10 % (m/m) de nisina z na matriz de filme de pectina foram capazes de inibir tanto o crescimento de *E.coli* quanto o do *S. aureus*, produzindo uma zona de inibição clara em torno do filme, mostrando difusão da nisina z para o meio sólido de forma significativa ($p < 0,05$) sendo que adição de 10 % nisina z proporcionou maior inibição (Tabela 2, Figura 1 e Figura 2).

Tabela 2. Estimativas dos coeficientes de DCCR, na avaliação da atividade antimicrobiana dos filmes de pectina com concentrações de nisina z (1,45 %; 5 %; 8,55 % e 10 %) e nanocristais de celulose (0 %; 1,45 %; 5 %; 8,55 % e 10 %).

Variável	Equação	R ²	FAJ ^b
<i>E. coli</i>	$1,60^* + 0,0136^* \text{CNC} + 0,0738 \text{NIS}^* - 0,0078^* \text{NIS}^2$	45,96%	0,290
<i>S. aureus</i>	$2,857^* - 0,257^* \text{CNC} + 0,0029^* \text{NIS} - 0,0185^* \text{CNC}^2$	30,59%	0,306

^a Foi utilizado o modelo Quadrático Completo e os coeficientes não apresentados na equação foram não significativos ($p > 0,05$).

* Significativo pelo teste t de Student ($P < 0,05$)

^b FAJ: Valor-P para a falta de ajuste do modelo

De acordo com a literatura a nisina z apresentou propriedade antimicrobiana, especialmente, contra bactérias gram-positivas, tais como *Staphylococcus aureus* (BREWER et al, 2002; LOPEZPEDEMONTE et al., 2003; SOBRINO-LOPEZ E MARTIN-BELLOSO, 2006), e pouca ou nenhuma atividade contra bactérias gram negativas como *E.coli*.

Devido ao seu efeito sobre as bactérias gram-positivas, especialmente a *S. aureus*, muitos estudos reportaram a incorporação de nisina z em vários tipos de filmes feitos de celulose, náilon, isolado protéico de soro, hidroxipropil metil celulose, zeína, amido, quitosana, PBAT, proteína de soja, carboximetil celulose e a sua utilização como embalagem ativa para reduzir as bactérias indesejáveis nos gêneros alimentícios (NATRAJAN e SHELDON, 2000; COMA et al.,

2001;TEERAKARN *et al.*, 2002; CHOLLET *et al.*, 2008;. GADANG *et al.*, 2008; KRISTO *et al.*, 2008; NEETOO *et al.*, 2008; NGUYEN *et al.*, 2008; BASTARRACHEA *et al.*, 2010, CAO-HOANG *et al.*, 2010; IMRAN *et al.* 2010, BASCH *et al.*, 2013).

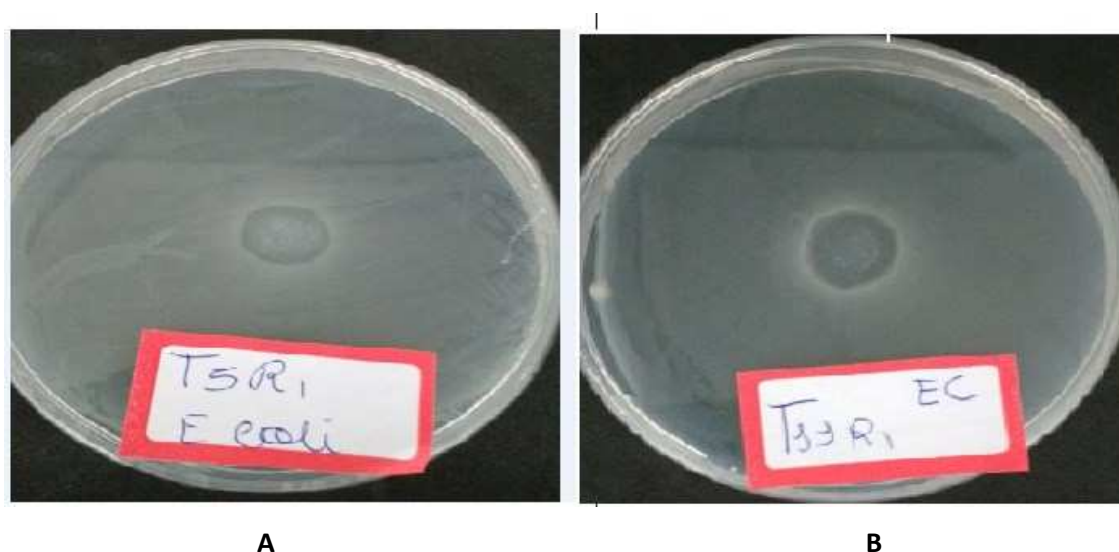


Figura 1. Teste de difusão em ágar dos filmes de pectina incorporado com nanocristais de celulose (CNC) e nisina z (NIS) para o micro-organismos *Escherichia coli* (ATCC 11229). A) Tratamento 5 (1,45 % de CNC 1,45 % NIS); B) Tratamento 11 (0 % CNC 5 % NIS).

Na figura 1, observou-se uma região onde obteve o maior halo de inibição (>1,7 cm), isso corresponde as menores concentrações de nisina (1,45 % a 5 %) dos tratamentos T5 e T11, a essas concentrações que foram mais efetivas na ação de inibição do micro-organismo *E. Coli*. Um outro fator que pode ser relatado que ação inibidora da nisina z não foi tão eficaz para este micro-organismos que é gram-negativo e a difusão do antimicrobiano também foi prejudicada pela dispersão dos nanocristais de celulose. Enquanto o filme tinha maior concentração do antimicrobiano nisina z não houve inibição do micro-organismo (Figura.2). Segundo Khan *et al.*(2015), encontraram resultado bem similar para a inibição do micro-organismo *E. coli*, em concentrações mais baixas foram mais efetivas a ação do antimicrobiano neste micro-organismo.

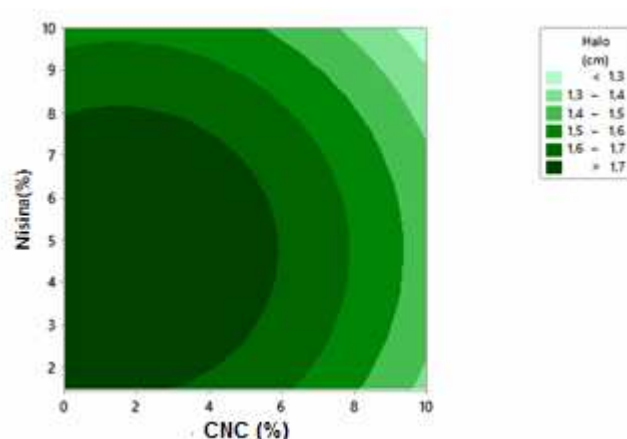
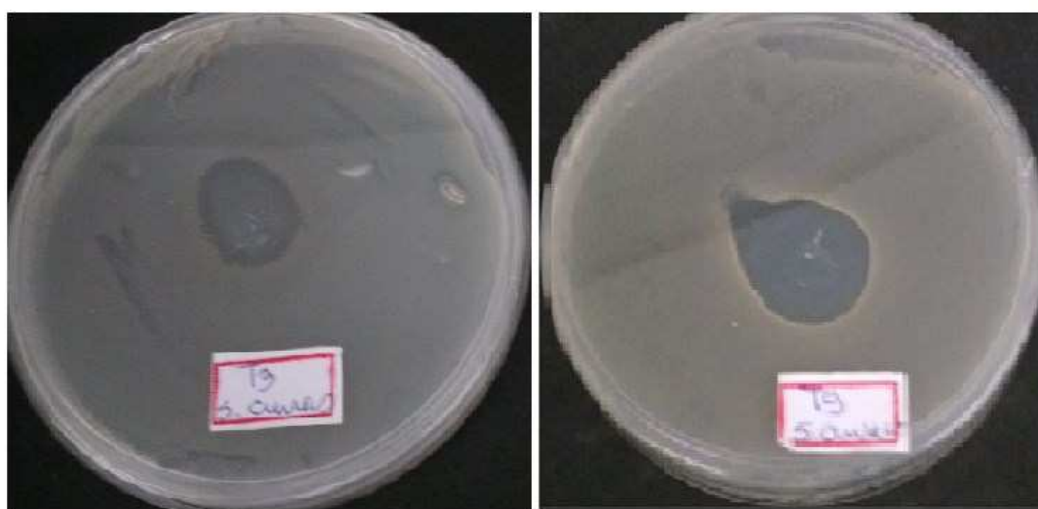


Figura 2. Atividade antimicrobiana dos filmes de pectina incorporados com nanocristais de celulose (CNC) e nisina z (NIS).

Na figura 3, o maior halo de inibição foi para valores maiores de 3,0 cm de halo, isso corresponde a maior concentração de nisina z (10 %), os tratamentos 3 e 9 são os correspondem essas concentrações que foram mais efetivo na ação de inibição do micro-organismo *S. Aureus*. A difusão do antimicrobiano não foi prejudicada pela adição do nanocristais de celulose (Figura 4).



A

B

Figura 3. Teste de difusão em ágar dos filmes de pectina incorporados com nanocristais de celulose (CNC) e nisina Z (NIS) para o micro-organismos *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538)). A) Tratamento 3 (5 % de CNC 10 % NIS); B) Tratamento 9 (5 % CNC 10 % NIS).

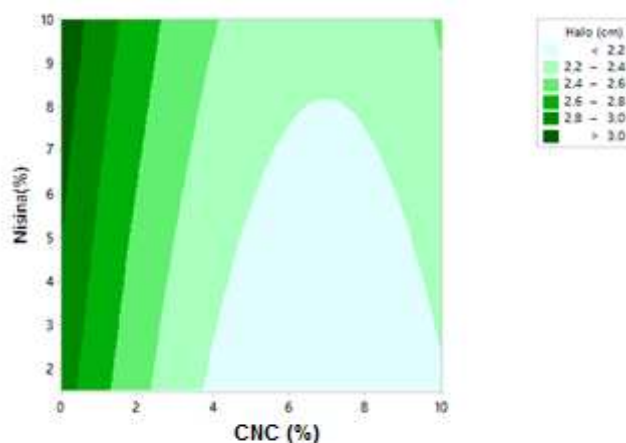


Figura 4. Atividade antimicrobiana dos filmes de pectina incorporados com nanocristais de celulose (CNC) e Nisina z(NIS).

A incorporação de nisina nas concentrações de 1,45 e 10 % (m/m) no filme de pectina apresentou resultados satisfatórios quanto à inibição de *S. aureus* e *E.coli*. O Filme antimicrobiano incorporado com nisina z, mediante os resultados obtidos, apresentou potencial de aplicação como embalagem ativa antimicrobiana no controle dos micro-organismos estudados, estendendo assim a vida de prateleira e assegurando a segurança alimentar.

3.2 Espessura

A espessura dos filmes de pectina foi influenciada pela a adição do antimicrobiano e dos nanocristais de celulose. Quando avaliados separadamente, a região que obteve maior espessura foi com concentração de 10 % de nisina z. Os resultados da espessura mostraram que essa propriedade teve diferença significativa entre os filmes nanocompósitos desenvolvidos com base no DCCR quando houve adição de nisina z nas concentrações estudadas (1,45 % e 10 %) (Tabela 3).

Tabela 3. Estimativas dos coeficientes de DCCR, da presença de nanocristais de celulose na espessura dos filmes de pectina.

Espessura	Equação^a	R²	FAJ^b
(mm)	$0,1610^* + 0,00153^* \text{CNC}^2 + 0,00153^* \text{NIS}^2$	0,2788	0,307

^a Foi utilizado o modelo Quadrático Completo e os coeficientes não apresentados na equação foram não significativos ($p > 0,05$).

* Significativo pelo teste t de Student ($P < 0,05$)

^b FAJ: Valor-P para a falta de ajuste do modelo

Um fator que contribuiu para o aumento da espessura foi a adição da nisina z e de nanocristais de celulose, quanto maior a concentração de nisina z e nanocristais de celulose maior a espessura do filme de pectina. A menor espessura foi obtida com a concentração de 1,45 % de nisina z com pequena diferença de espessura ($0,10 - 0,14 \pm 0,04$ mm) entre os tratamentos, isso devido a interação da nisina com a pectina (Figura.5).

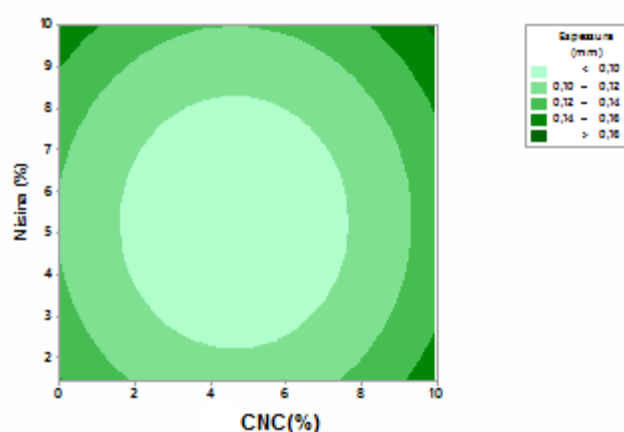


Figura 5. Espessura dos filmes de pectina incorporados com nanocristais de celulose (CNC) e nisina z (NIS).

A espessura é um parâmetro importante para filmes e geralmente influencia nos parâmetros como permeabilidade ao vapor de água, propriedades mecânicas e liberação de agentes ativos.

3.3 Caracterização morfológica e topográfica dos filmes

A) Morfologia de força atômica

As fotomicrografias obtidas por microscopia de força atômica permitiram avaliar a microtopografia da superfície dos filmes em três dimensões e ainda determinar a rugosidade média dos filmes. Com base em imagens de topografia com tamanhos de $5 \times 5 \mu\text{m}^2$ obtidas por AFM foram observados que as rugosidades das matrizes dos filmes de pectina foram alteradas significativamente após a adição dos nanocristais de celulose (CNC) e da nisina z (NIS).

Observou que os tratamentos com nanocelulose PEC/CNC/NIS diferenciam-se entre si, por apresentarem uma superfície mais irregular e porosa, sendo observados alguns agregados, representados pelas áreas mais claras (Tabela 4). Entretanto, ocorre uma grande alteração da microtopografia dos filmes nas diferentes concentrações de CNC. Isto pode ser explicado baixa dispersão do CNC no polímero em função da formação de aglomerados na matriz polimérica (Figura.6,7,8 e 9).

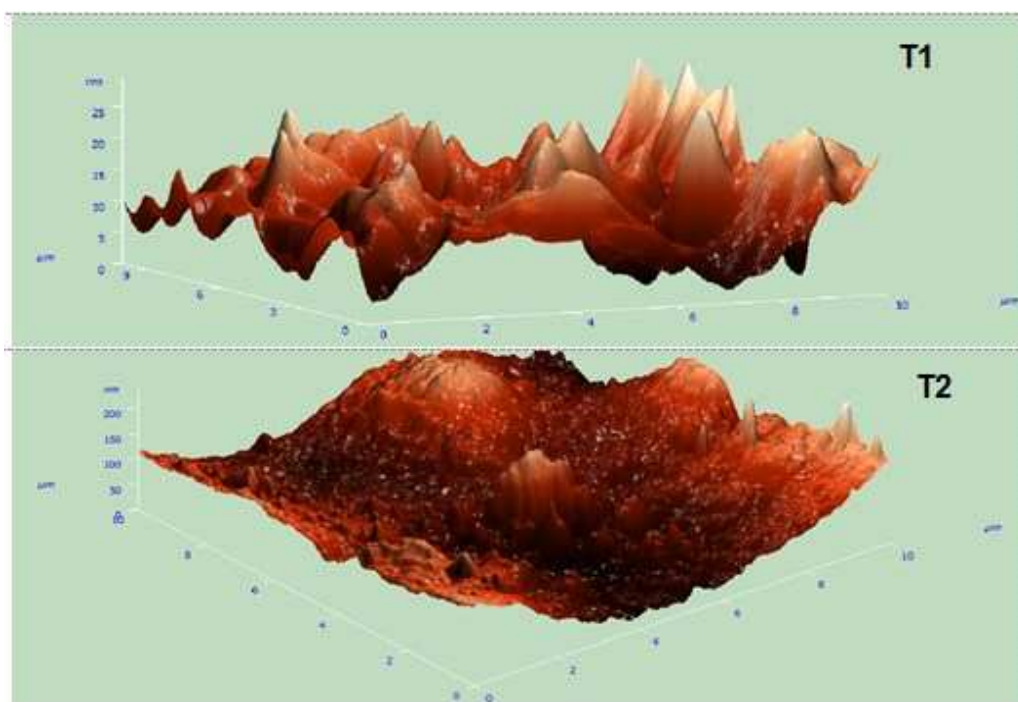


Figura 6. Topografia em 3D dos filmes de pectina adicionado com nanocristais de de celulose(CNC) e nisina z (NIS). **T1** (1,45 % CNC 1,45 % NIS), **T 2**(10 % CNC 5 % NIS)
0

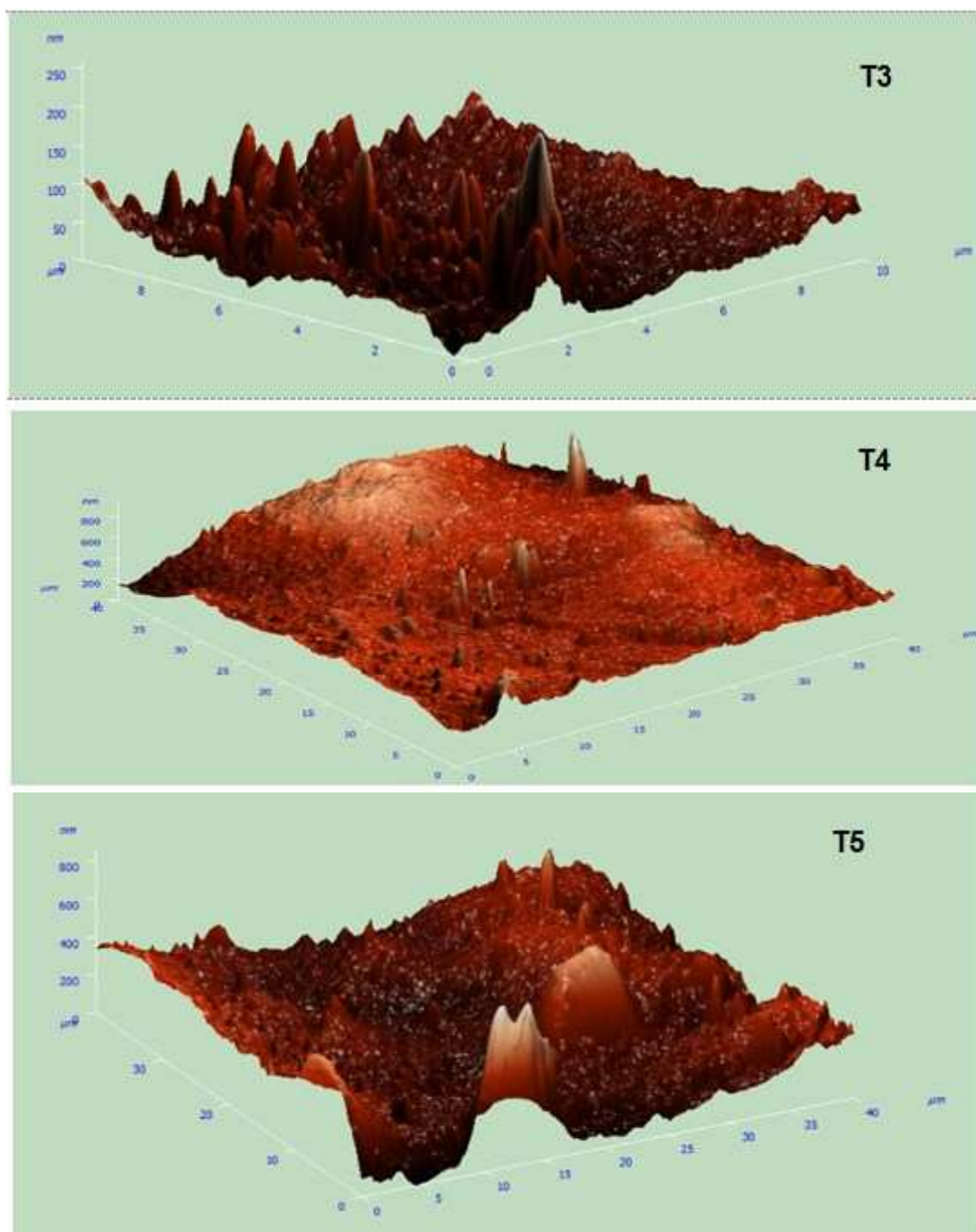


Figura 7. Topografia em 3D dos filmes de pectina adicionado com nanocristais de de celulose(CNC) e nisina z. (NIS) **T 3**(5 % CNC 10 % NIS), **T4**(5 % CNC 5 % NIS), **T 5**(1,45 % CNC 1,45 % NIS).

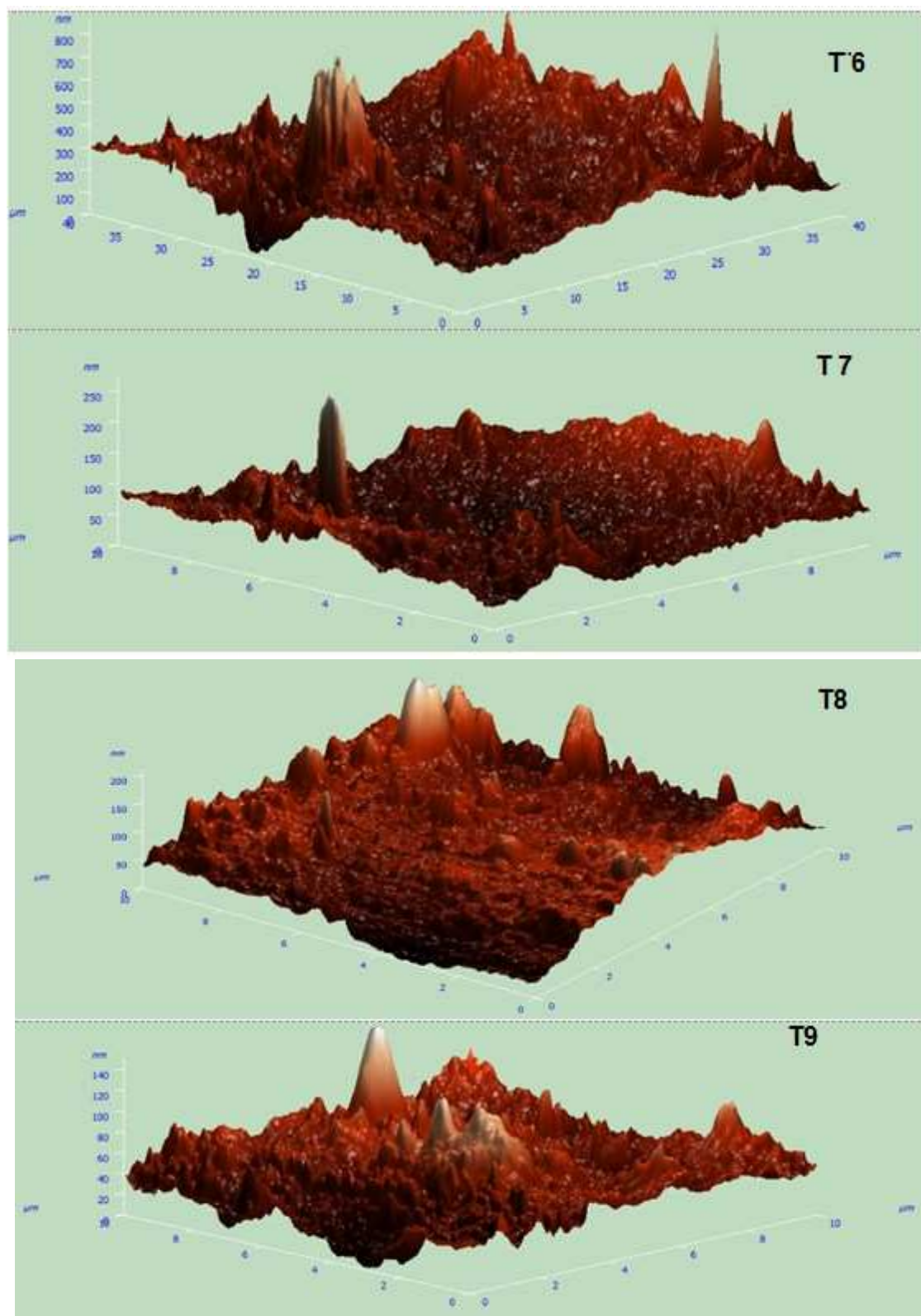


Figura 8. Topografia em 3D dos filmes de pectina adicionado com nanocristais de de celulose(CNC) e nisina z (NIS). **T 6**(8,55 % CNC 8,55 % NIS), **T 7**(5 % CNC 5 % NIS), **T 8**(8,55 % CNC 1,45 % NIS).

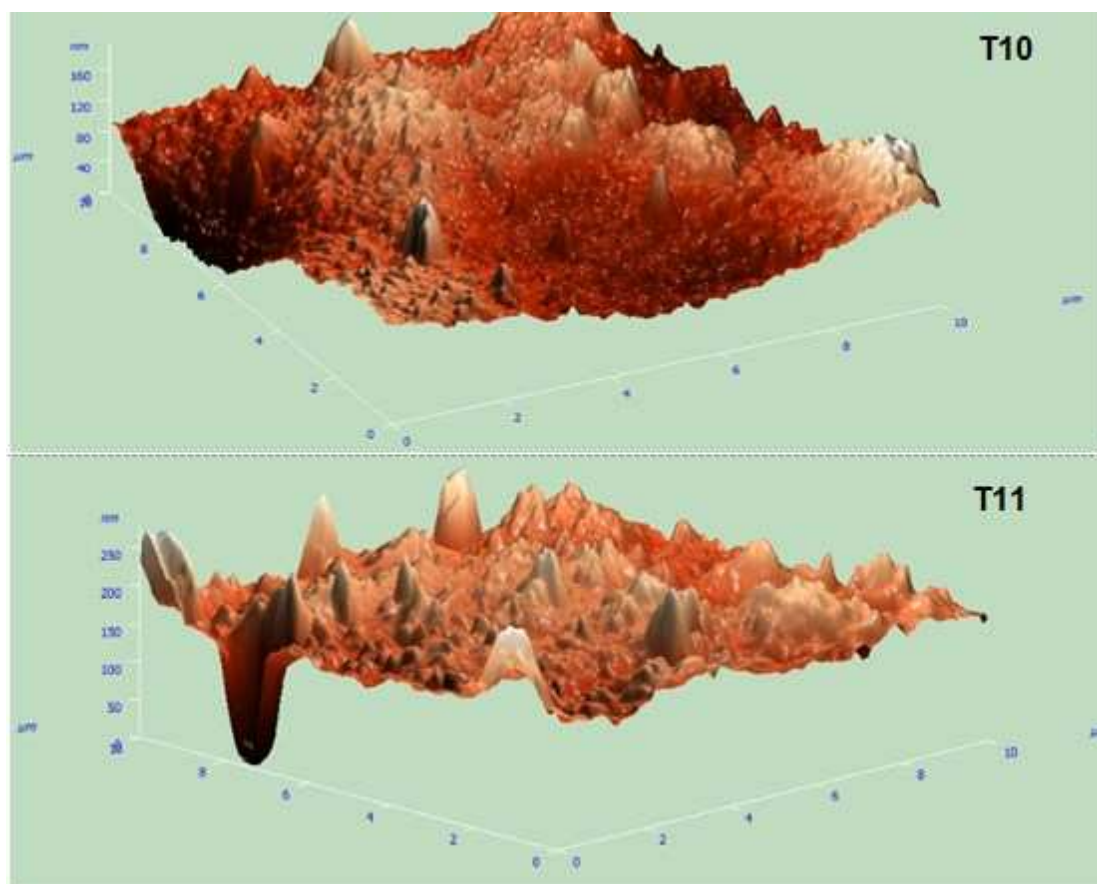


Figura 9. Topografia em 3D dos filmes de pectina adicionado com nanocristais de celulose(CNC) e nisina z (NIS). **T 10** (5 % CNC 5 % NIS), **T11** (0 % CNC 5 % NIS)

Tabela 4. Valores médios de Rugosidade (Ra) obtidos para os diferentes tratamentos.

Tratamentos	Ra (nm)	
T 1 (1,45 % CNC 1,45 % NIS)	74,50	A
T 5 (1,45% CNC 1,45% NIS)	70,60	B
T 6 (8,55 % CNC 8,55 % NIS)	50,18	C
T 2 (10 % CNC 5 % NIS)	29,18	D
T 10 (5 % CNC 5 % NIS)	23,24	E
T 8 (8,55% CNC 1,45% NIS)	18,19	F
T 7 (5% CNC 5% NIS)	18,00	G
T 11 (0% CNC 5% NIS)	15,60	H
T 3 (5% CNC 10 % NIS)	15,30	I
T 9 (5 % CNC 10 % NIS)	12,90	J
T 4 (5% CNC 5% NIS)	3,60	K

Médias seguidas de letras diferentes na coluna diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey (p < 0,05).

A rugosidade média (Ra) dos filmes contendo nanocristais de celulose com nisina z, diferiu estatisticamente entre os tratamentos estudados. Provavelmente, o aumento da rugosidade em algumas concentrações foi

provocado pela baixa interação entre a CNC/polímero, permitindo a formação de agregados que alteraram a rugosidade do filme.

B) Propriedades Mecânicas

Os resultados encontrados com base no delineamento composto central rotacional mostraram que a resistência máxima à tração foi afetada pela adição da interação CNC* NIS nos níveis estudados. O alongamento na ruptura não obteve diferença significativa na interação, mas foi afetado quando avaliado a presença de CNC e NIS separadamente. O módulo de elasticidade obteve diferença significativa na interação, mas foi pouco afetado com adição de CNC e NIS quando avaliado separadamente (Tabela 5).

Tabela 5. Estimativas dos coeficientes de DCCR, na avaliação das propriedades mecânicas do filme de pectina com concentrações de CNC (1 % a 10 %) e Nis(1 % a 10 %).

Parâmetros	Equação ^a	R ²	FAJ ^b
Resistência Máxima à tração (MPa)	$1,021^* - 0,161\text{CNC}^* - 0,071\text{NIS}^* - 0,0054\text{CNC}^2 + 0,071\text{CNC.NIS}^*$	0,7193	0,03
Along. Ruptura (%)	$15,53^* + 1,42^*\text{NIS} - 0,250\text{CNC}^2 - 0,177\text{NIS}^2$	0,3544	0,349
M. Elasticidade (MPa)	$32,3^* + 1,12\text{NIS}^2 - 1,59\text{CNC.NIS}^*$	0,8152	0,02

^a Foi utilizado o modelo Quadrático Completo e os coeficientes não apresentados na equação foram não significativos ($p > 0,05$).

* Significativo pelo teste t de Student ($P < 0,05$)

^b FAJ: Valor-P para a falta de ajuste do modelo

A resistência máxima à tração do filme foi afetada pelos níveis dos nanocristais de celulose e nisina z nas concentrações máxima (8,55 % e 10 %) estudados (Figura 10). O tratamento 6 foi referente a essa alta concentração de nanocristal de celulose e nisina z que obteve maior resistência máxima à tração. Quando o nanocristal de celulose e a nisina z foram analisados separadamente em seus valores máximos de concentrações, o alongamento da ruptura obteve valores menores. Quando os dois fatores foram combinados em suas concentrações mínimas e máximas houve um decréscimo no valor de alongamento da ruptura. Para concentrações intermediárias de nanocristais de celulose e nisina z, o valor de alongamento à ruptura obteve os melhores resultados (Figura 10).

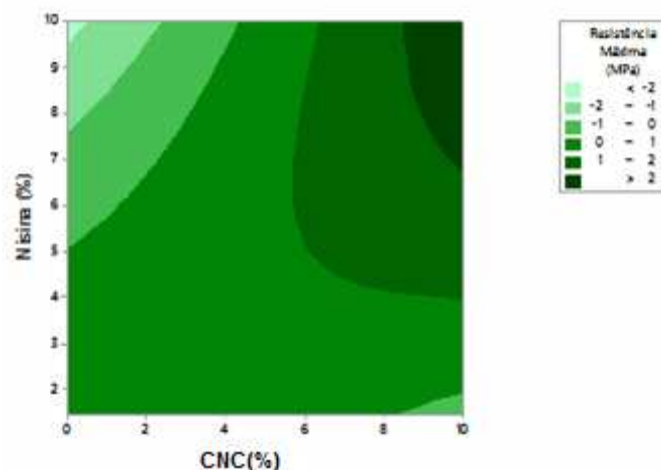


Figura 10. Resistência máxima à tração dos filmes de pectina incorporados com nanocristais de celulose (CNC) e nisina z(NIS).

Em relação ao alongamento, ao comparar os tratamentos constatou que houve decréscimo de 24 e 14 mm para os tratamentos (T4 ,T10 e T7) e para os tratamentos (T6,T9 e T3), respectivamente (Figura.11). Esse fato pode ser explicado por Iwamoto et al. (2007) que relataram menor resistência à tração para os filmes produzidos, especialmente para a propriedade de alongação na ruptura devido ao excesso de componentes com menor razão de aspecto, que geralmente são rígidos e de fácil desprendimento da matriz. Fica evidente que os tratamentos que possuem 10 % de nanocristais de celulose apresentaram decréscimo 58,33 % no valor do alongamento para ruptura (Figura 11).

Alguns autores, como Teixeira (2011), já reportaram o inesperado aumento na alongação com o aumento da concentração de nanocristais nas matrizes poliméricas. Algumas causas são associadas a este comportamento: as condições de formação do nanocompósito, a possível presença de açúcares na suspensão e a modificação da quantidade de água presente no filme são possíveis explicações para este efeito.

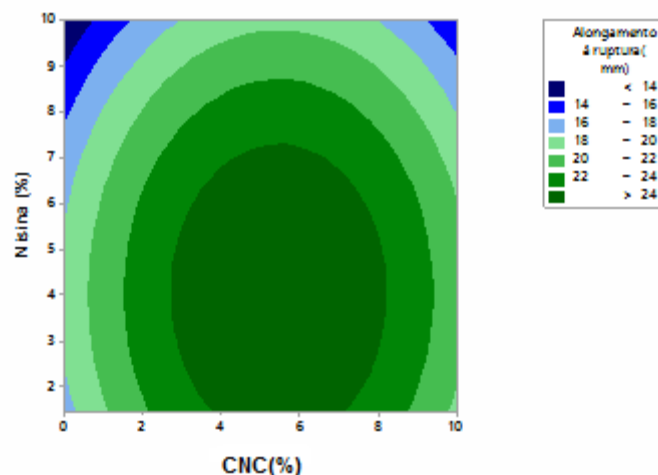


Figura 11. Alongamento de ruptura dos filmes de pectina incorporados com nanocristais de celulose (CNC) e nisina z(NIS).

O módulo de elasticidade dos filmes de pectina foram influenciado pela adição da máxima da concentração de nanocristais de celulose e adição mínima de nisina z, ocorrendo um aumento do módulo de elasticidade (Figura.12). Damasio (2015) salientou que o módulo de elasticidade apresentou crescimentos estatisticamente significativos em seu valor quando aumentada a concentração dos nanocristais de celulose.

Moreira (2010) desenvolveu filmes de blenda polimérica de amido/pectina (TPS/PEC) com nanocristais de celulose extraídos do bagaço da cana-de-açúcar, foi verificado que mesmo pela incorporação de 10 % de nanocristais de celulose a resistência à tração e o módulo elástico da blenda TPS/PEC foram pouco aumentados, enquanto a alongação na ruptura foi expressivamente reduzida de 14 para 8 %.

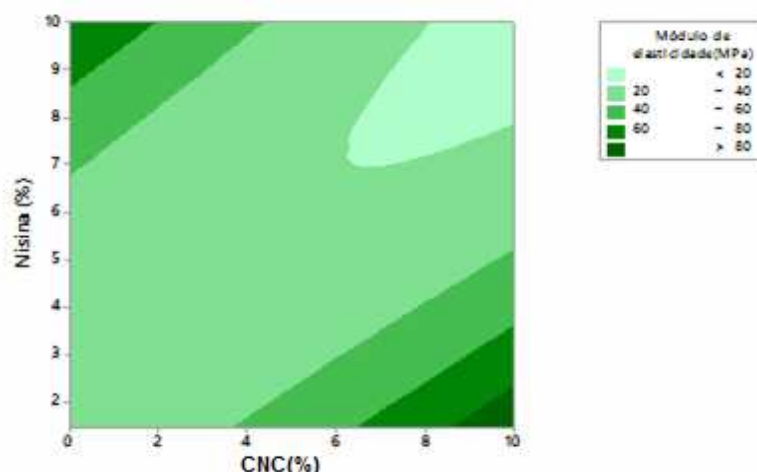


Figura 12. Módulo de elasticidade dos filmes de pectina incorporados com nanocristais de celulose (CNC) e nisina z (NIS).

Damasio (2015) avaliou filmes produzidos de matriz polimérica de celulose nanofibrilada (CNF) com adição de nanocristais de celulose (CNC) com nanoreforço. Adição de diferentes quantidades de CNC influenciou significativamente ($p < 0,05$) na carga máxima suportada pelos nanocompósitos CNF-CNC. Algumas propriedades mecânicas, em especial a carga máxima de ruptura, estão diretamente relacionadas com as ligações de hidrogênio formadas entre as estruturas e não necessariamente com a resistência das nanoceluloses em si (ABE e YANO, 2009).

Oliveira *et al* (2016), relatou que as propriedades físicas dos filmes de pectina foram afetadas com diferentes concentrações de argila montmorilonita (MMT). A adição do MMT para os filmes de pectina aumentou significativamente a sua resistência à tração e módulo de elasticidade mesmo em concentração baixa de MMT. O resultado encontrado para este estudo não foi similar já que se trata de nanocompósitos com composição química diferentes ao relatado acima.

A resistência à tração, alongamento na ruptura e módulo de elasticidade, são indicadores comuns usados para descrever as propriedades mecânicas dos filmes e estão relacionados com a sua estrutura química com a resistência mecânica sendo estes parâmetros importantes uma vez que eles descrevem desempenho mecânico e estrutural (ESPITIA *et al*., 2014).

Corrêa *et al*. (2013) prepararam nanocompósitos de poliamida 6 e nanocristais de celulose. Os nanocristais foram pré-dispersos em uma solução de poliamida 6 antes da etapa de processamento. Usando essa abordagem, é possível diminuir a formação de aglomerados de nanocristais, o que resulta em

melhorias nas propriedades térmicas e mecânicas dos nanocompósitos. Um aumento de 45 % no módulo de elasticidade é obtido para nanocompósitos contendo 1 % de nanocristais em massa.

Rafieian *et al.* (2014) investigaram nanocompósitos de glutenina reforçados com nanocristais de celulose modificados. Os filmes obtidos por “solvent-casting” contendo 5 % em massa de nanocristais modificados, apresentam aumento de 58,8 % na resistência à tração. No entanto, filmes contendo concentrações maiores de nanocristais de celulose, a resistência à tração tendeu a diminuir devido à aglomeração das nanopartículas na matriz.

Os resultados até agora apresentados na literatura demonstram a importância das interações carga/matriz e carga/carga para alcançar uma melhora nas propriedades mecânicas. É necessário um balanceamento entre a distribuição das nanopartículas na matriz, evitando a formação de aglomerados, mas suficiente para manter a rede de percolação necessária para a distribuição de tensões no material (LEITE, 2015).

Segundo Toledo e Soares (2016) a utilização de fibras naturais, como nanocristais de celulose, em compósitos poliméricos tem recebido grande volume de pesquisas na diligência de desenvolvimento de materiais biodegradáveis e de alto desempenho mecânico.

C) Estudo das propriedades de barreira a vapor de água

A avaliação individual de nanocristais de celulose e nisina z, bem como a interação desses fatores obtiveram resultados independentes na taxa de permeabilidade ao vapor d’água (TPVA), mesmo com $p < 0,05$ e o valor de R^2 baixo (Tabela 6).

Tabela 6. Estimativas dos coeficientes de DCCR, da presença de NIS e CNC na TPVA dos filmes de PEC.

TPVA	Equação ^a	R ²	FAJ ^b
(g/m ² . dia ²)	0,231* - 0,00577 * CNC - 0,00367* NIS ²	0,329	0,285

^a Foi utilizado o modelo Quadrático Completo e os coeficientes não apresentados na equação foram não significativos ($p > 0,05$).

* Significativo pelo teste t de Student ($P < 0,05$)

^bFAJ: Valor-P para a falta de ajuste do modelo

Quando foi adicionado uma maior concentração de nanocristais de celulose (10 %) nos filmes de pectina ocorreu um aumento significativo da taxa de permeabilidade ao vapor d'água (TPVA), mostrando que os nanocristais de celulose em alta concentração não funcionaram como uma barreira para impedir a passagem de gases (Figura.13). Uma provável explicação é que o processo de homogeneização não tenha sido eficiente em relação ao tempo de sonicação, fazendo com que não houvesse boa dispersão dos nanocristais na matriz polimérica. A permeabilidade ao vapor d'água (TPVA) nos filmes deve ser o mais baixo possível (BENBETTAÏEB, KUREK, BORNAZ, e DEBEAUFORT, 2014).

Apesar da alta concentração de nanocristais de celulose não tenha sido eficiente para redução da TPVA, este resultado indicou que houve uma melhora do processo de obtenção dos filmes, pois quantidades menores de nanocristais de celulose (1,45% ; 5% e 8,55 %) foram necessárias para reduzir a taxa de permeabilidade de vapor de água (Figura 13). É importante salientar que a homogeneização ou uso de ultrassom é um fator importante na dispersão dos nanocristais de celulose nos polímeros, pois é necessário que a nanocelulose seja bem misturada, homogeneizada e dispersa em todo o filme para que possa ser efetiva na melhoria da barreira ao vapor de água (SILVA e D'ALMEIDA, 2009). A aplicação de ultrassom gera grandes gradientes de tensão e de cisalhamento com a movimentação dos líquidos da suspensão, causados por transmissão muito rápida de moléculas de solvente ao redor da bolha de cavitação, bem como por ondas de choque intensas emanadas em colapso (SUSLICK e PRICE, 1999), o que pode favorecer a dispersão de nanopartículas nos filmes, diminuindo a taxa de permeação.

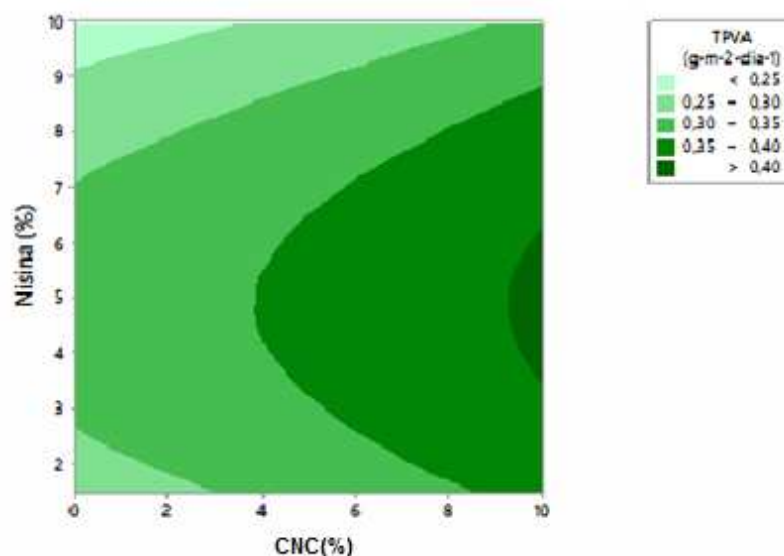


Figura 13. Taxa de permeabilidade ao vapor d'água (TPVA) dos filmes de pectina incorporados com nanocristais de celulose (CNC) e nisina z (NIS).

Henrique *et al.* (2008), indicaram que a adição de fibras no filme aumentou a permeabilidade dos mesmos. Este fato pode ser justificado pela não incorporação das fibras em sua matriz polimérica, gerando espaços intermoleculares grandes, o que permitiu maior passagem de vapor de água através da superfície. Este resultado foi similar ao encontrado neste estudo.

Mariano (2013) relatou no seu trabalho que em sistemas poliméricos contendo nanocristais houver uma redução da permeabilidade (seja líquidos ou gases) até a adição de uma determinada quantidade de nanocristais, e que após este ponto a permeabilidade apresenta um comportamento oposto. Isto se deve ao fato de que com o aumento da concentração de nanocristais alguns pontos do filme podem apresentar aglomerações que causariam falhas na estrutura tridimensional matriz–nanocristal, o que permitiria a passagem de água (e possivelmente gases) através do filme. As análises mostraram que os filmes apresentaram uma maior redução na permeabilidade no filme com 1 % de nanocristais, onde houve uma redução de 25,2 %, sendo que após esta adição os prováveis efeitos de aglomeração já passaram a atuar aumentando a permeabilidade. Este resultado foi similar ao encontrado neste estudo.

Um outro fator que pode ter influenciado na alta taxa de TPVA é a característica hidrofílica da pectina (-OH) e dos nanocristais de celulose (-OH), o glicerol pode ter contribuído para o aumento dos valores de TPVA, devido ao fato de que sua alta capacidade de interagir com água facilitou a solubilização e

permeação do filme. O glicerol possui baixa massa molar, reduzindo interações polímero-polímero, pois é facilmente inserido entre as cadeias do polímero, aumentando a mobilidade e provocando maior difusão de água pela matriz do filme, graças à desorganização da matriz polimérica que se torna menos densa e com maior volume livre (MOREIRA, 2010).

Moreira (2010) no seu estudo adicionou nanocristais de celulose extraídos do bagaço de cana-de-açúcar em blenda polimérica de amido/pectina (TPS/PEC), a incorporação dos nanocristais de celulose em altas concentrações foram efetivas para diminuir as propriedades de barreira ao vapor de água da blenda TPS/PEC. A presença dos nanocristais de celulose na matriz, em qualquer concentração, promoveu redução nos valores de permeabilidade ao vapor de água, levando a alterações na estrutura dos nanobiocompósitos, isso porque os nanocristais, associados ao glicerol, agiram como uma barreira e diminuíram os espaços livres na matriz polimérica dificultando a passagem do vapor (MÜLLER *et al.*, 2008; BECK *et al.*, 2005; ANGLES e DUFRESNE, 2001).

Machado (2011) relatou no seu estudo que nanocelulose de coco influenciou diretamente na permeabilidade ao vapor de água, e à medida que se aumentou a concentração destas nanopartículas nos nanobiocompósitos, a permeabilidade ao vapor de água diminuiu, valores opostos foram encontrados neste estudo.

Analisando os valores obtidos, pode-se estabelecer uma associação entre a quantidade de nanocristais de celulose e o uso de ultrassom, revelando que o uso de ultrassom pode ser um fator determinante na dispersão dos nanocristais de celulose na matriz polimérica, contribuindo para diminuição da permeabilidade para quantidades maiores que 8,55 % de nanocelulose e um outro fator que deve ser levado em consideração é a hidrofobicidade da pectina e dos nanocristais de celulosas.

D) Análise termogravimétrica (TGA)

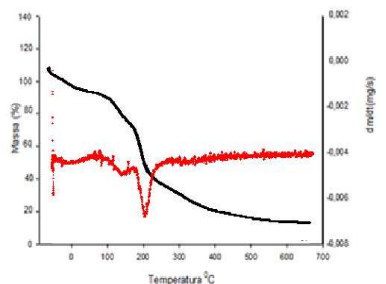
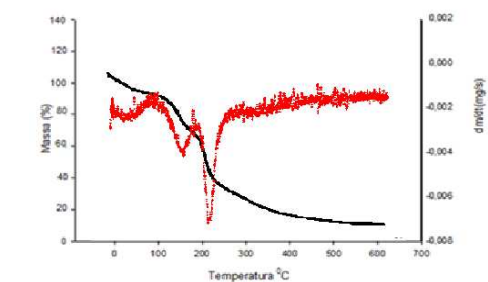
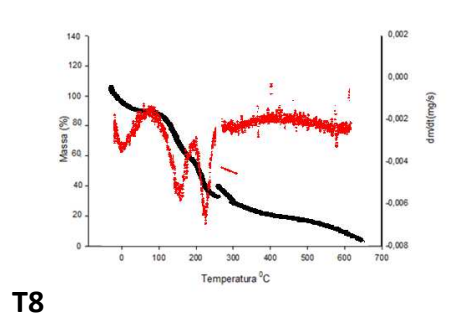
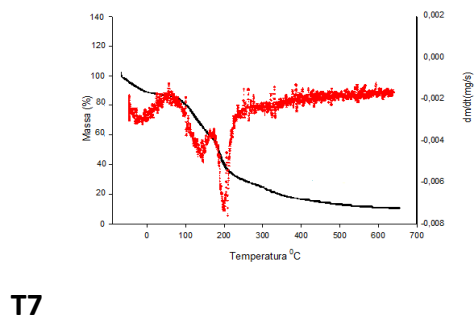
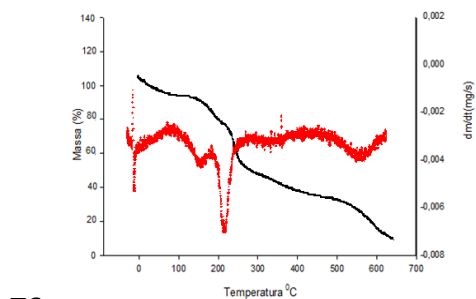
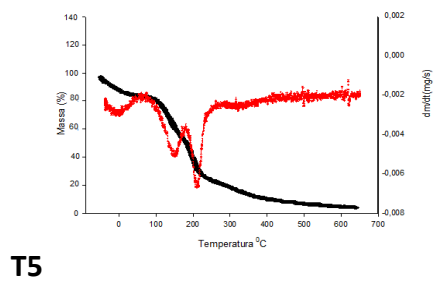
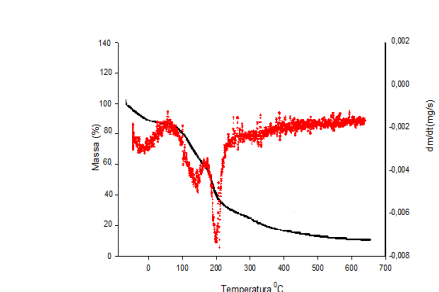
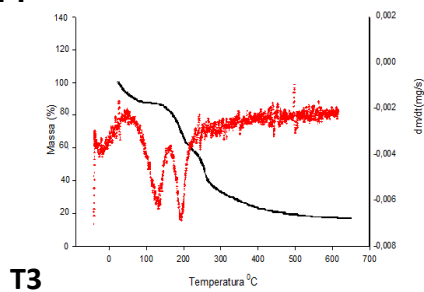
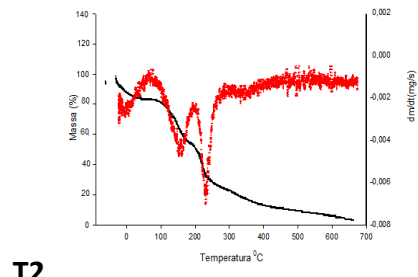
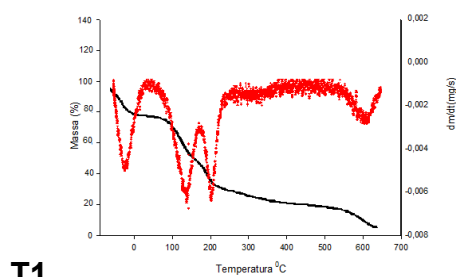
As curvas de degradação termogravimétricas foram similares, uma vez que os filmes de pectina adicionados com nanocristais de celulose e a temperatura inicial de degradação dos filmes com pectina nanocristais de celulose e nisina z variou (260 °C a 290 °C) este valor dependeu das

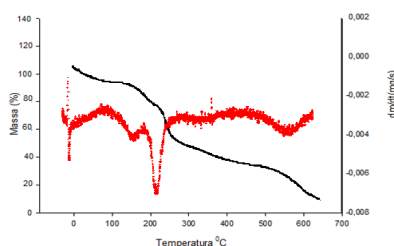
concentrações dos nanocristais adicionados nos filmes (Figura.14). Segundo Damasio (2015), essa degradação ocorre devido a estrutura cristalina do nanocristais de celulose. No entanto, há presença de outros componentes que alteraram as temperaturas de degradação máxima, como os grupos sulfatos, que aceleraram as reações de degradação dos nanocristais de celulose (ROMAN e WINTER, 2004). Um outro fator que pode ter influenciado a degradação térmica dos filmes foi a despolimerização das cadeias poliméricas (SILVA,2015).

O comportamento térmico e as curvas de TGA e de DTG na Figura 14. A partir das análises avaliadas os eventos térmicos que aconteceram durante a degradação dos nanocompósitos, podemos dividi-los em três principais: liberação da água aderida às regiões amorfas e superficiais; degradação das regiões amorfas e liberação de voláteis; e degradação das regiões cristalinas e quebra dos monômeros que formam o polímero.

A primeira ocorreu entre 59 e 130 °C com uma perda de massa em torno de 8 % a 12 %. Esta corresponde à eliminação de água fisicamente ligada e à perda de voláteis de baixa massa molar. A segunda etapa ocorreu em intervalos distintos para cada polímero.

O filme de pectina na terceira etapa ocorreu entre 180 e 270 °C, com máximo na curva DTG em 239 °C. Estes eventos podem ser atribuídos à degradação térmica da pectina. Similarmente à degradação da celulose, as reações de degradação envolveram a despolimerização das cadeias poliméricas, geração de compostos aromáticos e alifáticos, liberação de H₂O, CO₂ e CO, levando a formação de um resíduo carbonáceo (ANDRADE *et al.*, 2009).





T11

1

Figura 14. Curva de termogravimétrica (TGA) e derivada termogravimétrica (DTG) dos filmes de pectina, incorporados com nanocristais de celulose (CNC) e nisina z (NIS).

(T1) CNC 1,45% NIS 1,45%; (T2) CNC 10% NIS 5%; (T3) CNC 5% NIS 10%; (T4) CNC 5% NIS 5%; (T5) CNC 1,45% NIS 1,45%; (T6) CNC 8,55% NIS 8,55%; (T7) CNC 5% NIS 5%; (T8) CNC 8,55% NIS 1,45%; (T9) CNC 5% NIS 10%; (T10) CNC 5% NIS 5%; (T11) CNC 0% NIS 5%;

A estabilidade térmica é essencial para o uso efetivo de nanoceluloses como material de reforço em polímeros. A temperatura de processamento típica de materiais termoplásticos é acima de 200 °C, de modo que as nanoceluloses que são cada vez mais utilizados como agentes de reforço devem ser avaliados pelo comportamento termomecânica (ROMAN e Winter, 2004;. NETO *et al.*, 2013).

E) Espectroscopia na região do Infravermelho – FTIR

Os espectros de FTIR dos filmes de pectina (4000 - 500 cm região) mostraram uma semelhança química para todos os filmes do desenho experimental (Figura 15), possivelmente devido às concentrações dos tratamentos. Os tratamentos variam em sua composição, apenas em algumas concentrações, justificando a diferença da intensidade entre as bandas.

As bandas de absorção de filmes de pectina são características e pode ser observado que as principais bandas estavam relacionadas com o estiramento -OH na região de 3770 – 3088 cm⁻¹, -C-H por volta de 2915 cm⁻¹ e carbonila (-C=O) em 1738 cm⁻¹ (Figura 15). Também foram observadas bandas em 1670 cm⁻¹ e 1575 cm⁻¹ relacionadas respectivamente com o estiramento de carboxilato assimétrico e simétrico, estiramento de ligação -C-O-C- em 1190 cm⁻¹, devido a presença de ligação glicosídica, e uma banda em 850 cm⁻¹ relacionada a hidrogênios anoméricos equatoriais (SYNYTSYA *et al*; 2003)

A vibração localizada na faixa espectral de 800-1190 cm^{-1} é atribuída a bandas de glicerol correspondendo a bandas de vibrações de C-C e C-O (GUERRERO *et al.*, 2010; BARBOSA, 2011).

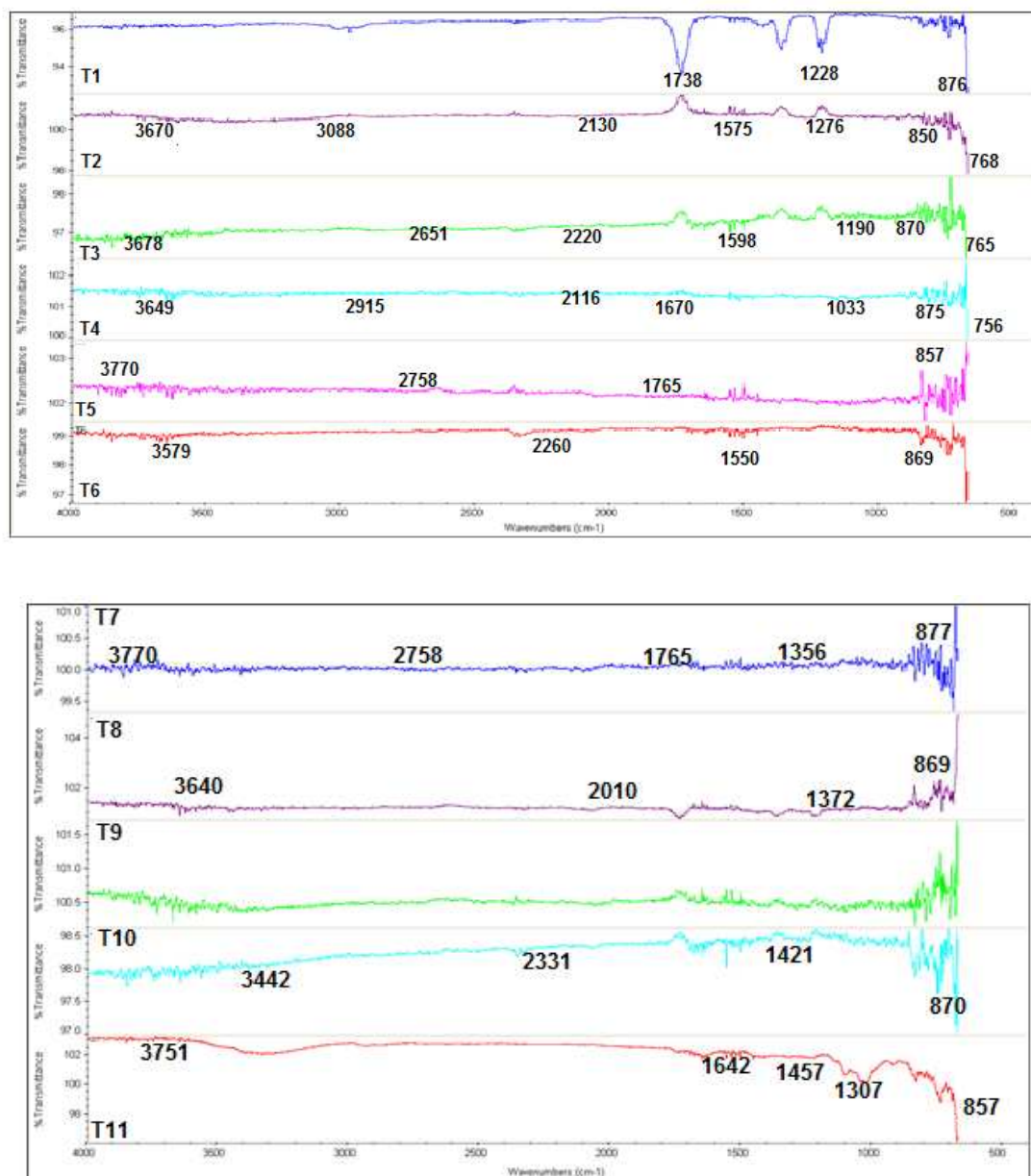


Figura 15. Espectroscopia no infravermelho dos filmes de pectina incorporado com nanocristais de celuloses e nisina Z. T1) CNC1,45%NIS1,45%; (T2) CNC 10%NIS5%; (T3) CNC 5%NIS10%; (T4) CNC 5%NIS5%; (T5) CNC 1,45%NIS1,45%; (T6) CNC 8,55%NIS8,55%; (T7) CNC 5%NIS5%; (T8) CNC 8,55%NIS1.45%; (T9) CNC 5%NIS10%; (T10) CNC 5%NIS5%; (T11) CNC 0%NIS5%;

A banda larga em 3.442 cm^{-1} corresponde à vibração das ligações dos grupos –OH dos nanocristais de celulose. Em 2.915 cm^{-1} tem-se a vibração das ligações dos grupos C-H. Essas bandas são características de materiais celulósicos e seus valores são consistentes com os encontrados por Lu et al. (2014), Liu et al. (2014) e Reddy et al. (2009).

Os nanocristais de celulose apresentaram regiões sulfatadas remanescentes da hidrólise ácida sofrida para sua obtenção (PODSIADLO et al., 2005; LU et al., 2014). Essas regiões encontram-se na faixa de 1.205 cm^{-1} por causa da vibração da ligação S = O, que ocorre devido a reações de esterificação (LU e HSIEH, 2010; NETO et al., 2013). De acordo com Barbosa (2007), compostos contendo enxofre na forma de sulfatos (R-O-SO₂-OR) podem apresentar vibrações assimétricas ($1.421\text{--}1.372\text{ cm}^{-1}$) e simétricas ($1.228\text{--}1.190\text{ cm}^{-1}$) que são similares às encontradas para NCC neste estudo.

Os picos de 1.033 e 877 cm^{-1} estão associados com as vibrações de ligações do polímero de celulose, C-O e C-H, presentes na cadeia do polímero (ALEMDAR e SAIN, 2008), que apareceram em ambos os espectros. O crescimento desses picos para o espectro de CNC revelou o aumento da porcentagem de material celulósico, como também observado por Neto et al. (2013), provavelmente devido à extração de impurezas durante a hidrólise, restando apenas regiões cristalinas do polímero inicial de celulose.

4. Conclusão

Foi possível o desenvolvimento do filme de pectina com nanocristais de celulose e nisina z.

Os filmes ativo antimicrobiano incorporados com concentrações de nisina z apresentaram atividade “*in vitro*” sobre *S.aureus* e *E.coli*.

O aumento da concentração de CNC nos filmes PEC não foi eficiente educação da TPVA.

Degradação termogravimétricas foram similares, uma vez que os filmes de pectina adicionados com nanocristais de celulose e nisina z a temperatura inicial de degradação dos filmes variou ($260\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $290\text{ }^{\circ}\text{C}$).

A resistência máxima á tração e o módulo de elasticidade dos filmes de pectina foram influenciados pela adição da máxima da concentração de

nanocristais de celuloses e adição mínima de nisina, ocorrendo um aumento do módulo de elasticidade e resistência máxima à tração dos filmes estudados.

Os espectros de FTIR dos filmes de pectina mostraram uma semelhança química para todos os filmes do desenho experimental possivelmente devido às concentrações dos tratamentos.

5. Referências Bibliográficas

ANDRADE, J. R.; RAPHAEL, E.; PAWLICKA, A., Plasticized pectin-based gel electrolytes, **Electrochimica Acta**, 54, 6479–6483, 2009.

ANGLÈS, M. N.; DUFRESNE, Plasticized starch/tunicin whiskers nanocomposite A materials. **Macromolecules**, v. 34, p. 2921-2931, 2001.

ALEMDAR, A.; SAIN, M. Isolation and characterization of nanofibers from agricultural residues – wheat straw and soy hulls. **Bioresour. Technol.**, v. 99, p. 1664– 1671, 2008.

AZEVEDO, V. M.; COSTA, A.L.R.; FUKUSHIMA, K.L.; BORGES, S.V. Propriedades de barreira, mecânicas e ópticas de filmes de concentrado proteico de soro de leite. **Revista Instituto Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 69, n.4, p. 237-247. 2014.

AZEREDO, V.M.; DIAS, M.V.; BORGES, S.V.; COSTA, A.L.R.; Silva, E.K.; MEDEIROS; E.A.A.; SOARES, N.F.F. Development of whey protein isolate bio-nanocomposites: Effect of montmorillonite and citric acid on structural, thermal, morphological and mechanical properties. **Food Hydrocolloids**, v. 48, p.179-188, 2015.

BASCH, C. Y., ROSA J. J. A., FLORES, S. K. Physical and Antimicrobial Properties of Tapioca Starch-HPMC Edible Films Incorporated with Nisin and/or Potassium Sorbate. **Food Bioprocess Technology**, v. 6, p. 2419–2428, 2013.

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

BASTARRACHEA, L., DHAWAN, S., SABLANI, S., HYUNGMAH, J., KANG, D., ZHANG, J., TANG. J. Biodegradable Poly (butylenesadipate-co-terephthalate) Films Incorporated with Nisin: Characterization and Effectiveness against *Listeria innocua*. **Journal of Food Science**, v.75, p.E215-224, 2010.

BECK, C S.; ROMAN, M.; GRAY, D. G. Properties and Behavior of Wood Cellulose Nanocrystal Suspensions. **Biomacromolecules**, v. 6, p. 1048-1054, 2005.

BENBETTAÏEB, N., KUREK, M., BORNAZ, S., & DEBEAUFORT, F. (Barrier, structural and mechanical properties of bovine gelatin–chitosan blend films related to biopolymer interactions. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 94(12),2409–2419, 2014.

BREWER, R., ADAMS, M.R., PARK, S.F. Enhanced inactivation of *Listeria monocytogenes* by nisin in the presence of ethanol. **Letters Applied Microbiology**, v. 34, p. 18- 21, 2002.

CAMILLOTO, G. P. **Desenvolvimento e avaliação de embalagem ativa incorporada com produto à base de triclosan para aplicação em carne bovina**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, p. 81, 2009.

CAO-HOANG, L., CHAINE, A., GRÉGOIRE, L., WACHÉ, Y. Potential of nisin incorporated sodium caseinate films to control *Listeria* in artificially contaminated cheese. **Food Microbiology**, v. 27.p. 940-944, 2010.

CHANG, P. R.; JIAN, R.; YU, J.; MA, X. Fabrication and characterisation of chitosan nanoparticles/plasticised-starch composites. **Food Chemistry**, v. 120 p. 736–740, 2010.

CHOLLET, E., SEBTI, I., MARTIAL-GROS, A., DEGRAEVE, P. Nisin preliminary study as a potential preservative for sliced ripened cheese: NaCl, fat and enzymes influence on nisin concentration and its antimicrobial activity. **Food Control**, v. 19, p. 982-989, 2008.

COMA, V., SEBTI, I., PARDON, P., DESCHAMPS, A., PICHAVANT, F.H. Antimicrobial edible packaging based on cellulosic ethers, fatty acids, and nisin incorporation to inhibit *Listeria innocua* and *Staphylococcus aureus*. **Journal Food Protein**, v. 64, p. 470-475, 2001.

CORRÊA, A. C. et al. Obtaining nanocomposites of polyamide 6 and cellulose whiskers via extrusion and injection molding. **Cellulose** 21, 311–322 ,2014.

DAMASIO, R. **Caracterização E Aplicações De Celuloses Nanofibrilada (Cnf) E Nanocristalina (Cnc)**. Dissertation, M.Sc. Viçosa/Brazil. 2015..

ESPITIA, P,J,P.; AVENA-Bustillos,R,J.;WEN-Xian Du d.; Teo´ filo, R,F, Nilda F.F. Soares,N,F,F.; McHug ,T,H. Optimal antimicrobial formulation and physical–mechanical properties of edible films based on ac,ai´ and pectin for food preservation. **food packaging** , 3 8 – 4 9, 2014.

HAIR Jr, J. F., BLACK, W. C., BABIN, B. J., ANDERSON, R. E., TATHAM, R. L. **Análise Multivariada de Dados**. 6 ed. Porto Alegre: Bookman, 2009.

HENRIQUE, C. M.; CEREDA, M. P.; SARMENTO, S. B. S. Características físicas de filmes biodegradáveis produzidos a partir de amidos modificados de mandioca. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 1, p. 231-240, 2008.

GADANG, V. P., HETTIARACHCHY, N. S., JOHNSON, M. G., OWENS, C. Evaluation of antibacterial activity of whey protein isolate coating incorporated with nisin, grape seed extract, malic acid, and EDTA on a Turkey frankfurter system. **Journal.Food Science**, v. 73, p. 389- 394, 2008.

KRISTO, E., KOUTSOUMANIS, K.P., BILIADERIS, C.G. Thermal, mechanical and water vapor barrier properties of sodium caseinate films containing antimicrobials and their inhibitory action on *Listeria monocytogenes*. **Food Hydrocolloids**, v. 22, p.373–386. 2008.

KHAN, A.; RIEDL, B.; LACROIX, M. Optimization of the antimicrobial activity of nisin, Na-EDTA and pH against gram-negative and gram-positive bacteria. **LWT - Food Science and Technology**. Volume 61, Issue 1, Pages 124–129, April 2015.

LEITE, L.; S.; F. **Preparação e caracterização de compósitos de acetato de celulose e nanocristais de celulose**. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.– Campinas, SP ,2015.

LI, X. **A simulation evaluation of backward elimination and stepwise variable selection in regression analysis**. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Departamento de Estatística – Faculdade de Artes e Ciências – Universidade do Estado do Kansas, Manhattan. 2012.

LIU, Y.; WANG, H.; YU, G.; YU, Q.; LI, B.; MU, X. A novel approach for the preparation of nanocrystalline cellulose by using phosphotungstic acid. **Carbohydrate Polymers**, v. 110, p. 415–422, 2014.

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

IMRAN, M., EL-FAHMY, S., REVOL-JUNELLES, A., DESOBRY, S. Cellulose derivative based active coatings: Effects of nisin and plasticizer on physico-chemical and antimicrobial properties of hydroxypropyl methylcellulose films. **Carbohydrate Polymers**, v. 81, p.219–225, 2010.

IWAMOTO, S.; NAKAGAITO, A. N.; YANO, H. Nano-fibrillation of pulp fibers for the processing of transparent nanocomposites. **Applied Physics A**, v. 89, n. 2, p. 461- 466, 2007.

MACHADO, B, A, S. **Desenvolvimento e Caracterização de filmes flexíveis de amido de mandioca com nanocelulose de coco**. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia, ,2011.

MARIANO, M. **Obtenção e caracterização e aplicação de nanocristais de celulose obtidos a partir do sisal**. Dissertação submetida ao Programa de pós-

graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de mestre em Química, 2013.

MOREIRA, F. K. V. **Desenvolvimento de nanocompósitos poliméricos biodegradáveis a partir de pectina, amido e nanofibras de celulose**. 2010. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais. Universidade Federal de São Carlos – Ufscar, São Paulo, SP. 2010.

MÜLLER, C. M. O.; LAURINDO, J. B.; YAMASHITA, F. Effect of cellulose fibers addition on the mechanical properties and water barrier of starch-based films. **Food hydrocolloids**, v.23, n.9, p. 1328-1333, 2009.

NATRAJAN, N., SHELDON, B. W. Inhibition of Salmonella on poultry skin using protein- and polysaccharide-based films containing a nisin formulation. **Journal.Food Protein**, v. 63, p. 1268-1272, 2000.

NETO, W. P. F.; SILVÉRIO, H. A.; DANTAS, N. O.; PASQUINI, D. Extraction and characterization of cellulose nanocrystals from agro-industrial residue – Soy hulls. **Industrial Crops and Products**, v. 42, p. 480– 488, 2013.

NGUYEN, V. T., GIDLEY, M. J., DYKES, G. A. Potential of a nisin-containing bacterial cellulose film to inhibit *Listeria monocytogenes* on processed meats. **Food Microbiology**, v. 25, p. 471-478, 2008.

TEERAKARN, A., HIRT, D. E., ACTON, J. C., RIECK, J. R., DAWSON, P. L. Nisin diffusion in protein films: effects of film type and temperature. **Journal. Food Science**, v. 67, p. 3019-3025, 2002.

TEIXEIRA, E. D. M. et al. Sugarcane bagasse whiskers: extraction and characterizations. **Industrial Crops and Products**, 33,.63-66,2011.

TOLEDO, A,M,N.; SOARES,L,A,S. Bionanopartículas: Principais aspectos e aplicações da matéria orgânica em escala nanométrico. , **HOLOS**, Ano 32, Vol. 1, 2016.

OLIVEIRA, T,I,S.; 1, Zea-Redondo,L.; Moates, G,K.; Wellner, N.;Kathryn Cross,Keith W.,. Azeredo,H,M,C Pomegranate peel pectin films as affected by montmorillonite. **Food Chemistry** 198 (2016) 107–112, 2016.

RAFIEIAN, F. & SIMONSEN, J. Fabrication and characterization of carboxylated cellulose nanocrystals reinforced glutenin nanocomposite. **Cellulose** 21, 4167– 4180 ,2014.

REDDY, K.O.; GUDURI, B.R.; RAJULU, A.V. Structural characterization and tensile properties of borassus fruit fibers. **J Appl Polym Sci**, v. 114, n. 1, p .603-611, 2009.

RHIM, J., PARK, H.; SIK HA, C. Bio-nanocomposites for food packaging applications. **Progress in Polymer Science**, v.38, p. 1629– 1652, 2013.

SILVA, D. J.; D'ALMEIDA, M. L. O. Nanocristais de celulose. **O Papel** v. 70, n. 07, p. 34 – 52, jul, 2009.

SYNYTSYA, A.; COPÍCOVÁ, J.; MATEJKA, P.; MACHOVIC, V. Fourier transform Raman ad infrared spectroscopy of pectins. **Carbohydrate Polymers** 54, 97-106, 2003.

SOBRINO-LOPEZ, A., MARTIN-BELLOSO, O. Enhancing inactivation of *Staphylococcus aureus* in skim milk by combining high-intensity pulsed electric fields and nisin. **J. Food Protein**, v. 69, p. 345-353, 2006.

SUSLICK, K. S.; PRICE, G. J. Applications of ultrasound to materials chemistry. **Annual Review of Materials Research**, v. 29, p. 295–326, 1999.

ÚNICA- União da Indústria de Cana-de-Açúcar UNIÃO DA AGROINDÚSTRIA CANAVIEIRA DE SÃO PAULO. Consecana - Dados. Abr. 2011. Disponível em: <http://www.unica.com.br/>. Acesso em: 09/03/2016.

CAPÍTULO 5

Desenvolvimento e aplicação da celulose nanofibrilada extraída de bagaço da cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) embalagem ativa biodegradável.

Desenvolvimento e aplicação da celulose nanofibrilada extraída de bagaço da cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) embalagem ativa biodegradável.

RESUMO

O objetivo do trabalho foi desenvolver uma embalagem ativa biodegradável utilizando como matriz polimérica pectina cítrica reforçada com a incorporação de nanocelulose (celulose nanofibrilada) extraída do bagaço de cana-de-açúcar, bem como, avaliar o efeito da adição do antimicrobiano nisina z no biocontrole de micro-organismos. No teste de difusão em ágar para todos os tratamentos testados ocorreu diferença significativa ao nível ($P > 0,05$), observou-se atividade antimicrobiana '*in vitro*' da nisina z (NIS) para os micro-organismos *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. A espessura foi afetada pela adição da nisina z, quanto maior a concentração de nisina maior a espessura do filme de pectina. O aumento da rugosidade em algumas concentrações foi provocado pela baixa interação entre a CNF/polímero, permitindo a formação de agregados que alteraram a rugosidade dos filmes. As propriedades mecânicas dos filmes mostraram que a resistência máxima à tração foram afetadas pela adição de celulose nanofibrilada (CNF) nos níveis estudados e obteve diferença significativa ao nível ($P > 0,05$) com os filmes de celulose nanofibriladas desenvolvidos na presença de nisina z. Quanto maior a concentração de nisina z e celulose nanofibrilada maior foi a resistência máxima à tração dos filmes. O alongamento na ruptura obteve diferença significativa ao nível ($P > 0,05$) e também foi afetado pela presença de CNF e NIS. Quando os dois fatores foram combinados em suas concentrações máximas houve aumento no valor de alongamento da ruptura analisados. O módulo de elasticidade não obteve diferença significativa ao nível ($P > 0,05$) em concentrações máximas de NIS e CNF houve redução deste parâmetro e para concentrações intermediárias de NIS e CNF. As análises termogravimétricas dos filmes apresentaram uma temperatura de degradação variando de 241 a 349 °C entre os tratamentos. A taxa de permeabilidade do vapor de água (TPVA) reduziu com a concentração máxima de 10 % de CNF nos filmes de pectina. A CNF funcionou com uma barreira física formada com a dispersão nanofibrilas na matriz polimérica.

dificultando a passagem de vapor de água. Pelos resultados obtidos, conclui-se que os filmes com celulose nanofibrilada e nisina z desenvolvidos neste estudo possuem estabilidade térmica, propriedades mecânicas e atividade antimicrobiana viável para diversas aplicações, como no desenvolvimento de embalagens ativa para alimentos.

Palavras-chave: nanocelulose, celulose nanofibrilada, pectina e nsina z.

Development and application of nanofibrillated cellulose extracted from sugarcane bagasse (*Saccharum officinarum* L.) biodegradable active packaging.

ABSTRACT

The purpose of this research was to develop a biodegradable package using as polymeric matrix citric pectin reinforced with the incorporation of nanocellulose (nanofibrillated cellulose) extracted from the sugar cane bagasse, as well as to evaluate the effect of the addition of the nisin Z antimicrobial in the control of microorganisms. In the diffusion test in agar for all the treatments tests a significant difference took place at level $P>0.05$. An antimicrobial activity *in vitro* of nisin Z (NIS) was observed for the microorganisms *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. The thickness was affected by the addition of nisin Z, when one observed that the bigger the concentration of nisin, the bigger the thickness of the pectin film. The increase in roughness in some concentrations was caused by the low interaction between the CNF/polymer, allowing the formation of aggregates which altered the films roughness. The films mechanical properties showed that the maximum resistance to traction was affected by the addition of nanofibrillated cellulose (CNF) in the studied levels and a significant difference at level ($P>0.05$) was obtained with the films of nanofibrillated cellulose developed in the presence of nisin, when one observed that the bigger the concentration of NIS and CNF, the higher the maximum resistance to the films traction. The elongation at break obtained significant difference at level $P>0.05$ and it was also affected by the presence of CNF and NIS. When both factors were combined in their maximum concentrations there was an increase in the value of elongation at break that were analyzed. The elasticity module did not obtain significant difference at level ($P>0.05$). In maximum concentrations of NIS and CNF there was a reduction of this parameter and for the intermediate concentrations of NIS and CNF as well. The films thermogravimetric analyses presented a degradation temperature that ranged from 241 to 349 °C between the treatments. The steam water permeability rate (TPVA) reduced with the maximum concentration of 10 % of CNF in the pectin films. The CNF worked as a physical barrier formed with the nanofibrils dispersion in the polymeric matrix making the passage of water steam difficult. According to the obtained results,

one can conclude that the films with nanofibrillated cellulose and nisin developed in this research have thermal stability, mechanical properties and antimicrobial activity which are viable for several applications, such as in the development of active package for food.

Key words: nanocellulose, nanofibrillated cellulose, pectin and nisin z.

1.Introdução

A questão do crescente acúmulo de resíduo não biodegradável nos centros urbanos, aliado às dificuldades de reciclagem da maioria das embalagens, têm gerado sérias preocupações à sociedade e grande interesse para solucionar esta problemática, já que esses fatores constituem grandes problemas ambientais. Desta forma, o desenvolvimento e aplicação de filmes de pectina, como embalagens para alimentos, poderiam fornecer uma alternativa viável e correta ecologicamente (OLIVEIRA *et al.*,2016).

Os biopolímeros são polímeros ou copolímeros produzidos a partir de matérias primas de fontes renováveis, como: milho, cana-de-açúcar, celulose, quitina, pectina e outros, sendo na sua maioria biodegradáveis. As fontes renováveis são assim conhecidas por possuírem um ciclo de vida mais curto comparados com as fontes fósseis, como o petróleo, o qual leva milhares de anos para se formar (PEREIRA *et al.*,2013).

Os polímeros biodegradáveis têm despertado enorme interesse, pois representam uma alternativa real para substituir os polímeros não biodegradáveis principalmente em aplicações de curto prazo. Os polímeros biodegradáveis foram desenvolvidos para serem empregados em indústrias de embalagens, em setores agrícolas e de liberação de fármacos. Porém os polímeros biodegradáveis possuem desempenho mecânico limitado e alto custo quando comparados com os polímeros não biodegradáveis (MOURA, 2013).

Um dos materiais mais promissores para serem utilizados como nanoreforço em polímeros biodegradáveis é a celulose. A celulose é a biomassa mais abundante no planeta e pode ser obtida de fontes naturais (LAVORATTI, 2015). É necessário dar um destino a esse resíduo de celulose, e a sua transformação em nanocelulose é uma alternativa viável. As nanoceluloses estão em escala nanométrica, como a celulose nanofibrilada, podem ser uma alternativa viável devido as suas propriedades mecânicas e alta cristalinidade, além de serem provenientes de fontes naturais e renováveis tais como a madeira e resíduo agrícola por exemplo (KAUSHIK *et al.*, 2010; CHERIAN *et al.*, 2011).

Entre as fibras vegetais existentes na biomassa, as fibras do bagaço de cana-de-açúcar representam um resíduo agroindustrial volumoso que pode ser

empregado como fonte de nanocelulose (celulose nanofibrilada) para nanoreforço em embalagem ativa biodegradável. Sendo o Brasil um país caracterizado pela economia agroindustrial e um dos maiores produtores mundiais de cana-de-açúcar (UNICA, 2016), surge grande expectativa na busca por adaptar as fibras vegetais como o resíduo do bagaço da cana-de-açúcar no uso como nanoreforço em matrizes poliméricas e biopolímeros.

A embalagem ativa biodegradáveis constitui uma ferramenta complementar para a conservação de alimentos, podendo garantir que todos os procedimentos adotados para a obtenção de um produto final de qualidade serão assegurados (COZMUTA *et al.*, 2015).

Esta tecnologia, em que ocorre uma interação desejável, entre produto e embalagem é denominada embalagem ativa (GOMES *et al.*, 2015). Embalagem ativa é aquela que, através da utilização de um agente ativo incorporado no material polimérico ou adicionado as embalagens, promove funções adicionais às embalagens alimentícias, como por exemplo ação antimicrobiana.

A deterioração de alimentos por ação de micro-organismos é uma das principais causas de perdas da qualidade e segurança. Neste contexto, o emprego de nisina Z, na produção de filmes ativos aplicados em sistema de embalagens antimicrobianas para alimentos, mostra-se como uma tecnologia interessante. A nisina Z tem sido cada vez mais utilizada como bioconservante para incorporação direta em filmes ativos de forma eficaz contribuindo para o aumento da vida de prateleira dos alimentos (KHAN *et al.*, 2015).

Objetivou-se com este trabalho desenvolver e caracterizar filme ativo biodegradável à base de pectina incorporado com antimicrobianos (nisina Z) e celulose nanofibrilada (CNF) extraídos do bagaço da cana-de-açúcar.

2. Materiais e Métodos

Os filmes incorporados com diferentes concentrações de nisina z e celulose nanofibrilada foram produzidos no laboratório de Embalagem do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa, Brasil.

2.1. Avaliação da atividade antimicrobiana da Nisina Z

As análises microbiológicas foram realizadas no Laboratório de Embalagens. Todos tratamentos foram realizados com três repetição e em duplicata.

2.2.1 Micro-organismos

Culturas puras *Escherichia coli* (ATCC 11229), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) foram usados para testar a atividade antimicrobiana “*in vitro*” das nisina z.

2.3 Delineamento Experimental

Foi utilizado o delineamento composto central rotacional (DCCR) com duas variáveis para estudar os efeitos combinados da nanocelulose como a celulose nanofibrilada (CNF) e nisina z (NIS) sobre as propriedades mecânicas dos filmes de pectina (PEC) e avaliado pela Metodologia de Superfície de Resposta (MSR). O modelo estatístico que representa a influência do CNF e NIS sobre as propriedades mecânicas e óticas dos filmes foram desenvolvido e validado através da análise de variância (ANOVA). Para melhores resultados no modelo de regressão, utilizou-se o procedimento de exclusão de variáveis “(stepwise)” a partir da análise da estatística t das variáveis, conforme realizado por Li (2012). Neste procedimento, todas as variáveis são incluídas no modelo e vão sendo retiradas uma a uma, em função da contribuição significativa dada pela análise da significância da estatística t. A técnica consiste em eliminar as variáveis não significativas, que correspondem àquelas que apresentam o menor

valor da estatística t, em valor absoluto, por se tratar das variáveis de menor importância (HAIR Jr *et al.*, 2009). Para as variáveis significativas, procedeu-se a análise de correlação para quantificar o grau de correlação com a variável resposta. As análises de microscopia de força atômica foi validado a rugosidade dos filmes através da análise de variância (ANOVA) com testes de médias tukey. As análises termogravimétrica foram submetidos à análise descritiva.

2.4. Produção do filme a base de pectina

Os filmes de pectina foram produzidos pelo método “*casting*”, de acordo com Azevedo (2014). As concentrações de celulose nanofibrilada (CNF) e nisina z foram adicionadas no filme de pectina e foram determinadas a partir dos resultados obtidos nos testes difusão em ágar. A celulose nanofibrilada (gel) e a nisina z foram incorporados em relação à massa do polímero.

Os filmes pectina (PEC) foram desenvolvidos segundo Azevedo 2014 com modificações, sendo PEC e glicerol fixados em 6 % (m/v) e 40 % (m/v), respectivamente, baseado em pré-testes. O filme PEC foi preparado dissolvendo-se 3,5 g (m/v) de PEC com 1,4 g de glicerol (GLI) (baseado na massa de PEC) em 120 mL de água deionizada respectivamente, sendo ambos submetidos à agitação contínua em agitador magnético durante 30 min, em temperatura de 75 °C. Os demais filmes foram desenvolvidos conforme filme PEC, variando o gel da CNF(0 e 10 g/100 g de PEC) e nisina z (0 e 10 g/100 g de PEC) dispersos com glicerol. Após agitação e dissolução da solução filmogênica, as soluções foram vertidas em placas de vidro. O controle de espessura foi efetuado por volume aplicado no suporte, correspondente a 120 mL. Em seguida, os filmes com dimensões 18 x 30 cm, foram secos em temperatura 30 °C durante 48 h e umidade relativa de 37 % garantindo evaporação lenta do solvente e formação do filme. Os tratamentos estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Tratamentos dos filmes de pectina incorporados com celulose nanofibrilada (CNF) e nisina z (NIS).

Tratamentos	Concentrações*%
1	CNF1,45 NIS1,45
2	CNF 10,00 NIS5,00
3	CNF 5,00 NIS10,00
4	CNF 5,00 NIS5,00
5	CNF 1,45 NIS1,45
6	CNF 8,55 NIS8,55
7	CNF 5,00 NIS5,00
8	CNF 8,55 NIS1,45
9	CNF 5,00 NIS10,00
10	CNF 5,00 NIS5,00
11	CNF 0,00 NIS5,00

Celulose nanofibrilada (CNF) e nisina z (NIS).

2.4.1 Atividade antimicrobiana “*in vitro*” dos filmes

Para avaliar a atividade antimicrobiana do filme ativo foi aplicado o método de difusão em ágar segundo Hanusová *et al.* (2010) modificado, colocando-se discos ($\varnothing = 1$ cm) do filme ativo incorporado com a nisina z e celulose nanofibrilada sobre a superfície do plate count agar–PCA (Merck) contendo suspensão micro-organismos na concentração (10^5 UFC/mL) citados no item 2.1.1. Em seguida, o inóculo foi espalhado sobre a superfície do ágar com auxílio de alça de Drigalsky. Posteriormente, as placas foram incubadas a 35 °C por 24 horas. A atividade inibidora foi quantificada por medição com paquímetro do diâmetro total (diâmetro do disco mais zona de inibição).

2.5 Caracterizações dos filmes de pectina produzidos incorporados com celulose nanofibrilada e nisina z.

2.5.1 Espessura

A espessura média dos filmes (μm) foi mensurada com auxílio de micrômetro (MITUTOYO, modelo 547-401, Japão). As medidas foram realizadas

em dois corpos de prova de cada tratamento em três repetições, realizando-se as medidas em dez pontos aleatórios e diferentes dos mesmos (CAMILLOTO, 2009).

2.5.2 Caracterização morfológica e topográfica dos filmes

A) Microscopia de força atômica

A microtopografia e a rugosidade da superfície dos diferentes filmes foram avaliadas utilizando-se o Microscópio de Força Atômica (NT-MDT modelo NTEGRA PRIMA) realizada no Departamento de Física da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa - MG, Brasil.

Amostras dos filmes foram cortadas e fixadas no suporte de porta amostras do microscópio, com auxílio de fita dupla-face. Em seguida, cada amostra foi analisada utilizando o modo de contato intermitente com cantilever macio e constante de força $0,02 \text{ N}\cdot\text{m}^{-1}$. Para cada tratamento, foram realizadas varreduras de $60 \mu\text{m} \times 60 \mu\text{m}$, onde serão determinado a rugosidade média e a rugosidade quadrática dos filmes (CAMILLOTO, 2009).

B) Propriedades mecânicas

Os filmes produzidos foram submetidos a testes mecânicos para avaliação da resistência à tração (MPa), alongamento na ruptura (%) e módulo elástico (MPa) de acordo com a norma ASTM D882–91 (ASTM, 2002), utilizando-se a Máquina Universal de Testes Mecânicos (INSTRON Corporation, modelo 3367). Foram testados 5 corpos de prova de cada tratamento com cinco repetições no ponto central, com dimensões de 10 cm de comprimento e 2,5 cm de largura. A máquina foi operada com carga de 1 kN, velocidade de separação das garras de $12,5 \text{ mm}\cdot\text{min}^{-1}$ e distância inicial de 50 mm (ASTM, 2002).

C) Taxa de permeabilidade a vapor d'água (TPVA)

A Taxa de permeabilidade a vapor d'água (TPVA) dos filmes foram determinadas por meio do método dessecante, seguindo a ASTM E 96/ E 96M – 05 (ASTM, 2005) com algumas modificações. Foram utilizadas cápsulas

circulares ($\varnothing = 82,3$ mm) com paredes impermeáveis, contendo 30 g de cloreto de cálcio anidro (Vetec) com granulometria entre 600 μm e 2,36 μm . Os filmes foram vedados com parafina histológica (Synth) na junção filme/cápsula. As cápsulas foram acondicionadas em dessecadores contendo solução saturada de cloreto de sódio (Vetec), com o objetivo de manter a umidade relativa em torno de 75 %. O ganho de massa associando a umidade permeada pelo filme foi avaliado por meio de pesagens diárias até massa constante.

A TPVA foi expressa em $\text{g}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{dia}^{-1}$. As análises foram realizadas com três repetições em duplicata.

D) Termogravimétrica (TGA)

As análises termogravimétricas foram realizadas com auxílio de um analisador térmico DTG (modelo 60, Shimadzu - Japão), onde cerca de 5 a 10 mg de amostra de filme de pectina contendo celulose nanofibrilada e nisina z foram aquecidos na faixa de temperatura de 20 °C a 600 °C com razão de aquecimento de 10 °C $\cdot\text{min}^{-1}$ para cada tratamento. A vazão de nitrogênio foi mantida em 60 $\text{cm}^3\cdot\text{min}^{-1}$ (CHANG *et al.*, 2010). As análises foram realizadas em duplicata.

E) Espectroscopia de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

A espectroscopia de absorção na região do infravermelho foi realizada com o objetivo de identificar as interações entre a matriz polimérica (pectina), celulose nanofibrilada e nisina adicionados. Os filmes de pectina com celulose nanofibrilada e nisina foram fixados no equipamento FT-IR Nicolet 6700 (Thermo Scientific, EUA) pelo suporte para filmes. Os espectros de absorção na região do infravermelho foram obtidos em ampla região de varredura de 4000 a 400 cm^{-1} , com resolução de 2 cm^{-1} (Damasio, 2015).

3.Resultados e Discussão

3.1.Atividade antimicrobiana “*in vitro*” dos filmes

A atividade antimicrobiana do filme ativo foi avaliada para culturas puras *Escherichia coli* (ATCC 11229), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) pelo teste de difusão em ágar. No teste de difusão em ágar para todos os tratamentos testados ocorreu diferencia significativa ($P>0,05$) (Tabela.2). Os tratamentos 11 e 9 apresentaram maiores zonas de inibição de $1,8 \pm 0,2$; $1,5 \pm 0,2$ cm de diâmetro para a *Escherichia coli* (Figura.1) .

Os tratamentos 10, 7 e 3 não apresentaram zonas inibição para *E.coli*. A ação da nisina z para o micro-organismos gram-negativo (*E.coli*) foi pouco eficaz quando comparado com micro-organismos gram-positivos (*S. aureus*).

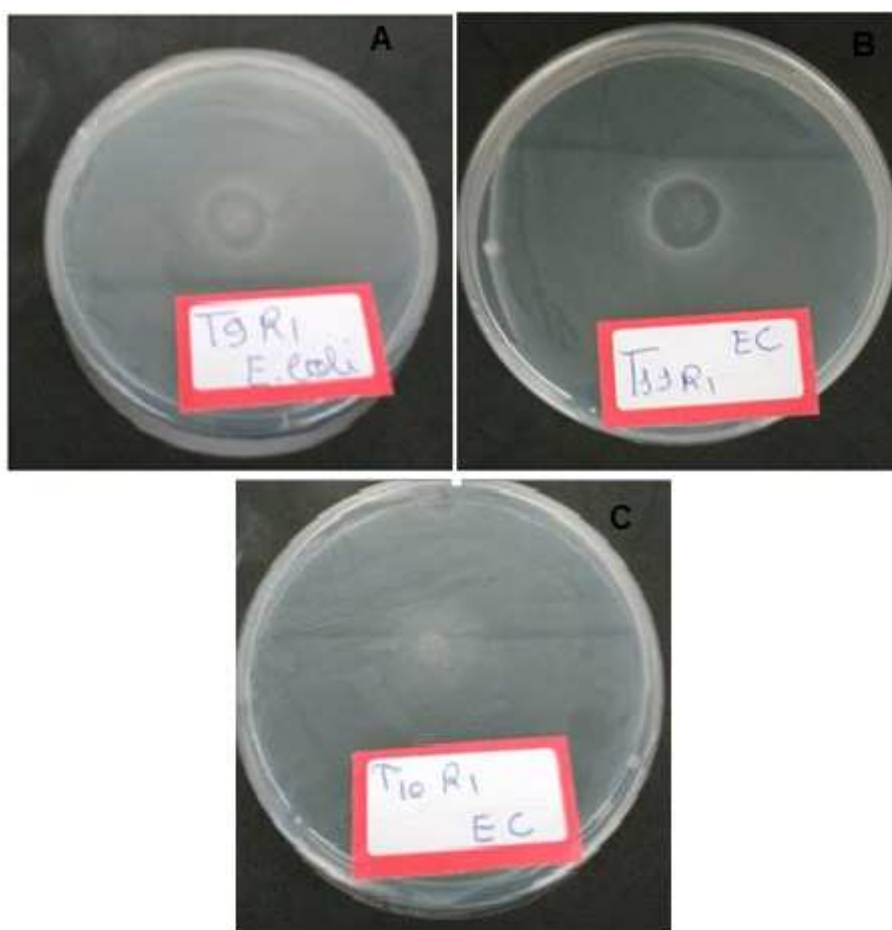


Figura1. Teste de difusão em ágar dos filmes de pectina incorporado com celulose nanofibrada (CNF) e nisina Z (NIS) para o micro-organismos *Escherichia coli*.

A) Tratamento 9 (5 % de CNF 10 % NIS); B) Tratamento 11 (0 % CNF 5 % NIS); C) Tratamento 10 (5 % CNF 5% NIS)

Tabela 2. Estimativas dos coeficientes de DCCR, na avaliação da atividade antimicrobiana dos filmes de pectina com concentrações de NIS (1,45; 5; 8,55 e 10 %) e CNF (0; 1,45; 5; 8,55 e 10 %).

Variável	Equação	R ²	FAJ ^b
<i>E. coli</i>	$2,13^* - 0,334^* \text{CNF} - 0,210^* \text{CNF}^2 + 0,0347^* \text{NIS}^2 - 0,0400^* \text{CNF} \cdot \text{NIS}$	52,41%	0,317
<i>S. aureus</i>	$1,390^* + 0,455^* \text{NIS} - 0,0015^* \text{CNF} \text{CNF}^2 - 0,0261^* \text{NIS}^2 - 0,0422^* \text{CNF} \cdot \text{NIS}$	67,82%	0,138

^a Foi utilizado o modelo Quadrático Completo e os coeficientes não apresentados na equação foram não significativos ($p > 0,05$).

* Significativo pelo teste t de Student ($P < 0,05$)

^b FAJ: Valor-P para a falta de ajuste do modelo

Os tratamentos que variaram sua concentração de 5 % a 10 % de nisina z obtiveram maior halo de inibição (Figura.2). Apesar dessa ação inibitória da nisina z ela ainda é pouca efetiva para o micro-organismo *E. coli* que é gram-negativo.

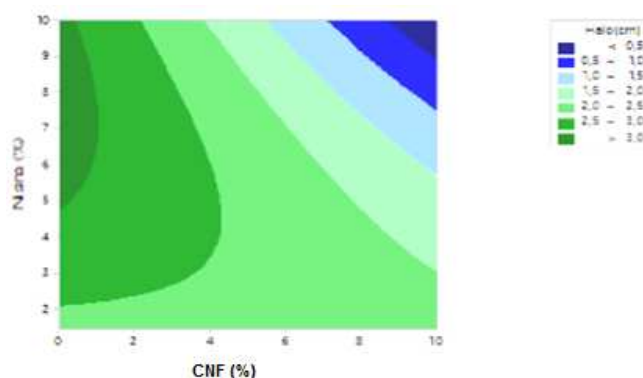


Figura 2. Superfície de resposta da atividade antimicrobiana dos filmes de pectina incorporados com celulose nanofibrilada (CNF) e nisina z (NIS) para o micro-organismo *E. coli*.

A atividade antimicrobiana do filme ativo foi avaliada para cultura pura *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) pelo teste de difusão em ágar. No teste de difusão em ágar para todos os tratamentos testados ocorreu uma diferença significativa ($P > 0,05$). Os tratamentos que obteve-se maior zona de inibição foi na concentração máxima de 10 % de nisina z (Figura 3) referente aos tratamentos 3 e 9. A presença da CNF nos filmes de pectina não afetaram a ação do antimicrobiano (nisina z) quando avaliado na sua concentração máxima.

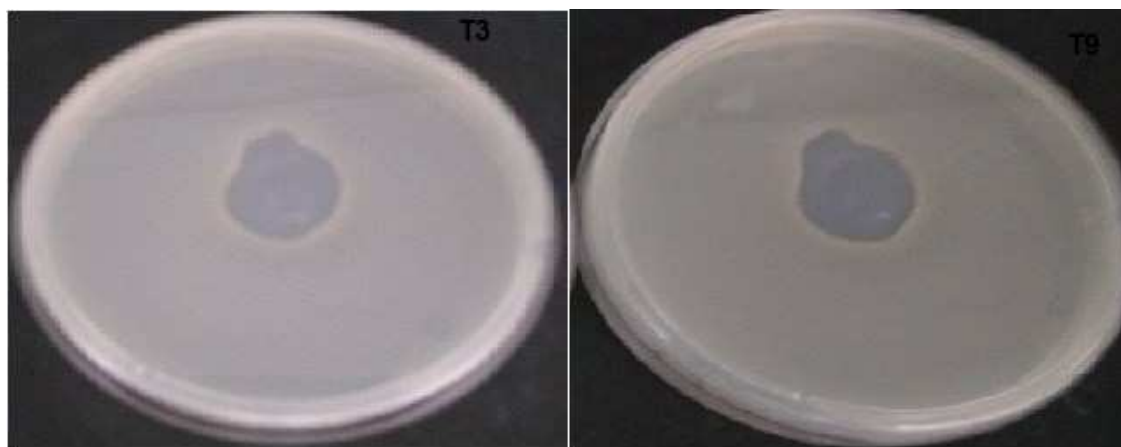


Figura 3. Teste de difusão em ágar dos filmes de pectina incorporado com celulose nanofibrada (CNF) e nisina Z (NIS) para o micro-organismo *Staphylococcus aureus*. A) Tratamento 3 (5 % de CNF 10 % NIS); B) Tratamento 9 (5 % de CNF 10 % NIS).

Wang *et al.* (2013) avaliaram a atividade antibacteriana de filme com nisina contra o *S. Aureus* no seu estudo foi realizada em meio de cultura líquido e o resultado encontrado foi que a concentração relativa de *S. aureus* diminuiu acentuadamente a partir de 100 % para 11,65 % quando o teor de nisina aumentou de 0 a 10 %.

Wang *et al.*, (2015) relataram no seu estudo que quanto maior a concentração de nisina maior foi a zona inibidora para do *S. aureus*, neste estudo obteve resultado similar. Duram *et al.*, (2016) desenvolveram uma embalagem ativa com nisina e natamicina para o controle destes micro-organismos estudados .

Devido ao seu efeito sobre as bactérias gram-positivas, especialmente a *S. aureus*, muitos estudos reportam a incorporação de nisina em vários tipos de filmes feitos de celulose, pectina, náilon, isolado protéico de soro, hidroxipropil metil celulose, zeína, amido, quitosana, PBAT, proteína de soja, carboximetil celulose e a sua utilização como embalagem ativa para reduzir as bactérias indesejáveis nos gêneros alimentícios (NATRAJAN e SHELDON, 2000; COMA *et al.*, 2001; TEERAKARN *et al.*, 2002; CHOLLET *et al.*, 2008; GADANG *et al.*, 2008; KRISTO *et al.*, 2008; NEETOO *et al.*, 2008; NGUYEN *et al.*, 2008; BASTARRACHEA *et al.*, 2010, CAO-HOANG *et al.*, 2010; IMRAN *et al.*, 2010, BASCH *et al.*, 2013).

Incorporação de nisina z nas concentrações de 1,45 e 10 % (m/m) no filme de pectina apresentou resultados satisfatórios quanto à inibição de *S.*

Aureus (Figura 4). Said et al,(2016) também utilizaram nisina z para a ação antimicrobiana sinérgica contra *Staphylococcus aureus* no seu estudo.

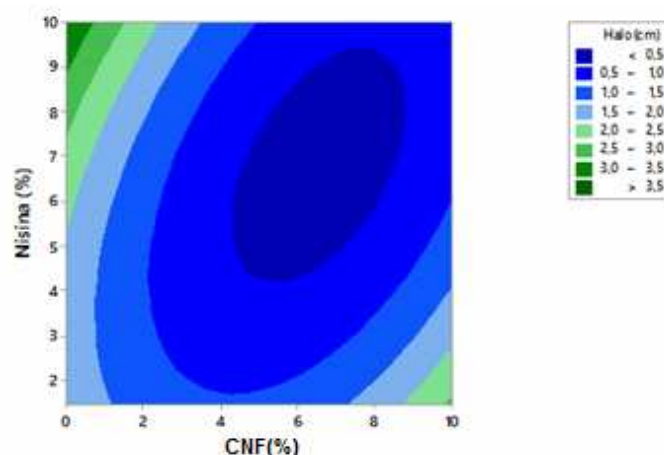


Figura 4. Superfície de resposta da atividade antimicrobiana dos filmes de pectina incorporados com celulose nanofibrilada(CNF) e nisina Z (NIS) com controle do micro-organismos *S. aureus*.

Reichenberg *et al.* (2015) desenvolveram uma blenda polimérica com antimicrobiano nisina, no resultado encontrado houve redução dos micro-organismos gram-positivos. Os resultados foram similares ao encontrado neste estudo.

O filme antimicrobiano incorporado com nisina z, apresentou potencial de aplicação como embalagem ativa antimicrobiana para o acondicionamento de alimentos como por exemplo queijos, estendendo assim a vida de prateleira e assegurando a segurança alimentar. Segundo Jagus *et al*,(2016) a nisina z é um dos antimicrobianos mais eficientes para controlar a contaminação dos alimentos.

3.2.Espessura

A espessura dos filmes de pectina não foram afetados pela adição de CNF nos níveis de concentrações estudados (1,45 % a 10 %). Os resultados da espessura mostraram que essa propriedade teve diferença significativa entre os filmes nanocompósitos desenvolvidos com base no DCCR quando houve adição de nisina z nas concentrações estudadas (1 e 10 %) (Tabela.3).

Tabela 3. Estimativas dos coeficientes de DCCR, da presença de celulose nanofibrilada na espessura dos filmes de pectina.

Espessura	Equação ^a	R ²	FAJ ^b
(mm)	$0,1005^* + 0,00173 \text{ NIS}^* + 0,000643^* \text{ CNF}^2$	0,1781	0,327

^a Foi utilizado o modelo Quadrático Completo e os coeficientes não apresentados na equação foram não significativos ($p > 0,05$).

* Significativo pelo teste t de Student ($P < 0,05$)

^b FAJ: Valor-P para a falta de ajuste do modelo

Um fator que contribuiu para o aumento da espessura foi a adição da nisina z, quanto maior a concentração de nisina maior a espessura do filme de pectina (Figura.5). Assim, as espessuras dos filmes produzidos foram uniformes, o que é desejável para a realização das comparações entre os tratamentos nas análises de caracterizações.

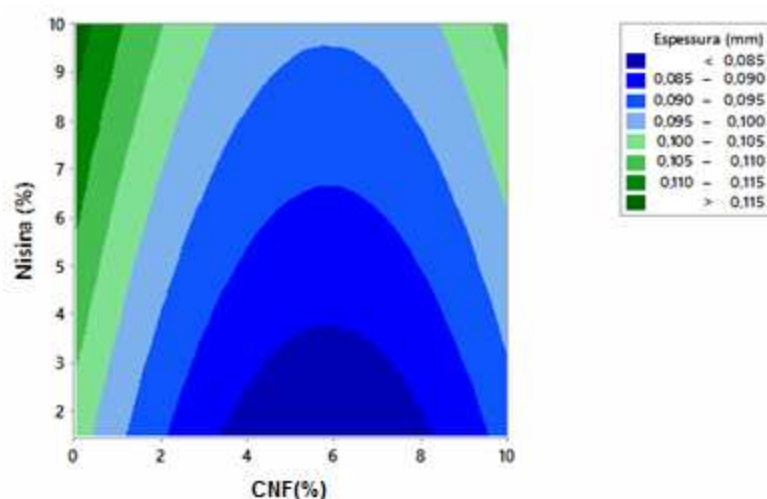


Figura 5. Espessura dos filmes de pectina incorporados com celulose nanofibrilada(CNF) e nisina z (NIS).

3.3 Caracterização morfológica e topográfica dos filmes

A) Microscopia de força atômica e a rugosidade da superfície dos filmes

As fotomicrografias obtidas por microscopia de força atômica permitiram

avaliar a microtopografia da superfície dos filmes em três dimensões e ainda determinar a rugosidade média dos filmes. Com base em imagens de topografia com tamanhos de $5 \times 5 \mu\text{m}^2$ obtidas por AFM foram observados que as rugosidades das matrizes do filme de pectina foram alteradas significativamente após a adição do celulose nanofibrilada e nisina z..

Os tratamentos com nanocelulose PEC/CNF/NIS diferenciaram entre si, por apresentarem uma superfície mais irregular e porosa, sendo observados alguns agregados, representados pelas áreas mais claras. Entretanto, ocorreu uma grande alteração da microtopografia dos filmes nas diferentes concentrações de CNF. Isto pode ser explicado pela dispersão da CNF no polímero em função da interação favorável (Figura.6 ,7,8 e 9).

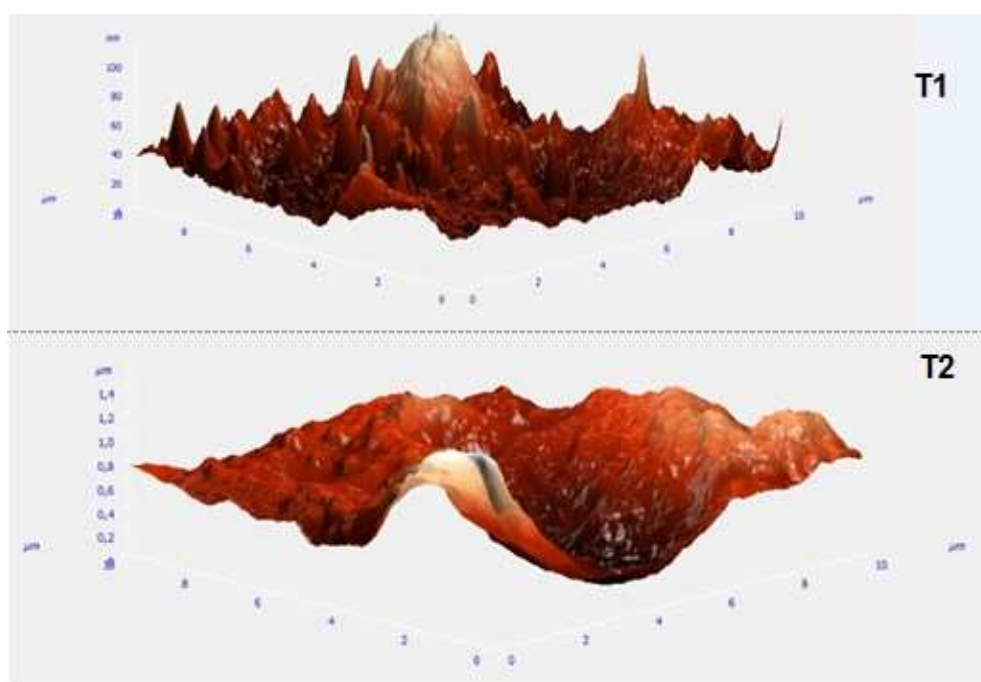


Figura 6. Topografia em 3D dos filmes de pectina adicionado com celulose nanofibrilada(CNF) e nisina z (NIS) **T1** (1,45 % CNF 1,45 % NIS) **T 2**(10 % CNF 5 % NIS)

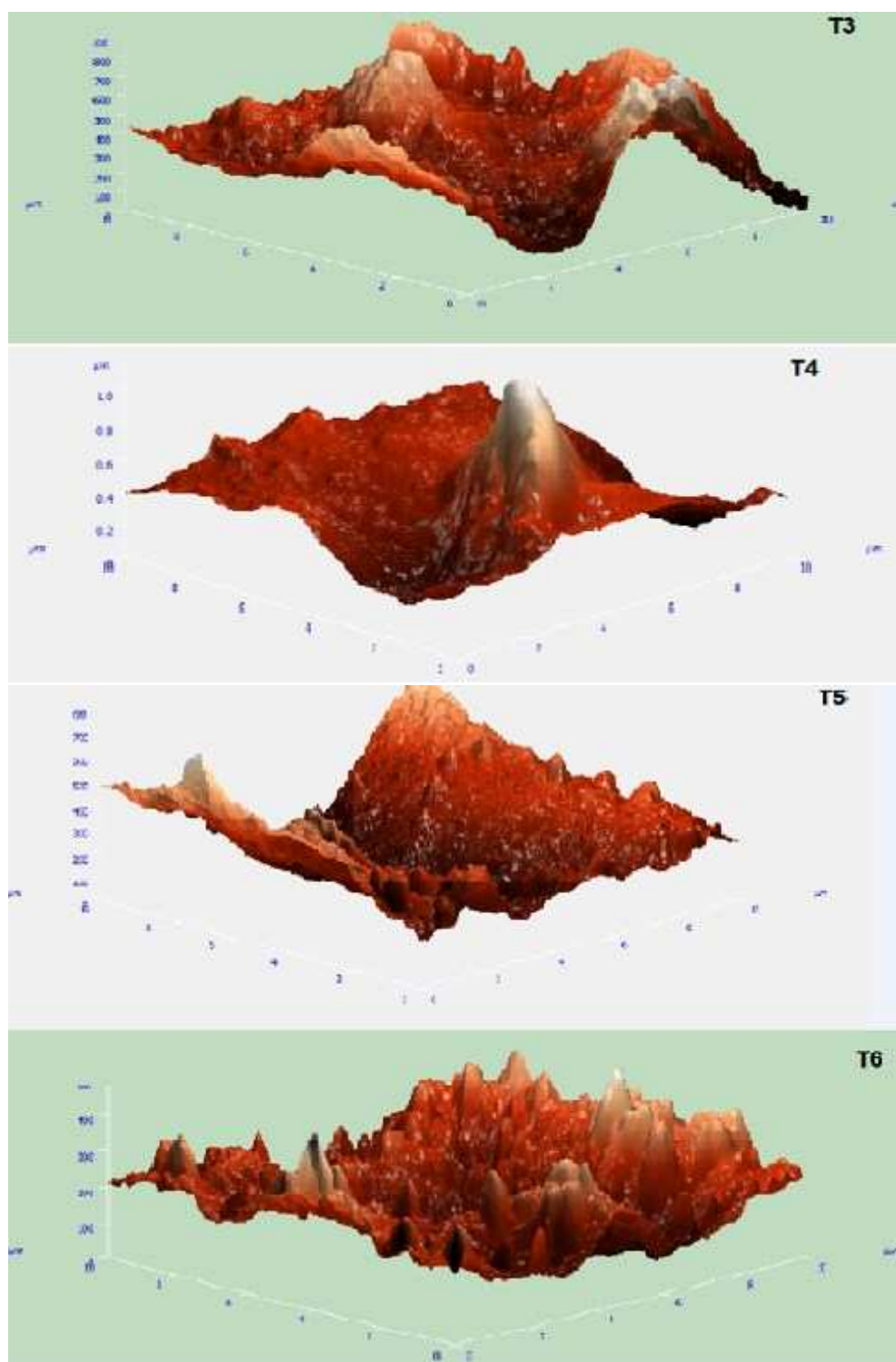


Figura 7. Topografia em 3D dos filmes de pectina adicionado com celulose nanofibrilada(CNF) e nisina z (NIS): T 3 (5 % CNF10 % NIS); T 4 (5 % CNF 5 % NIS); T 5 (1,45 % CNF 1,45 % NIS);T 6 (8,55 % CNF 8,55 % NIS)

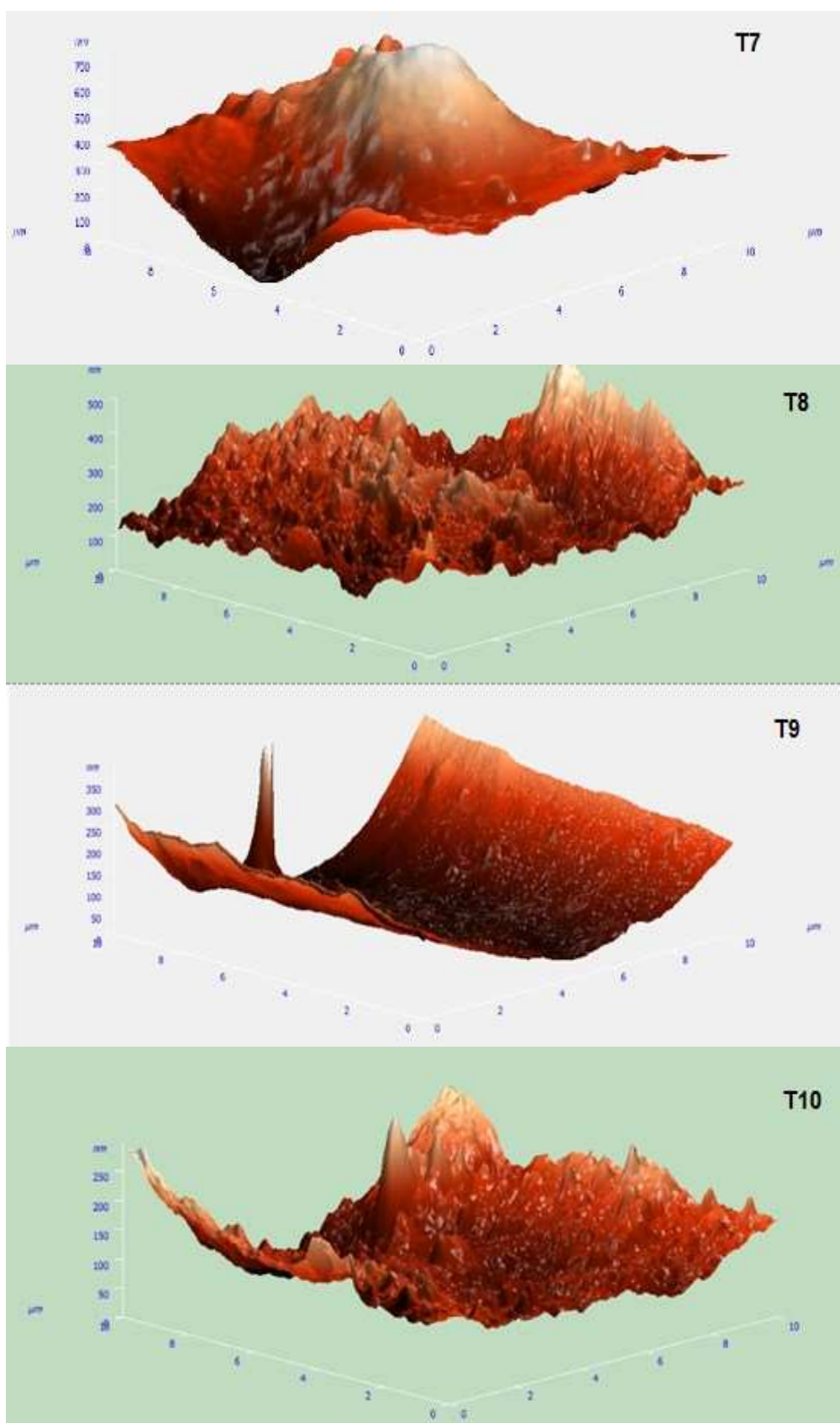


Figura 8. Topografia em 3D dos filmes de pectina adicionado com celulose nanofibrilada (CNF) e nisina z (NIS): **T 7**(5 % CNF 5 % NIS);**T 8**(8,55 % CNF 1,45 % NIS);**T 9** (5 % CNF 10 % NIS); **T 10** (5 % CNF 5 % NIS)

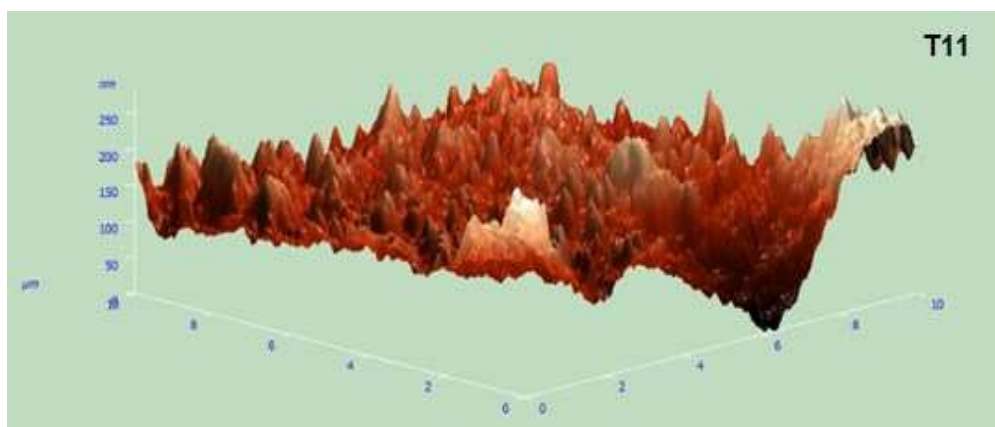


Figura 9-Topografia em 3D dos filmes de pectina adicionado com celulose nanofibrilada (CNF) e nisina z (NIS):**T11** (0 % CNF 5 % NIS)

A rugosidade média (Ra) dos filmes contendo a celulose nanofibrilada com nisina z, diferiu em relação ao filme sem celulose nanofibrilada (T11). Para os demais tratamentos observou-se diferença significativa, sendo que estes apresentaram uma rugosidade média maior nos tratamentos 3 e 2 (Tabela 4). Estudos mostraram que o aumento da rugosidade na superfície de um polímero após o recobrimento por plasma pode ser resultado da diferença das taxas de erosão, causada pelo bombardeamento de íons, entre as regiões amorfas e cristalinas do polímero (EGITTO *et al.*,1994).Mais recentemente, foi demonstrado que a rugosidade da superfície de filmes depositados por plasma contribuíram para a obtenção de filmes ultra-hidrofóbicos (MILLER *et al.* ,1996).

De acordo com a Tabela 4, observou que a presença da celulose nanofibrilada provocou um aumento na rugosidade média do filme contendo nisina z. Provavelmente, o aumento da rugosidade foi provocado pela baixa interação entre nisina/celulose nanofibrilada/polímero, permitindo a formação de agregados que alteraram a rugosidade do filme

Tabela 4. Valores médios de Ra obtidos para os diferentes tratamentos.

Tratamentos	Ra (nm)	
T 3 (5 % CNF 10 % NIS)	187,9	A
T 2 (10 % CNF 5 % NIS)	187,9	A
T 4 (5 % CNF 5 % NIS)	111,5	B
T 7 (5% CNF 5% NIS)	106,6	C
T 10 (5 % CNF 5 % NIS)	103,2	D
T 6 (8,55 % CNF 8,55 % NIS)	56,96	E
T 8 (8,55 % CNF 1,45% NIS)	54,61	F
T 9 (5 % CNF 10 % NIS)	50,82	G
T 5 (1,45 % CNF 1,45 % NIS)	30,70	H
T 11 (0 % CNF 5 % NIS)	21,15	I
T 1 (1,45 % CNF 1,45 % NIS)	11,82	J

Médias seguidas de letras diferentes na coluna diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Os tratamentos 1, 5 e 11 foram que tiveram menor média de rugosidade um fator pode ser observado foram os tratamentos que possuem a menor concentração de celulose nanofibrilada. A redução dos valores médios de rugosidade (Ra), reforçaram que baixos valores encontrados para estes parâmetros indicaram uma maior dispersão e individualização dos feixes de nanofibras, tornando-as mais homogêneas e estáveis (KABOORANI *et al.* 2012).

Antouniou *et al.* (2015) verificaram que a incorporação das nanopartículas de quitosana na matriz polimérica proporcionaram aumento da rugosidade do filme, e sugeriram que a presença dos pontos agudos presente na fotomicrografia era atribuído à presença do nanocompósitos, e atribuíram que o aumento da rugosidade contribui para a melhoria da barreira ao vapor de água e propriedades mecânicas do filme. Este mesmo comportamento foi observado por Azeredo *et al.* (2010) com adição de nanofibra de celulose em filme de quitosana plastificado com glicerol.

A rugosidades dos filme com celulose nanofibrilada foi um fator determinante para a melhorias das propriedades mecânicas. Isso significa, dentre outras coisas, melhorias nas propriedades mecânicas, uma vez que quanto maior a individualização dos feixes, maior o número de hidroxilas livres e área superficial destes nanoreforços, melhorando assim, sua interação com a matriz e proporcionando um melhor desempenho como reforço (BILBAOI-SAINZ *et al.*, 2011). A melhoria da distribuição das nanofibras na matriz conduziu a um

empacotamento mais eficiente e a uma estrutura mais compacta (P ETERSSON *et al.* 2007; LU *et al.* 2008; JONOOBI *et al.* 2010; XU *et al.* 2013).

B) Propriedades Mecânicas

Os resultados encontrados com base no delineamento composto central rotacional mostram que a resistência máxima à tração foi afetada pela adição de CNF nos níveis estudados, e obteve diferenças significativa ($P < 0,05$), entre os filmes com celulose nanofibriladas desenvolvidos na presença de nisina z. O alongamento na ruptura apresentou diferença significativa ($P < 0,05$), foi afetado pela presença de CNF e NIS. O módulo de elasticidade não apresentou diferença significativa ($P < 0,05$), foi afetado com adição de CNF e NIS (Tabela 5)

Tabela 5. Estimativas dos coeficientes de DCCR, na avaliação das propriedades mecânicas do filme de pectina com concentrações de CNF (1 a 10 %) e Nis(1 a 10 %).

Parâmetros	Equação ^a	R ²	FAJ ^b
Resistência Máxima a tração (MPa)	$3,412^* - 0,459\text{CNF}^* - 0,229\text{NIS}^* + 0,0361\text{CNF}^{2*} + 0,0471\text{CNF.NIS}^*$	0,9406	0,037
Along. Ruptura (%)	$39,03^* - 2,13\text{NIS}^* + 0,139\text{NIS}^{2*} + 0,237\text{CNF.NIS}^*$	0,9535	0,004
M. Elasticidade (MPa)	$-7^* - 3,49\text{CNF}^{2*} - 3,03\text{NIS}^{2*}$	0,9549	0,002

^a Foi utilizado o modelo Quadrático Completo e os coeficientes não apresentados na equação foram não significativos ($p > 0,05$).

* Significativo pelo teste t de Student ($P < 0,05$)

^b FAJ: Valor-P para a falta de ajuste do modelo

A resistência máxima à tração dos filmes foram afetados pelos níveis de CNF (1,45 a 10 %) estudados, quanto maior a concentração de NIS e CNF maior foi o resistência máxima à tração do filme (Figura 10). O módulo de elasticidade apresentou pequena redução com adição das concentrações máximas de NIS e CNF (Figura 12). Para concentrações intermediárias de NIS e CNF, o valor do módulo de elasticidade também foram intermediários Quando os dois fatores foram combinados em suas concentrações máximas houve aumento no valor de alongamento da ruptura analisados (Figura 11).

A adição de diferentes quantidades de CNF nos filmes de PEC promoveu influência significativa ($p < 0,05$) na resistência máxima à tração suportada pelos filmes com nanocompósitos CNF (Figura.10). Algumas propriedades mecânicas,

em especial a carga máxima de ruptura, estão diretamente relacionadas com as ligações de hidrogênio formadas entre as estruturas, e não necessariamente com a resistência das nanoceluloses em si (ABE e YANO, 2009).

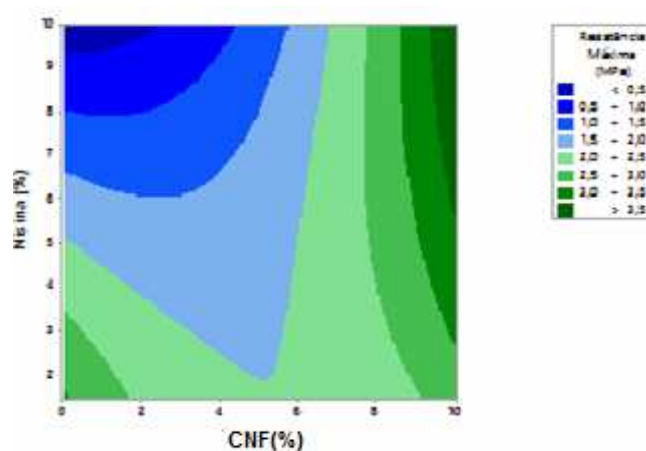


Figura 10. Resistência máxima á tração dos filmes de pectina incorporados com celulose nanofibrilada(CNF) e nisina z(NIS).

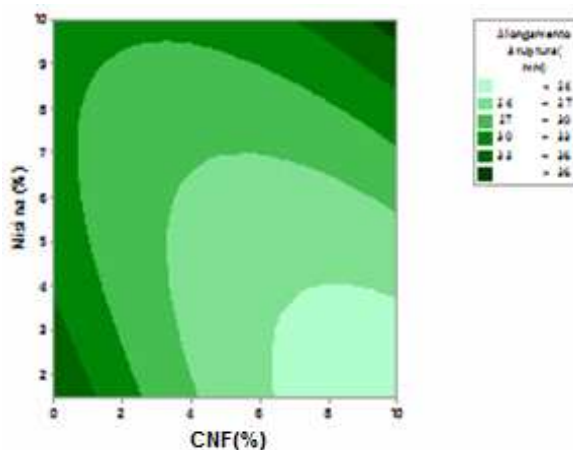


Figura 11. Alongamento a ruptura dos filmes de pectina incorporados com celulose nanofibrilada(CNF) e nisina z (NIS).

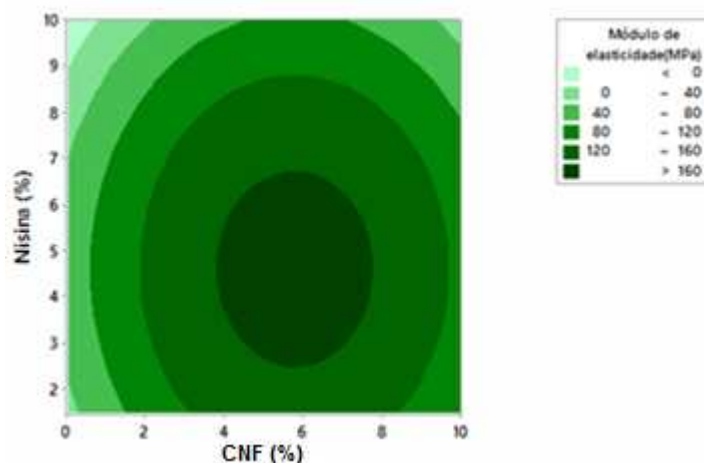


Figura 12. Módulo de elasticidade dos filmes de pectina incorporados com celulose nanofibrilada(CNF) e nisina z(NIS).

Segundo Júnior (2015), adição de 4,5 e 6,5 % de celulose nanofibrilada de bambu obtidas com 30 passagens pelo desfibrilador resultou em melhorias significativas ($p < 0,05$) para alongamentos dos bionanocompósitos. Com a inserção de 6,5 % de celulose nanofibrilada na matriz, os aumentos estimados para os valores de tensão e alongamento na ruptura foram de aproximadamente 24 e 51 %, respectivamente, em relação a blenda de controle.

Damasio (2015) mencionou no estudo que houve diferença significativa entre os tratamentos para a relação ao alongamento, ao comparar os tratamentos ocorreu um decréscimo de 49, 73 e 81 % para T1, T2 e T3, respectivamente. Esse fato pode ser explicado por Iwamoto et al. (2007), que relataram menor resistência à tração para os filmes produzidos, especialmente para a propriedade de alongação na ruptura devido ao excesso de componentes com menor razão de aspecto, que geralmente são rígidos e de fácil desprendimento da matriz.

O bionanocompósito reforçado (amido e álcool polivinílico) com 4,5 % de celulose nanofibrilada extraída de bambú apresentou valor significativamente maior ($p < 0,05$) de alongamento em relação as outras amostras, tornando o filme cerca de 29 % mais dúctil do que a blenda de controle (JÚNIOR, 2015)

O aumento das propriedades mecânicas dos filmes pode ser explicado pela densa rede de ligações de hidrogênio criadas pela maior área superficial produzida após o processo de desfibrilação da polpa celulósica (SPENCE *et al.*, 2010)

Correia (2015) reportou no seu estudo que compósitos extrusados com celulose nanofibrilada atuou de modo a melhorar a resistência mecânica essa melhoria pode estar associada à maior adesão entre as nanofibriladas e a matriz cimentícia.

Xu *et al.* (2013) compararam dois tipos de nanoceluloses (CNF e CNC) na matriz polimérica do polietileno, a CNF obteve a maior resistência mecânica e módulo de elasticidade do que CNC, mas alongamento a ruptura foi prejudicado pelo CNF devido emaranhamento e aglomeração de fibras, prejudicando o alongamento a ruptura dos filmes.

C) Espectroscopia na região do Infravermelho – FTIR

Os espectros avaliados são bastante similares, uma vez que se trata de materiais originados de um mesmo polímero-base (Figura.13). No entanto existem algumas regiões que podem ser diferenciadas, devido aos diferentes processos de obtenção. A banda larga em 3.332 cm^{-1} corresponde à vibração das ligações dos grupos -OH . Em 2.960 cm^{-1} tem-se a vibração das ligações dos grupos C-H . Essas bandas são características de materiais celulósicos e seus valores são consistentes com os encontrados por Lu *et al.* (2014), Liu *et al.* (2014) e Reddy *et al.* (2009). A vibração localizada na faixa espectral de $820\text{-}1296\text{ cm}^{-1}$ é atribuída a bandas de glicerol correspondendo a bandas de vibrações de C-C e C-O (GUERRERO *et al.*, 2010, BARBOSA, 2011) .

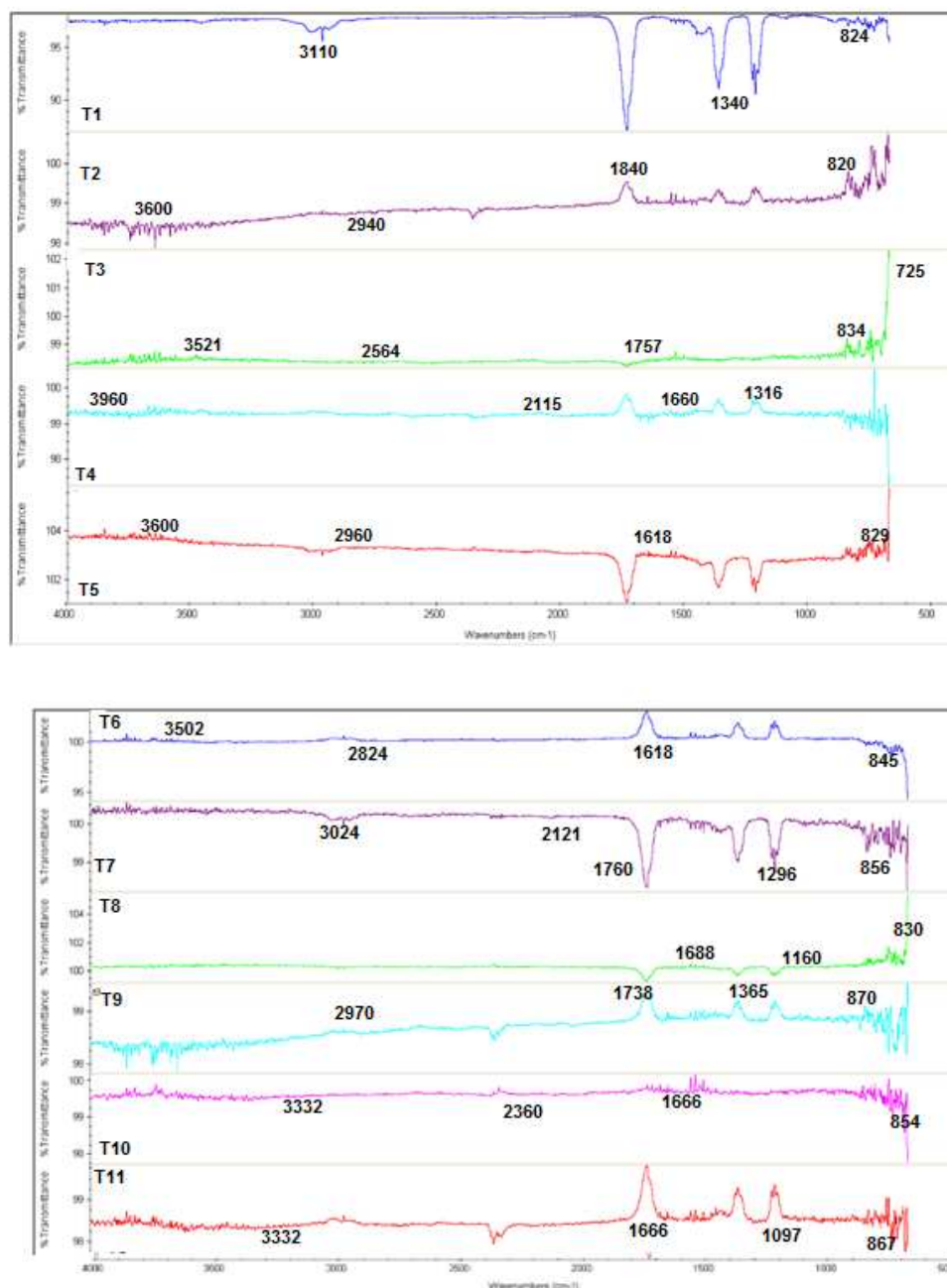


Figura 13. Espectroscopia no infravermelho dos filmes de pectina incorporado com celulose nanofibrilada e nisina. T1) CNF1,45%NIS1,45%; (T2) CNF 10%NIS5%; (T3) CNF 5%NIS10%; (T4) CNF 5%NIS5%; (T5) CNF F1,45%NIS1,45%; (T6) CNF 8,55%NIS8,55%; (T7) CNF 5%NIS5%; (T8) CNF 8,55%NIS1.45%; (T9) CNF F5%NIS10%; (T10) CNF 5%NIS5%; (T11) CNF 0%NIS5%;

A vibração localizada na faixa espectral de 3024 a 3960 cm^{-1} vibração axial da ligação O-H da celulose e da água absorvida (ROMANZINI *et al.*, 2012). O estiramento da ligação C-H da celulose é representado pela na faixa espectral de 2121 a 2970 cm^{-1} (JIANG *et al.*, 2013; JONOOBI *et al.*, 2011).

A deformação da ligação O-H da água absorvida está localizada na faixa de 1618 a 1840 cm^{-1} (JONOOBI *et al.*, 2011). Deformação das ligações dos grupos C-H e C-O dos anéis aromáticos dos polissacarídeos constituintes da celulose 1370-1315 presentes na celulose nanofibrilada (ROMANZINI *et al.*, 2012).

Estiramento das ligações dos grupos C-O e O-H dos polissacarídeos da celulose 1040 a 1316 cm^{-1} (ROMANZINI *et al.*, 2012). As ligações β -glicosídicas entre os monossacarídeos da celulose 820 a 864 cm^{-1} (JIANG *et al.*, 2013).

A pectina pode ser comprovada nos compostos pela presença dos picos de 1618 a 1797 cm^{-1} , correspondente a banda de absorção dos grupos carbonila livres e esterificados, (XU *et al.*, 2003). Os grupos hidroxila e carboxila presentes na estrutura da pectina são responsáveis pela reticulação, e para que esta ocorra, é necessária a formação da ligação éster entre estes grupos.

D) Análise Termogravimétrica

O primeiro evento térmico, que ocorreu entre as temperaturas de 49 e 131 °C, pode ser caracterizado como a perda de umidade superficial ou de água não ligada quimicamente à nanoestrutura (Figura 14 e Figura 15). Mandal e Chakrabarty (2014), ao avaliarem nanocompósitos baseados em poli (álcool vinílico) e nanocelulose de bagaço de cana, constataram que a perda de água ocorreu na faixa de 30 a 140 °C, o que está consistente com os dados obtidos neste trabalho. Esse evento térmico ocorreu devido à retirada de água, que muitas vezes aderida somente à superfície necessita de energia para evaporação, caracterizando um processo endotérmico (DAMASIO, 2015).

Verificou que os filmes de pectina com nanocompósitos formados somente por CNF foram que apresentaram as características dessa primeira fase endotérmica. A hipótese dessa fase ser bastante evidente em T0 foi devido às regiões amorfas presentes na nanoestrutura, que podem estar associadas à maior presença umidade. Damasio (2015), ressaltou no seu estudo que esses componentes são termicamente estáveis nessa faixa de temperatura, desde que não sejam expostos ao calor por períodos prolongados.

De acordo com a Tabela 6, os filmes de pectina com celulose nanofibrilada apresentaram maior percentual de massa residual foram os tratamentos (4, 5, 7, 9 e 10), quando comparadas com o tratamento 11 (controle) que não possui CNF na sua matriz polimérica. Um outro fator influenciou diretamente na degradação térmica foi a combinação das concentrações de celulose nanofibrilada (CNF 5 %) e nisina z (NIS 5 %) nos tratamentos (4, 7 e 9) que tiveram o maior percentual de degradação térmica avaliado neste estudo.

Os filmes tiveram uma variação na Tmax de 241 a 349 °C. O mesmo comportamento foi encontrado por Peng *et al.* (2013). A celulose, quando seca ao ar, forma uma camada sólida na superfície. Durante a degradação térmica, formou um filme compacto de cinzas que agiu como uma proteção para as fibrilas localizadas nas regiões mais internas. Dessa forma, a degradação térmica dessas fibrilas é reduzida. A Tmax é crítica para a aplicação da nanocelulose em compósitos, pois é um indicativo da estabilidade térmica do material (KAUSHIK e SINGH, 2011; PENG *et al.*, 2013).

Tabela 6 – Temperatura e perda de massa dos principais eventos térmicos

Tratamento	Temperatura do Pico (°C)	Perda de Massa Total (%)
T1	248	55
T2	241	51
T3	325	52
T4	272	66
T5	290	67
T6	336	63
T7	326	67
T8	349	52
T9	245	62
T10	317	63
T11	236	50

Dessa forma, a faixa de temperatura de 228 a 406 °C caracterizou o segundo evento térmico como aquele em que as regiões amorfas e os possíveis outros componentes como as hemiceluloses residuais na superfície são degradados. Normalmente, as hemiceluloses apresentam sua degradação na faixa de 225 a 325 °C e a celulose no intervalo de 305 a 375 °C, como relatado por Prins *et al.* (2006).

O último evento neste estudo foi caracterizado como a degradação das regiões cristalinas e a quebra dos monômeros, que para os nanocompósitos contendo celulose nanofibriladas ocorreu de 336 a 551 °C. Estes eventos podem ser atribuídos à degradação térmica da pectina. Similarmente à degradação da celulose, as reações de degradação envolvem a despolimerização das cadeias poliméricas, geração de compostos aromáticos e alifáticos, liberação de H₂O, CO₂ e CO, levando a formação de um resíduo carbonáceo (ANDRADE *et al.*, 2009).

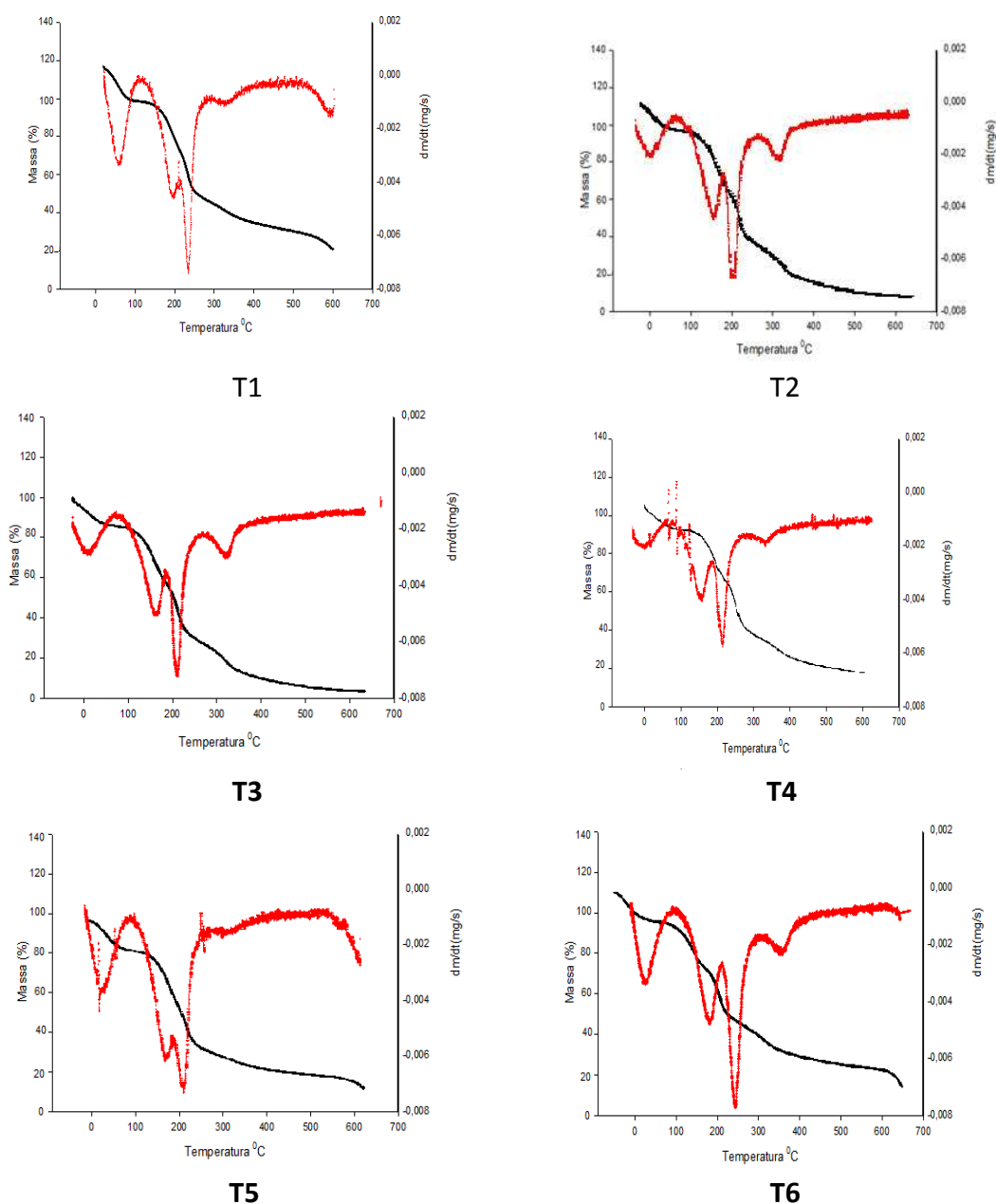


Figura 14. Curva de termogravimétrica (TGA) e derivada termogravimétrica (DTG) dos filmes de pectina, incorporados com celulose nanofibrilada (CNF) e nisina z (NIS). (T1) CNF 1,45%NIS1,45%;(T2) CNF 10%NIS5%;(T3) CNF 5%NIS10%;(T4) CNF 5%NIS5%; (T5) CNF 1,45%NIS1,45%; (T6) CNF 8,55%NIS8,55%;

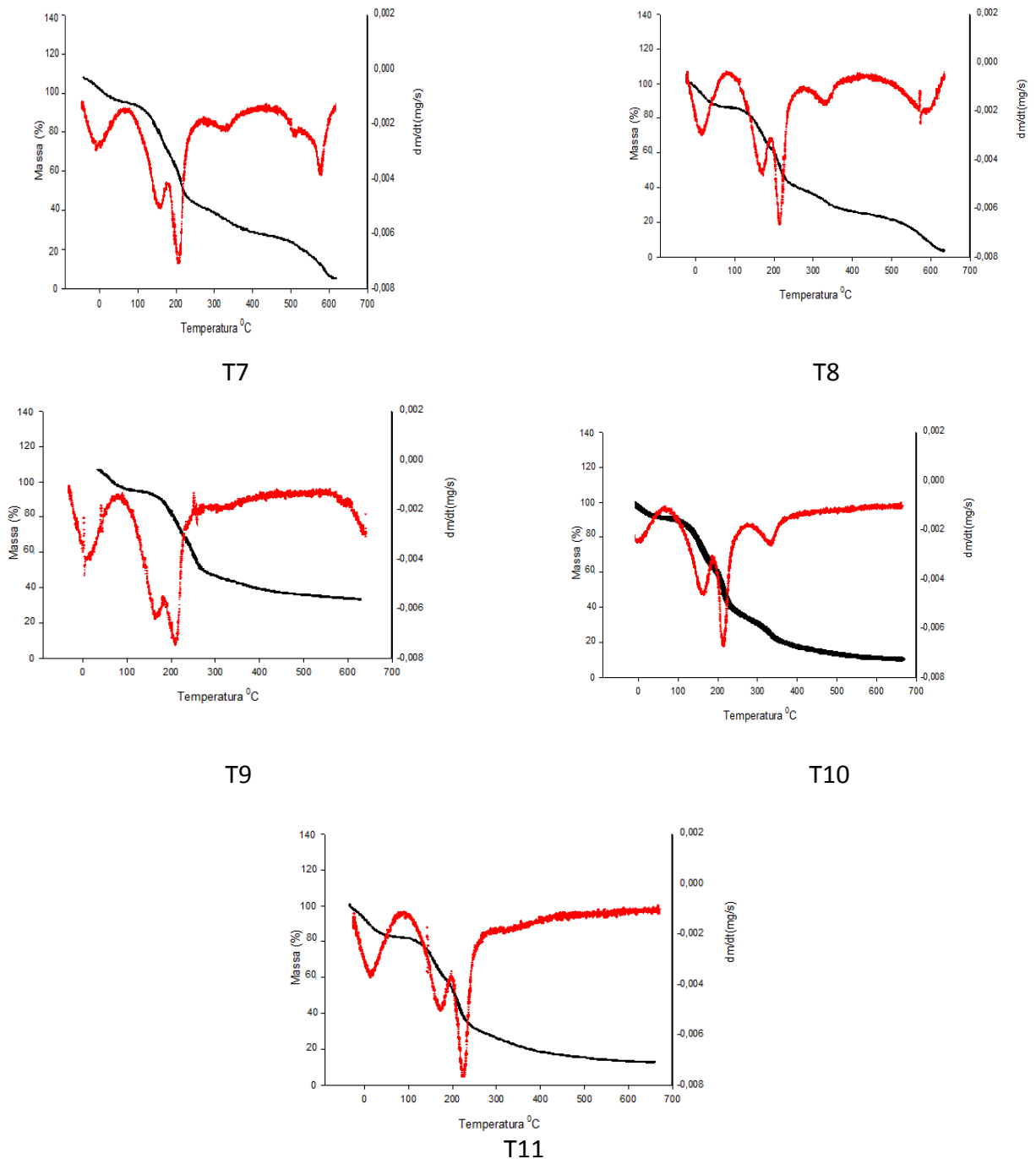


Figura 15. Curva de termogravimétrica (TGA) e derivada termogravimétrica (DTG) dos filmes de pectina, incorporados com celulose nanofibrilada (CNF) e nisina z (NIS). (T7) CNF 5 % NIS 5 %; (T8) CNF 8,55 % NIS 1,45 %; (T9) CNF 5 % NIS 10 %; (T10) CNF 5 % NIS 5 %; (T11) CNF 0 % NIS 5 %;

No último evento de perda de massa, observado a partir de 336 °C, Segundo Ashori *et al.* (2014), ocorre a decomposição térmica da celulose em monômeros de D-glucopiranoose, que podem ainda se decompor em radicais livres.

Pelos resultados obtidos, conclui-se que os filmes com celulose nanofibrilada desenvolvidos neste estudo possuem estabilidade térmica viável para diversas aplicação, como no desenvolvimento de embalagens para alimentos.

E) Taxa de permeabilidade ao vapor d'água

A permeabilidade ao vapor d'água dos filmes é fator muito importante para embalagens para alimentos (SAHA *et al*, 2016). A permeabilidade no filme deveria ser a mais baixa possível (BENBETTAÏEB, KUREK, BORNAZ, e DEBEAUFORT, 2014). Quando comparados com os polímeros sintéticos, os polímeros biodegradáveis têm uma propriedade de barreira inferior (KOŁODZIEJSKA & PIOTROWSKA, 2007). Para a melhoria das propriedades de barreira, a celulose nanofibrilada foi incorporada na matriz polimérica de pectina para tentar diminuir a permeabilidade vapor d'água através da matriz do polímero.

A avaliação individual de CNF e NIS, bem como, a interação desses fatores obtiveram resultados independentes na taxa de permeabilidade ao vapor d'água (TPVA), mesmo com $p < 0,05$ e o valor de R^2 baixo (Tabela 7). O controle de espessura é uma variável importante em estudos de propriedades de barreira. Com o aumento da espessura, ocorre redução da resistência à transferência ao vapor de água e menor TPVA (MCHUGH *et al.*, 1993).

Tabela 7. Estimativas dos coeficientes de DCCR, da presença de NIS e CNF na TPVA dos filmes de PEC.

TPVA	Equação ^a	R ²	FAJ ^b
(g/m ² . dia ²)	0,356* - 0,00533 * CNF ²	0,1599	0,289

^a Foi utilizado o modelo Quadrático Completo e os coeficientes não apresentados na equação foram não significativos ($p > 0,05$).

* Significativo pelo teste t de Student ($P < 0,05$)

^bFAJ: Valor-P para a falta de ajuste do modelo

Filmes à base de pectina são materiais biodegradáveis necessitam possuir baixa permeabilidade ao vapor d'água ou a gases, quando são utilizados como embalagens. Na Figura 16, os níveis de NIS (1,45 %; 5 %; 8,55 % a 10 %)

e CNF (0 % ,1,45 %; 5 %; 8,55 % e 10 %) estudados tanto na ausência quanto na presença dos dois componentes, nas suas concentrações máximas, resultaram em menores valores de TPVA. Porém, quando os componentes foram avaliados individualmente no filme, resultaram em maior TPVA. O filme de pectina é um polímero hidrofílico que possui grupos hidroxílicos, assim, a água poderia facilmente permear o filme. Entretanto, na presença de CNF, uma barreira física é formada com a dispersão nanofibrilas na matriz polimérica dificultando a passagem de vapor de água (NING *et al.*, 2009; RAY e OKAMOTO, 2003).

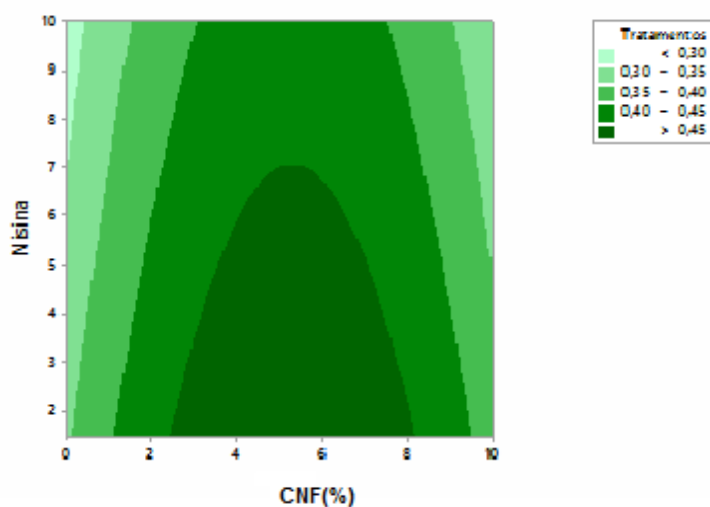


Figura 16. Taxa de permeabilidade ao vapor d'água dos filmes de pectina incorporados com celulose nanofibrilada(CNF) e nisina z (NIS).

Ficou evidente neste estudo que quando se aumenta concentração máxima de 10 % de CNF nos filmes de pectina ocorreu redução da taxa de permeabilidade do vapor de água o mesmo resultado foi encontrado por Machado (2011) no geral nanocelulose de coco influenciou diretamente na permeabilidade ao vapor a água, e à medida que se aumentou a concentração destas nanopartículas nos nanobiocompósitos, a permeabilidade ao vapor de água diminuiu .

Belbekhouche *et al.* (2011), prepararam filmes com CNC e CNF extraídas do sisal. Os filmes CNF apresentaram menores TPVA do que o CNC, o que pode ser devido à lignina residual presente, extrativos, e ácidos graxos na sua superfície.

Savadekar (2012) relatou que a nanocelulose (CNF) no filme de amido promoveu uma queda da taxa de permeabilidade de vapor para o filmes estudado.

A pectina é constituída por unidades de ácido D-galacturónico e pode ter diferentes graus de metoxilada (esterificados com metanol), grupos carboxílico influenciam diretamente na taxa de permeabilidade de vapor d'água (MISHRA *et al.*, 2012). Segundo Ottoni (2014) relatou que pectina de baixa metoxilação os valores TPVA são menores devido aos seus grupamentos carboxílicos serem mais lineares.

SAHA *et al.*,(2016), desenvolveram um filme meticelulose, pectina e a argila- MMT , observaram uma diminuição da permeabilidade ao vapor de água do filmes com adição do nanocompósitos devido a essa incorporação na matriz de polímero, os gases têm percorrer um caminho tortuoso, dificultando a passagem dos gases..

4. Conclusão

Foi possível o desenvolvimento do filme de pectina com celulose nanofibrilada e nisina z.

No teste de difusão em ágar para todos os tratamentos testados foi eficaz na inibição dos micro-organismos estudados.

A celulose nanofibrilada aumentou a temperatura de degradação. As propriedades mecânicas dos filmes apresentaram um aumento da resistência máxima à tração e o alongamento na ruptura.

O aumento da concentração de CNF nos filmes PEC foi eficiente redução da TPVA.

5.Referências Bibliográficas

ABE, K.; YANO, H. Comparison of the characteristics of cellulose microfibril aggregates isolated from fiber and parenchyma cells of Moso bamboo (*Phyllostachys pubescens*). **Cellulose**, v. 17, p. 271-277, 2010.

ANDRADE, J. R.; RAPHAEL, E.; PAWLICKA, A., Plasticized pectin-based gel

electrolytes, **Electrochimica Acta**, 54, 6479–6483, 2009.

AZEVEDO, V. M.; COSTA, A.L.R.; FUKUSHIMA, K.L.; BORGES, S.V. Propriedades de barreira, mecânicas e ópticas de filmes de concentrado proteico de soro de leite. **Revista Instituto Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 69, n.4, p. 237-247. 2014.

BASCH, C. Y., ROSA J. J. A., FLORES, S. K. Physical and Antimicrobial Properties of Tapioca Starch-HPMC Edible Films Incorporated with Nisin and/or Potassium Sorbate. **Food Bioprocess Technology**, v. 6, p. 2419–2428, 2013.

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

BASTARRACHEA, L., DHAWAN, S., SABLANI, S., HYUNGMAH, J., KANG, D., ZHANG, J., TANG. J. Biodegradable Poly (butylenesadipate-co-terephthalate) Films Incorporated with Nisin: Characterization and Effectiveness against *Listeria innocua*. **Journal of Food Science**, v.75, p.E215-224, 2010.

BELBEKHOUCHE, S., BRAS, J., SIQUEIRA, G., CHAPPEY, C., LEBRUN, L., KHELIFI, B., MARAIS, S., Dufresne, A., Water sorption behavior and gas barrier properties of cellulose whiskers and microfibrils films. **Carbohydr. Polym.** 83, 1740–1748, 2011.

BENBETTAÏEB, N., KUREK, M., BORNAZ, S., & DEBEAUFORT, F. (2014). Barrier, structural and mechanical properties of bovine gelatin–chitosan blend films related to biopolymer interactions. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 94(12), 2409–2419, 2014.

BILBAO-SAINZ, C.; BRAS, J.; WILLIAMS, T.; SÉNECHAL, T.; ORTS, W. HPMC reinforced with different cellulose nano-particles. **Carbohydrate Polymers**, v.86, p.1557, 2011.

CAMILLOTO, G. P. **Desenvolvimento e avaliação de embalagem ativa incorporada com produto à base de triclosan para aplicação em carne bovina**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, p. 81, 2009.

CAO-HOANG, L., CHAINE, A., GRÉGOIRE, L., WACHÉ, Y. Potential of nisin incorporated sodium caseinate films to control *Listeria* in artificially contaminated cheese. **Food Microbiology**, v. 27, p. 940-944, 2010.

CHOLLET, E., SEBTI, I., MARTIAL-GROS, A., DEGRAEVE, P. Nisin preliminary study as a potential preservative for sliced ripened cheese: NaCl, fat and enzymes influence on nisin concentration and its antimicrobial activity. **Food Control**, v. 19, p. 982-989, 2008.

COMA, V., SEBTI, I., PARDON, P., DESCHAMPS, A., PICHAVANT, F.H. Antimicrobial edible packaging based on cellulosic ethers, fatty acids, and nisin incorporation to inhibit *Listeria innocua* and *Staphylococcus aureus*. **Journal.Food Protein**, v. 64, p. 470-475, 2001.

CORREIA,V,D. **Produção de celulose nanofibrilada a partir de polpa organossolve de bambu para nanoreforços de compósitos cimentícios**. Tese Doutorado – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, 2015.

CHANG, P. R.; JIAN, R.; YU, J.; MA, X. Fabrication and characterisation of chitosan nanoparticles/plasticised-starchcomposites. **Food Chemistry**, v. 120 p. 736–740, 2010.

CHERIAN, B. M.; LEÃO, A.L.; SOUZA, S.F.; COSTA, L.M.M.; OLYVEIRA, G.M.; KOTTAISAMY, M.; NAGARAJAN, E.R.; THOMAS, S. Cellulose nanocomposites with nanofibres isolated from pineapple leaf fibers for medical applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 86, p. 1790-1798, 2011.

COZUMUTA, A. M.; TURILA, A.; APJOK, R.; CIOCIAN, A.; COZMUTA, L. M.; PETER, A.; NICULA, C.; GALI, N.; BENKOVI, T. Preparation and characterization of improved gelatin films incorporating hemp and sage oils. **Food Hydrocolloids**, v. 49, p. 144-155, 2015.

DAMASIO, R. **Caracterização E Aplicações De Celuloses Nanofibrilada (Cnf) E Nanocristalina (Cnc)**. Dissertation, M.Sc. Viçosa/Brazil. 2015.

EGITTO, F.D.& Matienzo, L.. J.- IBM J. **Res. Development.**, 38, p.423, 1994.

HAIR Jr, J. F., BLACK, W, C., BABIN, B. J., ANDERSON, R. E., TATHAM, R. L. **Análise Multivariada de Dados**. 6 ed. Porto Alegre: Bookman, 2009.

GADANG, V. P., HETTIARACHCHY, N. S., JOHNSON, M. G., OWENS, C. Evaluation of antibacterial activity of whey protein isolate coating incorporated with nisin, grape seed extract, malic acid, and EDTA on a Turkey frankfurter system. **Journal.Food Science**, v. 73, p. 389- 394, 2008.

GOMES, R. C.; PASTORE, V. A. A.; MARTINS, O. A.; BIONDI, G. F. Aplicações da nanotecnologia na indústria de alimentos. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v.9, n.1, p. 1-8, 2015.

JIANG, F.; HSIEH, Y. Chemically and mechanically isolated nanocellulose and their self-assembled structures. **Carbohydrate Polymers**, v. 95, p. 32-40, 2013.

JONOOBI, M., HARUN, J., SHAKERI, A., MISRA, M., & OKSMAN, K. Chemical composition, crystallinity, and thermal degradation of bleached and unbleached kenaf bast (*Hibiscus cannabinus*) pulp and nanofibers. **Bioresource**, v.4, p.626– 639, 2009.

JONOOBI, M.; HARUN, J.; TAHIR, P.M.; SHAKERI, A.; SAIFULAZRY, S.; MAKINEJAD, M.D. Physicochemical characterization of pulp and nanofibers from kenaf stem. **Materials Letters**, v. 65, p. 1098-1100, 2011.

JONOOBI, M., MATHEW, A.P., OKSMAN, K. Producing low-cost cellulose nanofiber from sludge as new source of raw materials. **Industrial Crops and Products**, v. 40, p. 232-238, 2012.

JÚNIOR, M, G. “**Desenvolvimento de Bionanocompósitos Utilizando Nanofibras Celulósicas de Bambu como Agente de reforço em Matriz de Amido e Álcool Polivinílico**” Tese de Doutorado apresentado ao Programa de PósGraduação em Engenharia de Materiais da Rede Temática em Engenharia de Materiais - REDEMAT, como parte integrante dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Engenharia de Materiais., Ouro Preto, 23 de outubro de 2015.

LAVORATTI, A. **Desenvolvimento e caracterização de compósitos poliméricos poliéster/nanocelulose**. Dissertação (Mestrado) – Universidade de Caxias do Sul, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos e Tecnologias, 2015.

LI, X. **A simulation evaluation of backward elimination and stepwise variable selection in regression analysis**. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Departamento de Estatística – Faculdade de Artes e Ciências – Universidade do Estado do Kansas, Manhattan. 2012.

LIU, Y.; WANG, H.; YU, G.; YU, Q.; LI, B.; MU, X. A novel approach for the preparation of nanocrystalline cellulose by using phosphotungstic acid. **Carbohydrate Polymers**, v. 110, p. 415–422, 2014.

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

LU, J.; ASKELAND, P.; DRZAL, L. T. Surface modification of microfibrillated cellulose for epoxy composite applications, *Polymer*, v.49, p.1285-1296, 2008.

KABOORANI, A; RIEDL, B.; BLANCHET, P.; FELIN, M.; HOSSEINAEI, O.; WANG, S. Nanocrystalline cellulose (NCC): a renewable nano-material for polyvinyl acetate (PVA) adhesive. **European Polymer Journal**, v.48, p.1829-1837, 2012.

KAUSHIK, A.; SINGH, M.; VERMA, G. Green nanocomposites based on thermoplastic starch and steam exploded cellulose nanofibrils from wheat straw. **Carbohydrate Polymers**, v. 82, p. 337-345, 2010.

KAUSHIK, A.; SINGH, M. Isolation and characterization of cellulose nanofibrils from wheat straw using steam explosion coupled with high shear homogenization. **Carbohydrate Research**, v. 346, p. 76-85, 2011.

KRISTO, E., KOUTSOUMANIS, K.P., BILIADERIS, C.G. Thermal, mechanical and water vapor barrier properties of sodium caseinate films containing antimicrobials and their inhibitory action on *Listeria monocytogenes*. **Food Hydrocolloids**, v. 22, p.373–386. 2008.

KOŁODZIEJSKA, I., & PIOTROWSKA, B. The water vapour permeability, mechanical properties and solubility of fish gelatin–chitosan films modified with transglutaminase or 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC) and plasticized with glycerol. **Food Chemistry**, 103(2), 295–300, 2007.

MACHADO, B.A.S.. **DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE FILMES FLEXÍVEIS DE AMIDO DE MANDIOCA COM NANOCELULOSE DE COCO**. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia, 2011.

MANDAL, A.; CHAKRABARTY, D. Studies on the mechanical, thermal, morphological and barrier properties of nanocomposites based on poly(vinyl alcohol) and nanocellulose from sugarcane bagasse. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 20, p. 462–473, 2014.

MOUNIKA, M.; Dr. K. RAVINDRA. Characterization Of Nanocomposites Reinforced With Cellulose Whiskers: A Review.. **International Conference on Materials Processing and Characterization**. 3610 – 3618, 2015.

MOREIRA, F. K. V. **Desenvolvimento de nanocompósitos poliméricos biodegradáveis a partir de pectina, amido e nanofibras de celulose**. 2010. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais. Universidade Federal de São Carlos – Ufscar, São Paulo, SP. 2010.

NETO, W. P. F.; SILVÉRIO, H. A.; DANTAS, N. O.; PASQUINI, D. Extraction and characterization of cellulose nanocrystals from agro-industrial residue – Soy hulls. **Industrial Crops and Products**, v. 42, p. 480– 488, 2013.

NING, W. *et al.* Effect of citric acid and processing on the performance of thermoplastic starch/montmorillonite nanocomposites. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 76, p. 68–73, 2009.

OLIVEIRA, T.I.S. ; ZEA-REDONDO, L. ; MOATES, G.K.; Nikolaus Wellner, Cross, K.; Waldron, K.W.; Henriette M.C. Azeredo, H.M.C. Pomegranate peel pectin films as affected by montmorillonite. **Food Chemistry** 198, 107–112, 2016.

OTONI, C.G.; MOURA, M.R.D.E.; AQUADA, F.A.CAMILTO, G.P.; CRUZ, R.S.; LORE VICE, M.V.; SOARES, N.D.E F.F.; MATTOSO, L.H.C. Antimicrobial and physical-Mechanical properties of pectin-papaya puree cinnamaldehyde nanoemulsion edible composite films. **Food hydrocolloids**, V,41, P.188-194, 2014.

PENG et al. Highly Effective Adsorption of Heavy Metal Ions from Aqueous Solutions by Macroporous Xylan-Rich Hemicelluloses-Based Hydrogel. *J. Agric. Food Chem.* 60, 3909–3916.2012.

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

RAY, S. S.; OKAMOTO, M. Polymer/layered silicate nanocomposites: a review from preparation to processing. *Progress in Polymer Science*, v. 28, p. 1539–641. 2003.

REDDY, M. M.; VIVEKANANDHAN S.; MISRA, M.; BHATIA, S. K.; MOHANTY A. K. Biobased plastics and bionanocomposites: Current status and future opportunities. *Progress in Polymer Science*. v.38, p.1653– 1689, 2013.

REICHENBERGG, AMOS OPHIR, A.; YIFTACH Nir, y. Nisin as an Antibacterial Substance in Active Packaging: Use of Ethylene Methyl Acrylate and Co-Polyamide to Enhance Its Effectiveness. *International Journal of Material Science*, Vol. 5, No. 2—September 2015.

ROMANZINI, D.; ORNAGHI JR, H.L.; AMICO, S.C.; ZATTERA, A.J. Preparation and Characterization of Ramie-Glass Fiber Reinforced Polymer Matrix Hybrid Composites. *Materials Research*, v. 15, p. 415-420, 2012.

SAHA, N,R .; SARKA,G.; ROY, I.; RANA, D.; Bhattacharyya, A .; Adhikari,A.; Mukhopadhyay,A.;Chattopadhyay,D.Studieon. ethylcellulose/pectin/montmorillonite nanocompositefilms and their application possibilities. *Carbohydrate Polymers* 136 (2016) 1218–1227, 2016.

SAVADEKAR, N.rS.T. Mhaske. Synthesis of nano cellulose fibers and effect on thermoplastics starch based films. *Carbohydrate Polymers* 89 (146– 151), 2012.

SILVA, J. B. A. **Preparação e caracterização de filmes flexíveis de amido e de pbat/amido termoplástico reforçados com nanowhiskers por casting e extrusão**. Tese (Doutorado em Engenharia Química). Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal da Bahia, Salvador - BA, 2013.

SPENCE, K.L.; VENDITTI, R.A.; ROJAS, O.; HABIBI, Y.; PAWLAK, J. The effect of chemical composition on microfibrillar cellulose films from wood pulps: water interactions and physical properties for packaging applications. *Cellulose*, v. 117, p. 835–848, 2010.

WANG, H., MA,X., Li, Y., JIANG, S., ZHAI, L., JIANG, S., et al. Synthesis, antimicrobial and release of chloroamphenicol loaded poly(l-lactic acid)/ZrO₂

nanofibrous membranes. **International Journal of Biological Macromolecules**, 62, 494–499, 2013.

XU, X.; LIU, F.; JIANG, L.; ZHU, J. Y.; HAAGENSON, D.; WISENBORN, D. P. Cellulose nanocrystals vs. cellulose nanofibrils: a comparative study on their microstructures and effects as polymer reinforcing agents. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v.5, p.2999–3009, 2013.

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

O presente trabalho sugere que seja realizado uma mudança de superfície nas nanoceluloses estudadas para se tornarem mais compatíveis com as matrizes poliméricas aumentando sua interação e dispersão com a matriz, tornando viável a sua aplicação em embalagens biodegradáveis. Os modernos sistemas de acondicionamento de alimentos contribuem para aumento da segurança alimentar. Sendo assim, faz necessário aplicação dessa embalagem ativa biodegradável com nanoceluloses e nisina em alimentos perecíveis, como por exemplo, o queijo minas frescal. Desta forma, o desenvolvimento do filme embalagem ativa para queijo minas frescal ajudará na inibição do crescimento de *E. coli* e *S. aureus* proverá um impacto muito significativo para a qualidade do produto ofertado ao consumidor, além é, claro do impacto positivo na saúde pública.

CONSIDERAÇÕES FINAIS.

Foi possível obter nanocristais de celulose e celulose nanofibrilada a partir dos resíduos do bagaço de cana-de-açúcar, a fibra do bagaço passou por branqueamento pelo método TCF, aonde não se utilizou qualquer reagente a base de cloro. Utilizou-se dois métodos de síntese das nanoceluloses o químico e mecânico. Foram obtidas nanoceluloses com diâmetro aproximado de 6- 20 nm .

Os nanocristais de celulose e a celulose nanofibrilada foram adicionadas na matriz polimérica da pectina com o antimicrobiano nisina z. Foi observado neste estudo que nanocristais de celulose tiveram baixo rendimento processo químico, não obtiveram uma boa interação e dispersão na matriz polimérica, influenciado no aumento da taxa de permeabilidade de vapor de água e algumas propriedades mecânicas não foram melhoradas com adição dos nanocristais de celulose nos filmes de pectina.

Com base nos resultados obtidos, a celulose nanofibrilada mostrou ser uma alternativa melhor para aplicação como nanoreforços em polímeros biodegradáveis devido ao seu alto rendimento do processo mecânico, melhor dispersão, redução da taxa de permeabilidade de vapor de água formando uma barreira física e além de ter contribuído para o melhor desempenho nas propriedades de mecânicas e estabilidade térmica dos filmes estudados.

Recomenda-se a aplicação de celulose nanofibrilada na produção de embalagens biodegradáveis e papéis de imprimir e escrever, devido suas propriedades de resistência mecânicas e térmicas avaliadas nesse estudo.