

MIRIANE MARIA DE SOUSA

**DESENVOLVIMENTO DE NANOCOMPÓSITO BIODEGRADÁVEL ATIVO
INCORPORADO COM NANOCRISTAIS DE CELULOSE MODIFICADO E COM
LISOZIMA**

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*.

Orientadora: Nilda de Fátima Ferreira Soares

Corientadoras: Deusanilde de Jesus Silva

Jane Sélia dos Reis Coimbra

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2020**

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da
Universidade Federal de Viçosa - Campus Viçosa

T

S725d
2020
Sousa, Miriane Maria de, 1986-
Desenvolvimento de nanocompósito biodegradável ativo
incorporado com nanocristais de celulose modificado e com lisozima /
Miriane Maria de Sousa. - Viçosa, MG, 2020.
100 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Nilda de Fátima Ferreira Soares.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Nanocristais de celulose. 2. Modificação superficial. 3.
Nanocompósitos (Materiais). 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. 620.5


MIRIANE MARIA DE SOUSA

DESENVOLVIMENTO DE NANOCOMPÓSITO BIODEGRADÁVEL ATIVO
INCORPORADO COM NANOCRISTAIS DE CELULOSE MODIFICADO E COM
LISOZIMA

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: 07 de fevereiro de 2020

Assentimento:


Miriane Maria de Sousa
Autora


Nilda de Fátima Ferreira Soares
Orientadora

A Deus, aos meus pais e aos meus filhos.

Dedico

AGRADECIMENTOS

À minha família, pelo apoio, amor e confiança. Em especial aos meus pais Francisco Ferreira de Sousa e Laene Joana Vieira de Sousa e à minha irmã Sonaire, por todo apoio, carinho e dedicação.

Ao meu esposo Robson, por todo amor, paciência, e por estar sempre presente e dedicação ao nosso filho, que nas minhas ausências fez de tudo para supri-la.

À Professora Orientadora Nilda, pela orientação, confiança e por toda ajuda na minha formação de doutora

Às Professoras e Coorientadoras Jane Sélia dos Reis Coimbra e Deusanilde de Jesus Silva por todo apoio e confiança.

Ao Professor Sukarno Olavo por toda a boa vontade e disponibilidade para realizar análises fundamentais para este trabalho

A professora Edmar e Ana Clarissa por disponibilizar com boa vontade equipamento essencial para realização da pesquisa.

Aos técnicos Monteiro e Thalita por realizar com boa vontade as secagens dos materiais utilizados na pesquisa.

Ao técnico de laboratório Fernando do LABEM pelos conselhos, companheirismo e por tonar os dias de pesquisa harmonioso.

A empresa Klabin por fornecer o material de pesquisa.

Aos amigos do Labem, Laís, Alane, Clara, Rafaela, Taila, Pedro, Rafael e Mariah.

Aos estagiários Rosilene, Vânia Miria, Mariane, José Oswaldo e Wilher que contribuíram diretamente para o desenvolvimento da pesquisa.

À Universidade Federal de Viçosa, por meio do Departamento de Tecnologia de Alimentos, pela oportunidade de realização do Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudo.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001”.

A toda equipe do Laboratório de Embalagens (LABEM) pela amizade, união e convivência.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho. E por fim, porém não menos importante, agradeço a Deus pela vida, pela família, pelos amigos e por mais essa conquista.

Muito obrigada.

RESUMO GERAL

SOUSA, Miriane Maria de, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2020. **Desenvolvimento de nanocompósito biodegradável ativo incorporado com nanocristais de celulose modificado e com lisozima.** Orientadora: Nilda de Fátima Ferreira Soares. Coorientadoras: Deusanilde de Jesus Silva e Jane Sélia dos Reis Coimbra.

O uso de biopolímeros para produção de filmes tem atraído cada vez mais atenção na área de embalagens e tem sido tema de pesquisas e interesse de várias indústrias. Apesar da biodegradabilidade, origem renovável, alta disponibilidade e baixo custo, a aplicação em larga escala desses materiais é reduzida devido às limitadas propriedades que esses materiais apresentam. O trabalho foi dividido em três partes. A primeira parte consistiu no isolamento de nanocristais de celulose (NCC) de coroa de abacaxi e sua caracterização quanto ao seu tamanho, carga superficial, índice de cristalinidade (IC) e degradação térmica. O tempo de hidrólise influenciou nas características dos NCCs, obtendo-se comprimentos variando entre 274 a 295 nm, diâmetro entre 3,7 a 11 nm, relação de aspectos entre 24,9 a 69,8, potencial zeta entre -17,3 a -24,6 mV e cristalinidade entre 56 a 85%. O maior rendimento de NCC foi de 29,9% (m/m) em 120 min de hidrólise com IC de 60%. Contudo, para se obter o maior IC, que foi de 85%, o tempo de hidrólise foi de 60 min e o rendimento de 19% (m/m). O estudo indicou que as principais características dos NCCs para seu uso como reforço podem ser potencializadas com tempos de hidrólise entre 60 a 120 min. Concluiu-se também que foi possível obter NCCs isolados de coroa de abacaxi capazes de redispersar em água, quando os mesmos foram secos na forma de sais de sódio. A segunda parte do trabalho consistiu em isolar NCCs de fibra de pinus e modificar sua superfície com o surfactante brometo de hexadeciltrimetilamônio (CTAB) para diminuir a hidrofobicidade dos NCCs. Foi possível extrair os NCCs da fibra de pinus, em tamanho nano com 295 ± 135 nm de comprimento e $7,0 \pm 5$ nm de diâmetro, e estáveis em água. Os resultados de FTIR, EDS e potencial zeta indicaram que houve a adsorção das moléculas do CTAB na superfície dos NCCs, mantendo a estrutura cristalina e a estabilidade térmica dos mesmos. A maior hidrofobicidade dos NCCs modificados foi obtida quando 0,2% (m/m) de CTAB foi usado, obtendo-se o maior ângulo de contato com a água (71°), e valores de potencial zeta de -21,1 mV. A modificação promoveu a dispersão dos

NCCs em solvente de baixa polaridade como a acetona, e essa capacidade de dispersão foi independente da concentração de CTAB utilizado no processo de modificação. Já os NCCs que não passaram pela etapa de modificação superficial não foram capazes de se dispersar nesse mesmo solvente. A terceira parte do trabalho consistiu no desenvolvimento de filme nanocompósito ativo biodegradável à base de acetato de celulose, incorporado com agente ativo, lisozima, e NCCs modificados (NCCMs) com CTAB. Os filmes foram caracterizados quanto as propriedades de barreira ao vapor de água, as propriedades mecânicas, ao ângulo de contato, a transmitância e a atividade antimicrobiana. A incorporação de NCCM e lisozima promoveu alterações nas propriedades mecânicas e de barreira. A transparência do filme de acetato de celulose foi mantida com a adição de NCCMs, uma vez que os NCCs ao serem modificados com CTAB, foram capazes de distribuir uniformemente na matriz polimérica, indicando uma dispersão mais homogênea desses compostos. Essa dispersão homogênea dos NCCs na matriz foi importante, pois proporcionou melhoria na propriedade de resistência máxima a tração e de barreira ao vapor de água dos filmes de acetato de celulose. A lisozima contribuiu para redução dessas propriedades, e não houve efeito sinérgico entre o NCCM e a lisozima para melhoria das propriedades do filme de acetato de celulose. Não foi possível estimar neste estudo condições ótimas de adição simultânea de lisozima e NCCMs para produção de um nanocompósito ativo. As melhores respostas foram obtidas para o filme adicionados com 4,9% (m/m) e 6% (m/m) de NCCM para ângulo de contato e resistência máxima a tração, respectivamente, com valores mínimos de lisozima. A atividade antimicrobiana foi obtida com adição de 10% (m/m) de lisozima com halo de inibição de 0,5 cm para *Listeria Inocua*, e o NCCM não apresentou nenhuma atividade antimicrobiana. Portanto, o estudo mostrou que foi possível produzir nanocompósito de acetato de celulose com NCC modificado com CTAB capazes de dispersar na matriz de acetato de celulose, e com atividade antimicrobiana.

Palavras-chave: Nanocristal de celulose. Modificação de superfície. Nanocompósito.

ABSTRACT

SOUSA, Miriane Maria de, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2020. **Development of active biodegradable nanocomposite incorporated with modified cellulose nanocrystals and lysozyme.** Adviser: Nilda de Fátima Ferreira Soares. Co-advisers: Deusanilde de Jesus Silva and Jane Sélia dos Reis Coimbra.

The use of biopolymers for film production has increasingly attracted attention in the packaging area and has been the subject of researches and interest in several industries. Despite the biodegradability, renewable origin, high availability and low cost, the large-scale application of these materials is reduced due to the limited properties that these materials have. The work was divided into three parts. The first part consisted of the isolation of the pineapple crown cellulose nanocrystals (NCC) and their characterization as to their size, surface charge, crystallinity index (IC) and thermal degradation. The hydrolysis time influenced the characteristics of the NCCs, obtaining lengths ranging from 274 to 295 nm, diameter between 3.7 to 11 nm, aspect ratio between 24.9 to 69.8, zeta potential between -17.3 to -24.6 mV and crystallinity between 56 to 85%. The highest yield of NCC was 29.9% (m/m) in 120 min of hydrolysis with 60% IC. However, to obtain the highest IC, which was 85%, the hydrolysis time was 60 min and the yield 19% (m/m). The study indicated that the main characteristics of NCCs for use as reinforcement can be enhanced with hydrolysis times between 60 to 120 min. It was also concluded that it was possible to obtain isolated pineapple crown NCCs capable of redispersing in the water, when they were dried in the form of sodium salts. The second part of the work consisted of isolating pine fiber NCCs and modifying their surface with the hexadecyltrimethylammonium bromide surfactant (CTAB) to decrease the hydrophilicity of the NCCs. It was possible to extract the NCCs from the pine fiber, in nanosize with 295 ± 135 nm in length and 7.0 ± 5 nm in diameter, and stable in the water. The results of FTIR, EDS and zeta potential indicated that there was an absorption of CTAB molecules on the surface of NCCs, maintaining their crystalline structure and thermal stability. The highest hydrophobicity of the modified NCCs was obtained when 0.2% (m/m) of CTAB was used, obtaining the largest contact angle with water (71°), and zeta potential values of -21.1 mV. The modification promoted the dispersion of the NCCs in a low polarity solvent such as acetone, and this dispersion capacity was independent of the CTAB concentration used in the

modification process. NCCs that did not go through the surface modification stage were not able to disperse in that same solvent. The third part of the work consisted in the development of a biodegradable active nanocomposite film based on cellulose acetate, incorporated with an active agent, lysozyme, and modified NCCs (NCCMs) with CTAB. The films were characterized in terms of water vapor barrier properties, mechanical properties, contact angle, transmittance and antimicrobial activity. The incorporation of NCCM and lysozyme promoted changes in the mechanical and barrier properties. The transparency of the cellulose acetate film was maintained with the addition of NCCMs, since the NCCs, when modified with CTAB, were able to distribute evenly in the polymer matrix, indicating a more homogeneous dispersion of these compounds. This homogeneous dispersion of NCCs in the matrix was important, as it provided an improvement in the property of maximum tensile strength and water vapor barrier of cellulose acetate films. Lysozyme contributed to reducing these properties, and there was no synergistic effect between NCCM and lysozyme to improve the properties of cellulose acetate film. It was not possible to estimate in this study optimal conditions for the simultaneous addition of lysozyme and NCCMs for the production of an active nanocomposite. The best responses were obtained for the film added with 4.9% (m/m) and 6% (m/m) of NCCM for contact angle and maximum tensile strength, respectively, with minimum lysozyme values. The antimicrobial activity was obtained with the addition of 10% (m/m) of lysozyme with a 0.5 cm inhibition halo for *Listeria Inocua*, and the NCCM did not show any antimicrobial activity. Therefore, the study showed that it was possible to produce cellulose acetate nanocomposite with NCC modified with CTAB capable of dispersing in the cellulose acetate matrix, and with antimicrobial activity.

Keywords: Cellulose nanocrystal. Surface modification. Nanocomposite.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AR: Alongamento na ruptura

ATR-FTIR: Espectroscopia de absorção infravermelho com reflectância total atenuada.

NCC: Nanocristais de celulose

NCCM: Nanocristais modificados

CTAB: Brometo de hexadeciltrimetilamônio

DRX: Difração de raios-x

ESP: Espessura

ME: Módulo de elasticidade

TPVA: Taxa de permeabilidade ao vapor de água

RT: Resistência à tração

T660nm: Transmissão de luz a 660 nm

TGA: Análise termogravimétrica

AC: Acetato de celulose

CA: Coroa de abacaxi

CAB: Coroa de abacaxi branqueada

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	14
ARTIGO 1	16
CARACTERIZAÇÃO DE NANOCRISTAIS DE CELULOSE DE COROA DE ABACAXI SUBMETIDOS À HIDRÓLISE ÁCIDA	16
1.Introdução	17
2. Materiais e métodos.....	18
2.1. Materiais	18
2.2. Pré-tratamento da coroa de abacaxi.....	19
2.3. Isolamento de nanocristais de celulose	19
2.4. Avaliação da composição química	19
2.5. Avaliação do rendimento	20
2.6. Avaliação da redispersão dos nanocristais de celulose após secagem...20	
2.7. Caracterização.....	20
2.7.1. Distribuição de tamanho da partícula e medidas de potencial zeta (ζ) .20	
2.7.2. Microscopia eletrônica de transmissão (MET)	20
2.7.3. Microscopia de força atômica (MFA)	21
2.7.5. Espectroscopia na região de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....	21
2.7.6. Difração de Raios-X (DRX).....	21
2.7.7. Análise termogravimétrica (TGA).....	22
2.7.8. Espectroscopia de dispersão de energia por raios-X (EDS).....	22
2.7.9. Análise estatística	22
3. Resultados e discussão	23
3.1. Composição química e rendimento da extração da fibra de celulose	23
3.2. Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	24
3.4. Difração de raios-X (DRX)	27
3.5. Análise termogravimétrica (TGA).....	28
3.6. Análise morfológica e de dimensional dos NCCs	31
3.7. Potencial Zeta (ξ) e espectroscopia de energia dispersiva de raios-X (EDS)	34
3.8. Avaliação do rendimento dos nanocristais de celulose.....	35

3.9. Avaliação da redispersão dos NCCs em água	36
4. Conclusões	39
5. Referências.....	40
ARTIGO 2	45
PRODUÇÃO DE NANOCRISTAIS DE CELULOSE HIDROFÓBICOS	
DISPERSÁVEIS EM ACETONA	45
1. Introdução.....	46
2.1. Materiais	48
2.2. Pré-tratamento da polpa de pinus.....	48
2.3. Isolamento de nanocristais de celulose	48
2.4. Modificação de superfície de NCC por adsorção de surfactantes	49
2.5. Avaliação da dispersão dos nanocristais de celulose.....	49
2.6. Caracterização dos nanocristais de celulose.....	49
2.6.1. Distribuição de tamanho da partícula e medidas de potencial zeta (ζ).....	49
2.6.2. Avaliação do ângulo de contato.....	49
2.6.3. Avaliação da transmitância	50
2.6.4. Espectroscopia de dispersão de energia por raios-X (EDS).....	50
2.6.5. Microscopia de força atômica (MFA)	50
2.6.6. Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	50
2.6.7. Espectroscopia na região de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....	50
2.6.8. Difração de raios-X (DRX)	51
2.6.9. Análise termogravimétrica (TGA).....	51
2.6.10. Análise estatística	51
3. Resultados e Discussão	51
3.1 FTIR.....	51
3.2. DRX	52
3.3. TGA	53
3.4. Potencial zeta	55
3.5. Ângulo de contato	57
3.6. Espectroscopia de dispersão de energia por raios-X (EDS) dos NCCMs.....	58
3.7. Avaliação da dispersão.....	59

3.8. Transmitância	61
3.9. Análise Morfológica e de Distribuição de Tamanho	62
4. Conclusão.....	63
5. Referências.....	65
ARTIGO 3.....	69
PRODUÇÃO DE NANOCOMPÓSITO ATIVO DE ACETATO DE CELULOSE INCORPORADO COM NANOCRISTAL DE CELLULOSE MODIFICADO E LISOZIMA.	69
1. Introdução.....	70
2. Materiais e métodos.....	72
2.1. Materiais	72
2.3. Modificação de superfície de NCC por adsorção de surfactantes	72
2.4. Produção do Filme Nanocompósito	73
2.5. Caracterização do Nanocompósito	74
2.5.1. Espessura	74
2.5.2 Propriedades mecânicas	74
2.5.3. Avaliação da taxa de permeabilidade ao vapor de água	74
2.5.4. Análise Termogravimétrica (TGA).....	75
2.5.5. Espectroscopia de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....	75
2.5.6. Difração de raios X (DRX)	75
2.5.7. Análise de transmitância.....	76
2.5.8. Atividade antimicrobiana <i>in vitro</i> dos filmes	76
2.5.9. Delineamento experimental e análise estatística	76
3. Resultados.....	77
3.1. FTIR.....	77
3.2. DRX	78
3.3. TGA	79
3.4. Avaliação visual e Transmissão de luz dos filmes	80
3.5. Propriedade mecânica	83
3.6. Ângulo de contato dos filmes nanocompósitos com a água	86
3.7. Permeabilidade ao vapor de água	87

3.8. Atividade antimicrobiana do nanocompósito ativo	89
4. Conclusão.....	91
CONCLUSÃO GERAL	99

INTRODUÇÃO GERAL

Tecnologias inovadoras na área de embalagens são desenvolvidas com o objetivo principal de conservação de alimentos perecíveis. Dentre as novas tecnologias se encontram as embalagens ativas com incorporação de substâncias antimicrobianas na matriz polimérica que difunde de maneira gradual para os alimentos, visando alterar, de maneira desejável as características do produto, reduzindo a quantidade de aditivos presentes no alimento. Dos antimicrobianos que pode ser adicionado aos alimentos, tem-se a lisozima que ao ser incorporado na embalagem pode agir como mais um fator para a garantia da qualidade deste produto.

Além disso, existe uma grande preocupação também com o acúmulo de embalagens plásticas no ambiente, o que traz uma série de problemas quanto à contaminação ambiental. Dessa forma aumenta o interesse pela produção de embalagens a partir de materiais biodegradáveis e de recursos renováveis, como por exemplo, o acetato de celulose que é um polímero com propriedades para formação de filmes. No entanto, o seu uso como embalagem de alimentos ainda é restrito devido a limitações em suas propriedades de barreira, mecânicas e térmicas. Com isso, a incorporação de materiais que melhorem as suas propriedades a fim de produzir um novo material que responda às exigências mecânicas e de barreira para aplicações em embalagens de alimentos vem sendo pesquisada.

Como alternativa, a produção de nanocompósitos atrai interesse na área de embalagens, estes podem ser utilizados para melhorar as propriedades mecânicas, de barreira e a estabilidade dos materiais poliméricos existentes. Estudos indicam que a incorporação de nanocristais de celulose em bases poliméricas biodegradáveis é promissora para obtenção de nanocompósitos, pois, esses materiais são isolados de fonte renovável que apresentam alto módulo de elasticidade e resistência mecânica, com elevada área superficial específica que atuam como reforço do filme, além de manter a biodegradabilidade.

Os NCCs podem ser isolados de diversas fontes de celulose. Materiais lignocelulósicos derivados de resíduos de processamento agroindustrial, e subprodutos de processamento de alimentos e subprodutos agrícolas, podem ser empregados como fontes de NCCs visando o aproveitamento e a agregação de valor aos resíduos. Um desses resíduos, com potencial para o uso de recursos renováveis de celulose são as fibras de celulose da folha e da coroa do abacaxi.

Estas fibras que são normalmente descartadas apresentam alta resistência mecânica e módulo de elasticidade elevado. Assim este tipo de resíduo agrícola é uma boa opção para a extração de fibras, por ser uma matéria-prima econômica e abundante. A extração das fibras de celulose agregará valor à cadeia produtiva do abacaxi e disponibilizará ao mercado um novo produto de aplicação comercial.

Uma outra fonte interessante para obtenção de NCCs são os resíduos provenientes das indústrias de papéis, visto que a cadeia produtiva do papel já é consolidada no mercado, favorecendo assim, obtenção de NCCs em maior rendimento com maior pureza.

As pesquisas demonstram que o uso de NCCs para desenvolvimento de embalagens apontam para ganhos nas propriedades de barreira, mecânicas e térmicas de polímeros biodegradáveis. Apesar disso, o uso dos NCCs ainda é limitado a polímeros hidrofílicos, uma vez que eles apresentam alta polaridade. Essa característica dificulta sua interação interfacial e dispersibilidade com vários polímeros hidrofóbicos, como o acetato de celulose. Dessa forma, para ampliar as suas possibilidades de aplicações, modificações na superfície dos NCCs podem ser realizadas, por meio de reações dos grupos hidroxilas que devido a sua elevada área superficial em relação ao volume, são altamente reativas e conseqüentemente podem alterar a sua polaridade.

A adição de surfactantes como modificador de superfícies dos NCCs podem viabilizar o seu uso em polímeros hidrofóbicos, bem como evitar a agregação dos NCCs durante a secagem. No entanto, a literatura ainda não apresentou uma relação entre a carga superficial dos NCCs modificados com o surfactante e sua hidrofobicidade, e nem da sua dispersão em solvente acetona; principal meio de solubilização do polímero acetato de celulose, para produção de filme biodegradável.

Portanto, objetivou-se com este estudo: (1) produzir NCCs isolados a partir de fibra de coroa de abacaxi; (2) produzir NCCs a partir de fibra de pinus e modifica-las com surfactante CTAB, para diminuir sua hidrofobicidade e permitir que se dispersem no solvente acetona; (3) produzir e caracterizar um nanocompósito ativo incorporado com lisozima e NCCs.

ARTIGO 1

CARACTERIZAÇÃO DE NANOCRISTAIS DE CELULOSE DE COROA DE ABACAXI SUBMETIDOS À HIDRÓLISE ÁCIDA

RESUMO

Neste trabalho foram obtidos e caracterizados nanocristais de celulose (NCCs) de coroa de abacaxi, como forma de aproveitar e agregar valor a este resíduo, bem como foram avaliados a influência do tempo de hidrólise nas principais características dos NCCs e avaliar a redispersão dos cristais em água. A coroa de abacaxi purificada e os nanocristais de celulose foram caracterizados quanto à morfologia, às dimensões, a carga superficial, ao índice de cristalinidade, aos grupos funcionais e a estabilidade térmica. O tempo de hidrólise influenciou nas características dos NCCs, cujos o comprimento médio variaram de 274 a 295 nm, diâmetro entre 3,7 a 11 nm, relação de aspecto entre 24,9 a 69,8, potencial zeta entre -17,3 a -24,6 mV e cristalinidade entre 56 a 85%. O rendimento máximo de NCCs foi de 29,9% (m/m). Dois tipos de suspensões de NCCs foram secos, e a sua redispersão em água foram comparadas. A suspensão de NCCs, com pH ajustado com NaOH para o valor de 7, e que foi liofilizada, redispersou melhor em água do que os NCCs dialisados e liofilizados, apresentando dimensões próximas aos dos NCCs em suspensão. Ao se comparar os NCCs secos na forma de sais de sódio com o NCC disponível comercialmente, o NCC obtido a partir da cora de abacaxi apresentou comprimentos maiores, mas com maior relação de aspecto. Em relação ao potencial zeta, valores de -47 e -41 mV foram observados para o NCC comercial e o NCC isolado a partir da coroa de abacaxi, respectivamente. Os resultados comprovam que a partir do resíduo da indústria de alimentos, nanocristais de celulose com alta cristalinidade, alta relação de aspecto e boa capacidade de redispersão em água foram extraído da coroa de abacaxi, ampliando a gama de produtos de alto valor agregado proveniente dessa matéria-prima para ser usado como agente de reforço na produção de embalagens.

Palavras-chaves: Nanocristais de celulose. Coroa de abacaxi, Resíduo, hidrólise ácida.

1.Introdução

Os nanocristais de celulose tornaram-se um dos maiores focos de estudo por pesquisadores e indústrias da área de ciência dos materiais, pois possuem uma variedade de aplicações (Grishkewich, Mohammed, Tang, e Tam, 2017; Tang, Sisler, Grishkewich, e Tam, 2017; Shankaran, 2018). Eles vêm se destacando como agente de reforço para a produção de embalagens biodegradáveis para alimentos como alternativa à substituição dos polímeros tradicionais (Abdul Khalil et al., 2016; Ferreira et al., 2018). O anseio pela sua utilização para produção de embalagens está relacionado com suas características de biocompatibilidade; renovabilidade; não toxicidade; e, também, por apresentar elevada área superficial, excelente resistência à tração e módulo de elasticidade, e superfície disponível para modificações devido à grande quantidade de grupos hidroxilas presentes (Ng et al., 2015; Cudjoe et al., 2017; Wang et al., 2018).

Os nanocristais de celulose (NCCs) estão amplamente disponíveis e podem ser isolados de diversos materiais celulósicos. O uso de resíduos agrícolas para a sua extração é uma boa opção por serem fontes mais econômicas e abundantes, além de agregar valor a esses resíduos, com possível aplicação comercial (Morian, Vilaplana, e Ek, 2016; Bano e Negi, 2017).

O uso de folhas e coroas de abacaxi como fonte de NCC é uma alternativa para agregar valor a esses resíduos, pois o Abacaxi (*Ananas comosus*) é uma das frutas mais consumidas e processadas no mundo (FAOSTAT, 2018) e, aproximadamente, 10 a 25% do seu peso total são provenientes da sua coroa (Tran, 2006). A cadeia produtiva do abacaxi gera mais de três bilhões de toneladas de subprodutos por ano (Prado & Spinacé, 2019), sendo que esses subprodutos são na maioria das vezes descartados no ambiente e raramente são utilizados para alimentação animal (Santos et al., 2013). Além disso, as fibras de celulose de folhas de abacaxi possuem conteúdo de celulose, variando de 35 a 75%, (Santos et al., 2013; Sena et al., 2015), alto teor de regiões cristalinas (61-78%) e propriedades mecânicas que apresentam alta resistência (629-1309 MPa) e rigidez específica (37-86 GPa) (Sena et al., 2015). Quando comparadas com outras fibras vegetais, as fibras de celulose de folhas de abacaxi podem apresentar propriedades mecânicas e de barreiras superiores às das fibras de carauá (Reddy, Vivekanandhan, Misra, Bhatia, e Mohanty, 2013) e semelhante às das fibras de vidro e de aramida (Callister & Wiley, 2007), tornando-as atrativas como agente de reforço em matrizes

poliméricas (Sena, Araujo, Souza, Mattoso, & Marconcini, 2013; Kengkhetkit e Amornsakchai, 2014; Nopparut & Amornsakchai, 2016).

Estudos indicaram que o uso de fibras de celulose em tamanho nano podem potencializar ainda mais as propriedades mecânicas e de barreira de materiais poliméricos (Ferreira, Mariano, Rabelo, Gouveia, e Lona, 2018). Apesar disso, o uso de folhas de coroas de abacaxi como matéria-prima para obter NCCs (Santos et al., 2013; Prado e Spinacé, 2019) tem sido pouco explorado, e ainda não há aplicação desses nanocristais na produção de polímeros. Um método muito utilizado para extrair NCCs é a hidrólise ácida (Kunaver Matjaz e Ema, 2016). No entanto, a propriedade de reforço dos NCCs pode ser afetada por suas próprias características estruturais que dependem principalmente da condição de hidrólise ácida (tempo, temperatura e concentração do ácido), e da dispersão dos NCCs na matriz polimérica (Moriani et al., 2016; Bano e Negi, 2017).

Conhecer como os parâmetros de hidrólise afetam nas características do NCCs é importante para obter NCCs com maior índice de cristalinidade, maior carga superficial, maior razão de aspecto (comprimento/diâmetro), maior rendimento e boa dispersão na matriz polimérica (Ng et al., 2015). A dispersão dos NCCs em água após secagem é uma das maiores dificuldades para sua aplicação, uma vez que após esse processo, pode ocorrer aglomeração dos NCCs (Han, Zhou, Wu, Liu, e Wu, 2013; Beuguel, Tavares, Carreau, e Heuzey, 2018).

Portanto, objetivou-se com este trabalho extrair e caracterizar nanocristais de celulose a partir da coroa de abacaxi por hidrólise com ácido sulfúrico, e avaliar a influência do tempo de hidrólise ácida nas características dos NCCs e no rendimento, e analisar a dispersão de NCCs secos por liofilização após uso de duas técnicas, a da diálise e do ajuste do pH com hidróxido de sódio, comparando a dispersão de ambos materiais com a de nanocristais de celulose comercial.

2. Materiais e métodos

2.1. Materiais

As coroas de abacaxis (*Ananas Comosus*, cultivar Pérola) foram adquiridas em comércio local de Viçosa, Minas Gerais, Brasil; nanocristais de celulose, comercializados pela Universidade do Maine (Orono, ME, EUA), isolado de mistura de *Pinus spp*; hidróxido de sódio (Vetec Química Fina Ltda, P.A., Brasil); peróxido de hidrogênio (Sulfal Química, Brasil); ácido acético glacial pureza 99,85% (Vetec

Química Fina Ltda, P.A., Brasil); cloreto de sódio (Vetec Química Fina Ltda, P.A., Brasil); clorito de sódio (NaClO_2) grau de pureza 80% (Vetec Química Fina Ltda, P.A., Brasil); ácido sulfúrico (Vetec Química Fina Ltda, P.A., Brasil); membrana de celulose (76 mm) (D9402-100FT, Sigma-Aldrich, E.U.A).

2.2. Pré-tratamento da coroa de abacaxi

As coroas de abacaxi (CA) foram limpas, cortadas e secas a 50 °C por 48 horas (Ethiktechnology, 20 modelo 400/*ND 200, Brasil), e posteriormente foram moídas e classificadas em uma peneira de 10 mesh. As fibras foram isoladas por tratamento alcalino com NaOH a 2% por 4 horas a 100 °C na proporção de 1:20 de serragem para NaOH, sob agitação mecânica (Fisatom, modelo 725A, Brasil) conforme reportado por Santos et al. (2013). Posteriormente, os materiais tratados foram branqueadas com peróxido de hidrogênio em meio alcalino na proporção de 1:40 (serragem/solução), conforme procedimento realizado por Moreira.(2010), nos quais foram usadas misturas de soluções de peróxido de hidrogênio 24% (v/v) e de hidróxido de sódio 4% (m/v) na proporção de 1:1 (v/v), aquecidas à temperatura entre 45 e 50 °C sob agitação mecânica de 500 rpm (Fisatom, modelo 725A, Brasil) durante 2 horas.

2.3. Isolamento de nanocristais de celulose

Os nanocristais foram isolados da fibra de celulose obtida de coroa de abacaxi após tratamento alcalino e branqueamento (CAB), utilizando-se 20 mL de ácido sulfúrico a 55% (m/v) para cada grama de fibra e mantidos em contato por 30, 60, 90, 120 e 150 min à 45 °C. A reação foi paralisada com água gelada (5 a 8 °C), utilizando o mesmo volume da hidrólise. A mistura foi centrifugada a 8500 g por 10 min a 20 °C, e então dialisada com membranas de diálise até atingir pH entre 6 a 7. Cada suspensão de NCC foi submetida à agitação ultrassônica (desruptor de células digital, QR500, ECO-SONICS, Brasil) a 400 W com frequência de 60 kHz por 10 min sob banho de gelo, e, então, armazenadas a 4 °C. Os nanocristais foram secos por liofilização (FreeZone 2.5 benchtop, Labconco, Canadá) por três dias.

2.4. Avaliação da composição química

A composição química da CA e da CAB foi determinada por meio de métodos convencionais seguindo norma americana da Associação Técnica da Indústria de Papel e Celulose (TAPPI). O teor de umidade foi determinado pelo método secagem

em estufa, e o resultado foi obtido por gravimetria. O teor de extrativos solúveis em solvente orgânico (acetona), o teor de lignina insolúvel Klason, o teor de holoceulose (α -celulose + hemicelulose) e o teor de cinzas (2 horas a 800 °C) foram determinados conforme procedimentos realizados por Santos et al. (2013). O teor de α -celulose foi determinado tratando a holocelulose com solução de hidróxido de sódio a 17,5% (m/v) de acordo com o procedimento realizado por Mariano, Cercená e Soldi. (2016). O teor de hemicelulose foi determinado pela diferença entre a holocelulose e a α -celulose.

2.5. Avaliação do rendimento

O rendimento após branqueamento da fibra e após hidrólise ácida foram determinados por diferença gravimétrica com secagem dos materiais a 105 °C até massa constante (TAPPI).

2.6. Avaliação da redispersão dos nanocristais de celulose após secagem

Foram realizados dois procedimentos distintos antes da secagem da suspensão de NCC. Uma suspensão de NCC foi dialisada até pH entre 6 a 7, e seca por liofilização (NCC-ds) e a outra, teve o pH da suspensão ajustado para 7 com NaOH, antes da secagem por liofilização (NCC-Na). Os NCCs secos foram redispersos em água por meio do uso do ultrassom (Unique Group, Indaiatuba, SP, Brasil) a 400 W por 10 min para avaliar o efeito da dispersibilidade do NCC em água. Os NCCs dispersos foram avaliados em função do tamanho, carga superficial (Zetasizer Nano ZS Malvern, UK), microscopia de força atômica e de transmissão.

2.7. Caracterização

2.7.1. Distribuição de tamanho da partícula e medidas de potencial zeta (ζ)

As análises de distribuição de tamanho hidrodinâmico e medida do potencial elétrico superficial foram realizadas com auxílio de Zetasizer NanoZS (NanoZS, Malvern, UK), em triplicata. A suspensão aquosa de NCCs foi dispersa em ultrassom a 400 W por 10 min, e, então realizadas as leituras.

2.7.2. Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

A morfologia e as dimensões (comprimento x largura) dos NCCs, redispersos após secagem, foram obtidas no microscópio eletrônico de transmissão Zeiss (modelo EM 109 a 120 Kv, Alemanha). A suspensão de

NCCs (0,1% m/v) foi submetida ao ultrassom (400 W por 10 min) e corada negativamente com uma solução de etanol de acetato de uranila a 2% (m/v). A imagem dos NCCs foi comparada à imagem de MET do NCC comercial.

2.7.3. Microscopia de força atômica (MFA)

As dimensões dos NCCs foram avaliadas por microscopia de força atômica (NT-MDT, modelo NTEGRA PRIMA, Rússia). A suspensão de NCCs (0,1% m/v) foi sonicada a 400 W, por 10 min, em um ultrassom (Unique Group, Indaiatuba, SP, Brasil). As medidas foram feitas no modo de contato intermitente, utilizando sonda com raio de curvatura de 10 nm, constante de força de 10 N/m e frequência de ressonância de aproximadamente 280 kHz.

2.7.4. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As morfologias superficiais da CA, CAB e dos NCCs secos foram avaliadas pela análise de microscopia eletrônica de varredura (Tabletop Microscope, modelo TM3000, Shaumburg, IL, USA), operando com a voltagem de aceleração de 15 KV.

2.7.5. Espectroscopia na região de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros de FTIR dos materiais foram realizados em um espectrômetro FT-IR (Nicolet 6700, Thermo Scientific, EUA) utilizando região varredura de 4000 cm^{-1} a 400 cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1} e um total de 32 varreduras por amostra (Moriana et al., 2016).

2.7.6. Difração de Raios-X (DRX)

A cristalinidade da CA, CAB e dos NCCs foram obtidas utilizando difratômetro (Shimadzu, Kyoto, Japan) utilizando filtro de Ni e radiação Cu- α ($\lambda = 1,5406 \text{ \AA}$), variação angular de 10 a 40° (2 θ), velocidade de 3°·min⁻¹, tensão de 40kV e corrente de 40 mA. O índice de cristalinidade foi determinado pelo Método de Segal (SEGAL, 1959) conforme equação seguinte:

$$IC = \left[\frac{(I_{002} - I_{am})}{I_{002}} \right] \times 100 \quad \text{Equação 1}$$

Em que, I_{002} é a intensidade máxima de difração do pico principal em $2\theta = 22,5^\circ$, e I_{am} é a intensidade de difração da celulose amorfa em $2\theta = 18,4^\circ$.

2.7.7. Análise termogravimétrica (TGA)

As propriedades térmicas da CA, CAB e dos NCCs 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 fluxo de 50 mL·min⁻¹, sob atmosfera de nitrogênio.

2.7.8. Espectroscopia de dispersão de energia por raios-X (EDS)

A estimativa da composição elementar relativa das amostras foi obtida usando um EDS acoplado a um microscópio eletrônico de varredura (Tabletop Microscope, modelo TM3000, Shaumburg, IL, USA) operando com aceleração de 15 kV.

2.7.9. Análise estatística

O experimento foi realizado seguindo o delineamento inteiramente casualizado (DIC) com três repetições. Os resultados de potencial zeta, tamanho (diâmetro hidrodinâmico) e rendimento foram avaliados por meio de análise de regressão com 5% de probabilidade em software Minitab 17.

Segue abaixo o resumo dos procedimentos que foram realizados no trabalho (Figura 1).

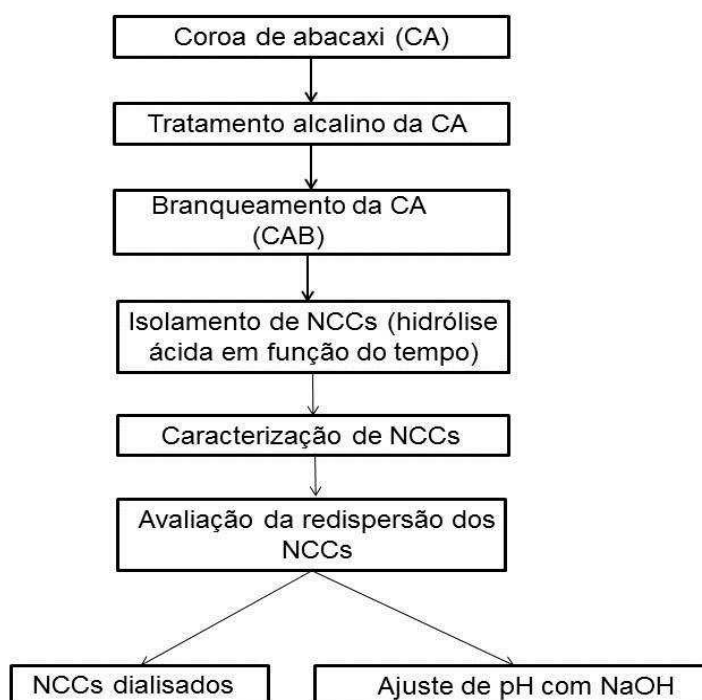


Figura 1: Resumo dos procedimentos realizados no trabalho.

3. Resultados e discussão

3.1. Composição química e rendimento da extração da fibra de celulose

A coroa de abacaxi seca apresentou $29,77 \pm 2,34\%$ de α -celulose, $19,7 \pm 2,33\%$ de hemicelulose, $17,8 \pm 6,26\%$ de lignina insolúvel e $4,76 \pm 0,35\%$ de cinzas (Tabela 1). Com a remoção da lignina e hemicelulose após tratamento alcalino e branqueamento a porcentagem de α -celulose aumentou proporcionalmente para $67,03 \pm 2,39\%$, enquanto o teor de hemicelulose e lignina insolúvel diminuíram para $17,05 \pm 2,44\%$ e $4,09 \pm 1,58\%$, respectivamente. Os resultados indicaram que os tratamentos químicos podem quebrar a estrutura da coroa inatura e promover a hidrólise parcial da hemicelulose e da lignina (Jiang et al., 2017).

Amostra	α -celulose	Lignina insolúvel	Hemicelulose	Cinzas
CA	$29,77 \pm 2,34$	$17,8 \pm 6,26$	$19,7 \pm 2,33$	$4,76 \pm 0,35$
CAB	$67,03 \pm 2,39$	$4,09 \pm 1,58$	$17,05 \pm 2,44$	$3,43 \pm 0,01$

Tabela 1: Composição química da coroa de abacaxi (CA) e da coroa de abacaxi após tratamento alcalino e branqueamento.

Após os tratamentos químicos, houve mudanças na aparência da coroa de abacaxi, alterando a cor de marrom (coroa seca) a branco (coroa branqueada), confirmando a remoção de parte dos materiais aderidos à celulose (Figura. 3.1A e 1B) que foi fundamental para melhorar a eficiência de extração de NCCs. O rendimento do processo de purificação da coroa de abacaxi foi de $26,68\%$ (massa seca), esse resultado está relacionado ao menor conteúdo de α -celulose presente na coroa quando comparado ao da folha de abacaxi com $37,93\%$ (massa seca, conforme verificado por Santos et al. (2013) que obtiveram um rendimento de 40% (m/m).

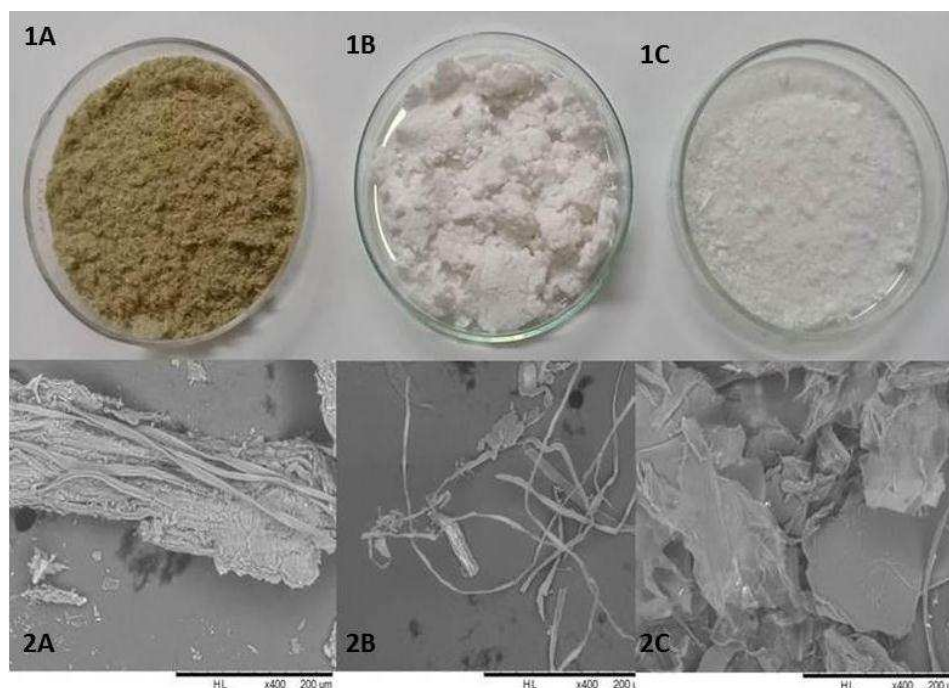


Figura 2. Imagens de MEV da coroa de abacaxi moída seca (A), após tratamento alcalino e branqueamento (B) e dos NCCs secos (C).

3.2. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Por meio da análise de MEV pode-se confirmar que a morfologia da superfície da CA, CAB e NCCs foram modificadas após tratamentos químicos. Verificou-se que a superfície da coroa após purificação estava mais lisa e sem materiais aderidos às fibrilas quando comparado à coroa inatura (Figura 2-2A e 2 B), confirmando assim, a remoção de parte da hemicelulose e da lignina aderidos à celulose, resultando na desfibrilação e individualização das microfibrilas de celulose (Bano & Negi, 2017).

A morfologia dos NCCs secos por liofilização é caracterizada pela formação de nanocristais aglomerados, possivelmente devido à formação de ligações de hidrogênio entre as superfícies adjacentes dos mesmos durante o processo de congelamento para secagem por liofilização (Naduparambath, Jinitha, Shaniba, Sreejith, & Balan, 2018) (Figura 2-2C). As imagens de MEV mostraram que a morfologia dos NCCs em estado sólido é diferente quando comparado com os mesmos em suspensão como visto na imagem de MFA (Figura. 6), em que os NCCs apresentaram forma de bastonetes e tamanho nano.

3.3. Análise por espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros de FTIR mostraram as mudanças químicas que ocorreram durante o pré-tratamento químico da coroa de abacaxi e dos NCCs. O

desaparecimento do pico 1735 cm^{-1} , atribuído à vibração da ligação C=O do grupo acetila e urônicos da hemicelulose no espectro da CAB indicaram a remoção parcial da hemicelulose no processo de purificação da fibra inatura (Figura. 3A e 3B) (Siqueira, Bras, e Dufresne, 2010). Os picos característicos da celulose aparecem em todas as amostras analisadas, sendo 3345 cm^{-1} , correspondente à vibração das ligações dos grupos O-H, 2973 cm^{-1} à vibração da ligação dos grupos C-H, 1050 cm^{-1} ao estiramento C-O e 895 cm^{-1} à vibração de deformação angular no plano C-H da celulose, sendo mais intensos na CAB e nos NCCs (Figura 3 C), indicando aumento proporcional da porcentagem de material celulósico devido à remoção de lignina, hemicelulose e de impurezas durante a purificação (Babosa, 2007; Ng et al., 2015; Xing, Gu, Zhang, Tu, & Hu, 2018).

Esses dados, mostraram que o pré-tratamento utilizado foi eficaz para reduzir os materiais associados a celulose na CA, no entanto, não foi possível removê-los totalmente, conforme foi verificado também na análise de composição química das amostras. Os NCCs isolados apresentaram espectros similares ao da fibra branqueada, mas, houve o aparecimento de um pico em 1205 cm^{-1} nas amostras de NCCs hidrolisados com 90, 120 e 150 min e NCC comercial (NCC-co) que, possivelmente, indicou a presença de grupos S=O nos nanocristais, ocorrida devido às reações de esterificação após hidrólise ácida (Fig. 3D) (Ng et al., 2015).

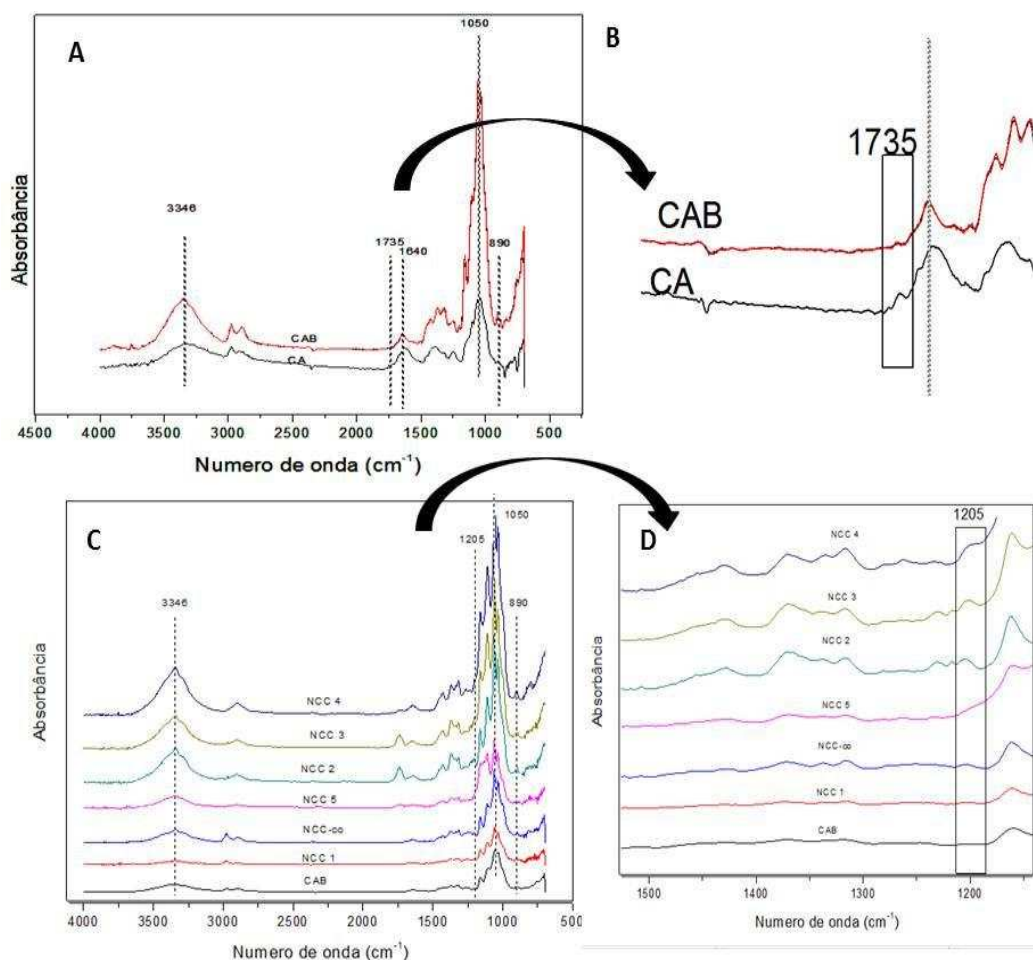


Figura 3. Espectros de FTIR de CA e CAB (A) e aplicação do espectro no comprimento de onda de 1735 cm^{-1} (B); e NCC hidrolizados por 30 min (NCC1), 60 min (NCC2), 90 min (NCC3), 120 min (NCC4) e 150 min (NCC5); e NCC comercial (NCC-co) (C) e a ampliação do seus espectros no comprimento de onda em 1205 cm^{-1} (D).

Segundo Babosa (2007) composto contendo grupamentos S=O pode apresentar vibrações assimétricas entre 1410 e 1290 cm^{-1} e simétricas, que ocorrem entre 1205 a 1100 cm^{-1} . Os NCCs apresentaram espectros semelhantes entre si, entretanto, à medida que aumentou-se o tempo de hidrólise até 120 min, houve aumento da intensidade do pico 1050 cm^{-1} , indicativo do maior teor de celulose. Já para NCCs isolados com 150 min, observou-se uma redução nesse mesmo pico, sugerindo que parte da celulose foi degradada. Foi observada similaridade entre os picos característicos do espectro de NCC isolado de coroa de abacaxi e NCC comercial, demonstrando que os nanocristais apresentaram características químicas semelhantes.

3.4. Difração de raios-X (DRX)

Em todos os perfis dos difratogramas, houve predominância de celulose do tipo I, verificado pela presença de picos em $2\theta = 15^\circ$ (plano 101), 22° (plano 200) e 34° (plano 004) (Milanez et al., 2019) (Figura 4). Os difratogramas mostraram picos similares, indicando que não houve transformação polimórfica da celulose após os tratamentos aplicados (Moreira, 2010; Cudjoe et al., 2017). A preservação do polimorfismo da celulose nos NCCs é importante, visto que celulose do tipo I tem sido sugerida como a celulose de maior resistência mecânica (Moreira, 2010). A medida que a celulose era isolado dos demais constituintes presentes na CA, o pico cristalino no plano 22° tornou-se mais acentuado e estreito nas amostras, o que indica que a cristalinidade foi aumentada após os tratamentos de purificações (Lu & Hsieh, 2012; Jiang et al., 2017), havendo o aumento do índice de cristalinidade de 52% para 80%, devido à remoção progressiva da maior parte de hemicelulose, lignina e outros compostos não celulósicos amorfos, confirmando o resultado obtido por FTIR.

Os NCCs isolados com 30, 60 e 90 min apresentaram cristalinidade de 81, 85 e 78%, respectivamente, indicando que as regiões amorfas da celulose foram removidas permanecendo as regiões cristalinas ordenados (Lu & Hsieh, 2010), sem contudo, ocorrer hidrólise parcial dos nanocristais. No entanto, com tempos maiores de hidrólise, de 120 e 150 minutos, houve redução do IC, para 60% e 56% respectivamente, o que indica que tempos maiores de hidrólises foram capazes de destruir não apenas as regiões amorfas, mas também, uma parte das regiões cristalinas da celulose. Apesar disso, a morfologia dos NCCs foi mantida conforme análise de MFA (Fig. 6). O mesmo comportamento foi verificado por Santos et al. (2013), Cudjoe et al. (2017) e Milanez et al. (2019), nos quais os maiores tempos de hidrólise avaliados, proporcionaram a diminuição do IC dos NCCs. Valores semelhantes de IC foram reportados por Santos et al. (2013) com valor máximo de 87% para folha de abacaxi, e por Prado & Spinacé (2019) com IC de 73% para coroa de abacaxi.

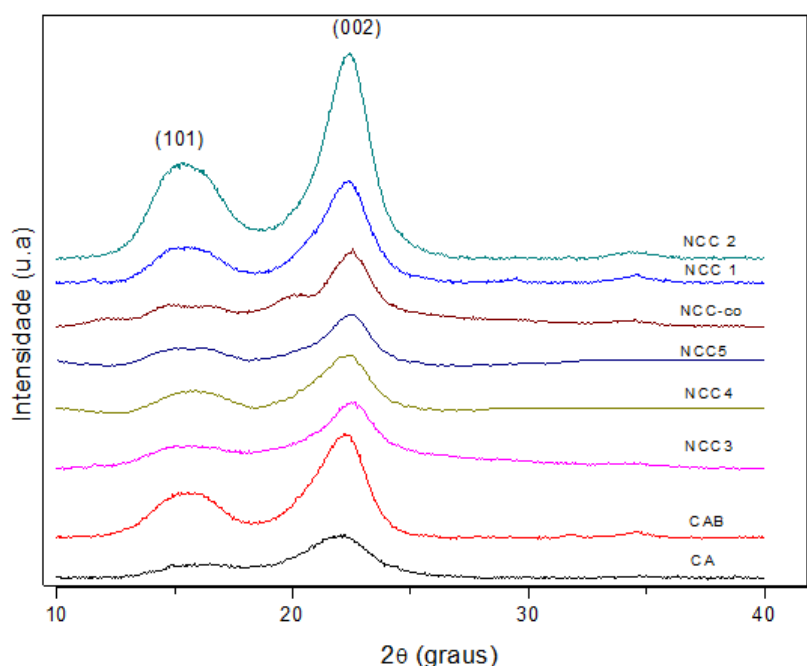


Figura 4. Difratomogramas de raios-x da CA, CAB; e NCC hidrolisados por 30 (NCC1), 60 (NCC2), 90 (NCC3), 120 (NCC4) e 150 min (NCC5); e NCC comercial (NCC-co).

O NCC isolado da coroa de abacaxi apresentou IC próximo ao do NCC comercial (80%), no entanto, o último mostrou picos de difrações característicos de celulose tipo I e II (ângulos de 12,5, 20,1, 22,7 e 34) (Xing et al., 2018). A coexistência da celulose I e celulose II no NCC comercial pode ser atribuída ao processo de tratamento alcalino e hidrólise ácida realizada para o isolamento dos NCC em que parte da celulose tipo I é transformada em tipo II (Xing et al., 2018). A preservação da integridade da celulose tipo I e a cristalinidade dos NCCs isolados da CA podem contribuir para aumentar a sua resistência e rigidez aumentando seu potencial para ser utilizado como reforço em diversos materiais (Meng et al., 2018).

3.5. Análise termogravimétrica (TGA)

Na análise termogravimétrica foi observada uma pequena perda inicial de massa, abaixo da temperatura de 100 °C, referente à evaporação da água adsorvida nas fibras (Xing et al., 2018) (Figura. 5). Para a CA, foram observados 2 eventos de degradação, sendo, o primeiro (123 a 232 °C), atribuído à decomposição da hemicelulose, e o segundo (241 a 250 °C), referente à degradação da cadeia de celulose, onde ocorreu a despolimerização, desidratação e a decomposição das unidades glicosídicas da celulose (Araki, Wada, Kuga, & Okano, 1998; Bano & Negi, 2017). Após tratamentos da CA, houve aumento da temperatura de degradação

máxima (355 °C) que ocorreu na faixa de 273 a 380 °C, correspondente à degradação das cadeias de celulose. A maior estabilidade térmica da CAB em relação a CA está relacionada com a remoção parcial de componentes não celulósicos com temperaturas de degradação mais baixas como lignina, hemicelulose e pectina que foram relativamente removidos pela purificação (Jiang et al., 2017). Além disso, a remoção dos materiais não celulósicos diminuiu a formação de carvão na fibra tratada após aquecimento até 600 °C, diminuindo assim, a sua massa residual (Figura. 5 A). As fibras de celulose após pré-tratamentos (CAB) apresentaram temperatura de degradação (356 °C) próxima à temperatura de degradação máxima da folha do abacaxi com cerca de 340 °C (Santos et al., 2013).

Os NCCs isolados em diferentes tempos de hidrólises apresentaram temperaturas de degradação menores que a fibra branqueada. De acordo com a literatura, o ácido sulfúrico causa diminuição da estabilidade térmica dos NCCs, devido à incorporação de grupos sulfato sobre a superfície da celulose após a hidrólise, apresentando um efeito catalítico nas reações de degradação térmica dos NCCs (Roman & Winter, 2004).

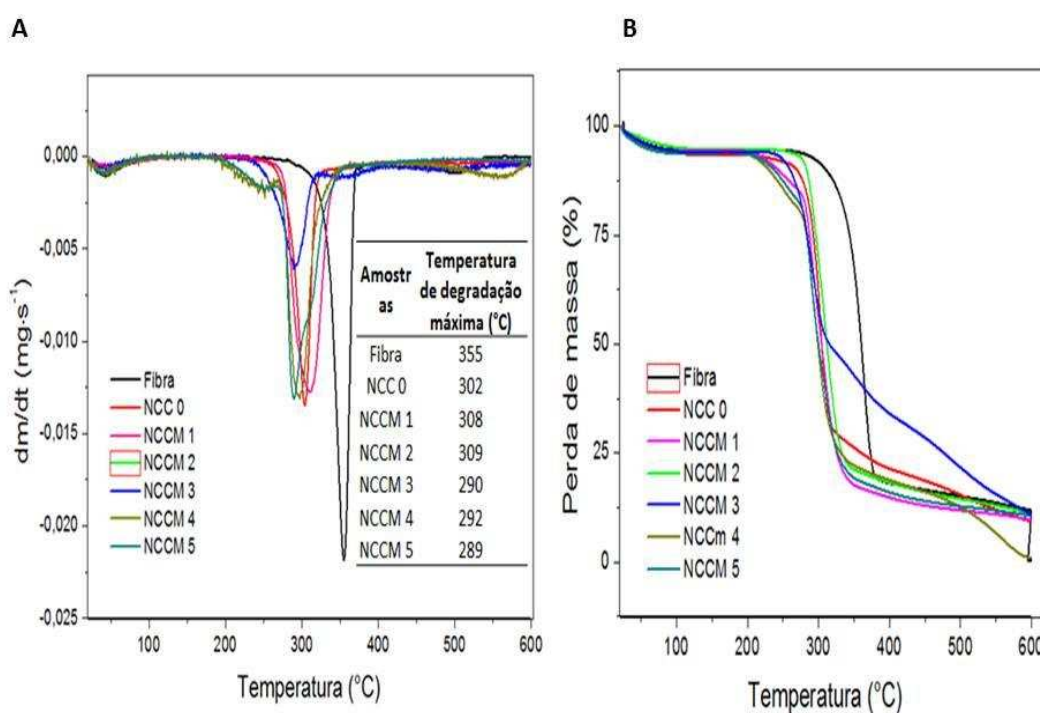


Figura 5. Termogramas (A) e curvas de DTG (B) da CA, CAB, NCC isolados com 30 min (NCC1), 60 min (NCC2), 90 min (NCC3), 120 min (NCC4) e 150 min (NCC5), e NCC comercial (NCC-co).

Os NCCs extraídos com 120 min (NCC 4) e 150 min (NCC5) apresentaram perfis de degradação similares, com três eventos de degradação. Os NCCs isolados com 120 min apresentaram no primeiro estágio, degradação variando entre 240 a 310 °C, com degradação máxima de em torno de 280 °C, uma segunda degradação, entre 325 a 378 °C, e o terceiro entre 432 a 516 °C (Figura 5B). De acordo com a literatura (Roman & Winter, 2004; Wang, Ding, & Cheng, 2007; Bano & Negi, 2017; Xing et al., 2018), o primeiro evento refere-se à degradação dos NCCs que foram sulfatados durante a hidrólise, sugerindo que o primeiro evento seja devido à degradação das regiões mais acessíveis à sulfatação durante a hidrólise ácida. A segunda etapa corresponde à decomposição das regiões mais internas dos NCCs, as quais provavelmente sofreram menor grau de sulfatação (Mandal & Chakrabarty, 2011; Carvalho, Pereira, Odila, & Cioffi, 2017). Já a terceira etapa está relacionada com a degradação do resíduo carbonizado gerando produtos gasosos de baixa massa molecular (Roman & Winter, 2004; Mandal & Chakrabarty, 2011; Milanez et al., 2019). A composição do resíduo carbonizado é atualmente incerta, no entanto, supõe-se que contem hidrocarbonetos de levoglucosano juntamente com o H, CO, CO₂ e H₂O (Peng & Gardner, 2013; Reid, Villalobos, & Cranston, 2016).

Os NCCs obtidos com menores tempos de hidrólises (30, 60 e 90 min) apresentaram mesmo comportamento entre eles, com dois estágios de degradação, um, em torno de 309 °C e outro em 440°C, e maior temperatura de degradação quando comparado ao tempo de hidrólise de 120 e 150 min. Estes resultados são consistentes com a análise de EDS e valor de potencial zeta (Tabela 2), no qual, foi possível avaliar que o aumento do tempo de hidrólise aumentou a quantidade de enxofre presente nos NCCs, diminuindo assim a sua temperatura de degradação. Santos et al. (2013) relataram em seus estudos que o aumento do tempo de hidrólise também proporcionou a diminuição da estabilidade térmica dos NCCs extraídos de folha de abacaxi. Além disso, Jiang et al. (2017) relacionaram que NCCs com valores mais altos de cristalinidade tiveram um efeito positivo na resistência ao calor e resultaram em uma menor diminuição na temperatura máxima para a degradação térmica dos NCCs. Esta tendência também foi encontrada para os NCCs isolados de CAB, em que o aumento do tempo resultou em NCCs com menores IC, e com menores temperaturas de degradação térmica.

A estabilidade térmica dos NCCs isolados de CAB apresentou-se próximas do NCC-co (Figura 6) sendo que os NCCs isolados com o tempo de 30 a 90 min,

apresentaram temperaturas de degradação levemente superior ao do NCC-co. Dessa forma, os NCCs de coroa de abacaxi podem ser também utilizados como agentes de reforço para processamento de materiais termoplástico, que possuem temperaturas de produção acima de 200 °C.

3.6. Análise morfológica e de dimensional dos NCCs

A hidrólise ácida utilizando ácido sulfúrico 55% (m/v) resultou na remoção das regiões amorfas das fibras de celulose e respectivo isolamento de NCCs com estruturas semelhantes a bastonetes (Figura 6). Durante a hidrólise, a solução penetrou nas regiões amorfas da celulose e clivou as ligações β -1,4 entre as unidades repetidas de celulose, quebrando suas cadeias e isolando os cristais de celulose (Wang et al., 2007). A partir da informação topográfica obtida usando a MFA foi realizada a análise de tamanho das amostras de NCC em suspensão aquosa antes da liofilização. Para isso, cristais individuais foram analisados usando MFA, e valores de comprimento e largura foram calculados. A altura da imagem de MFA em 3D foi usada para determinar sua largura (diâmetro) (Tabela 1).

Amostra	Comprimento (nm)	Diâmetro (nm)	Razão de aspecto	Potencial Zeta (mV)	(EDS)
NCC 1	274 ± 161	11 ± 7,3	24,9 ± 15,2	-17,3 ± 2,0	0,269
NCC 2	295 ± 135	7,0 ± 5,7	44 ± 20,8	-22,5 ± 0,6	0,291
NCC 3	286 ± 143	5,0 ± 4,3	57,4 ± 28,7	-23,4 ± 0,5	0,406
NCC 4	289 ± 122	5,4 ± 4,5	53,6 ± 22,4	-24,6 ± 1,2	0,443
NCC 5	283 ± 138	3,7 ± 4,1	69,8 ± 34,1	-23,8 ± 0,9	0,470

Tabela 2. Comprimento, diâmetro, razão de aspecto (comprimento/diâmetro), dos NCCs obtidos por imagens de AFM, potencial zeta e teor de enxofre obtido por EDS.

De acordo com as imagens, os NCCs apresentaram medidas de comprimento e diâmetro próximos em todos os tempos de hidrólises com médias em torno de 285 nm. (Tabela 2). Os NCCs isolados com 30 min apresentaram maior aglomeração quando comparado aos demais tempos, que pode ser devido ao seu menor potencial zeta. As imagens confirmam os resultados obtidos pela análise de tamanho por DLS, em que, não foi encontrada diferença significativa ($p > 0,05$) entre os tamanhos hidrodinâmicos aparentes das suspensões de NCCs, sugerindo que o tempo não influenciou na extração de NCC com diferentes comprimentos (Figura 7). Entretanto, o tempo de hidrólise mostrou uma tendência na redução do diâmetro e aumento na razão de aspecto com o aumento do tempo de hidrólise, porém com altos valores de desvio padrão (Tabela 2).

Comportamentos diferentes foram encontrados por Santos et al. (2013), Martins et al. (2015) e El, Kassab, Aboulkas, Gaillard, & Barakat, (2018) que mostraram que aumento do tempo de hidrólise proporcionou uma diminuição do comprimento e da razão de aspecto dos NCCs. Os dados mostraram que os nanocristais isolados e a CAB estão próximos aos resultados encontrados por Santos et al. (2013) e Prado & Spinacé. (2019), que isolaram NCCs de folhas de abacaxi e coroa de abacaxi, e obtiveram NCC com comprimento médio de 249 nm e 245 nm, respectivamente, caracterizados por MFA.

A razão de aspecto para os nanocristais isolados de CAB variaram de 24,9 a 69,8 (valores médios). Já no estudo de Prado & Spinacé, (2019) a razão de aspecto foi menor (6,3) para o NCC, também, isolado de coroa de abacaxi. Valores maiores de razão de aspecto são desejáveis, pois quando esses valores são elevados indica-se que pode ocorrer uma maior interação interfacial entre o NCC e a matriz, contribuindo para uma boa transferência de tensão da matriz para o material de reforço, podendo melhorar as propriedades mecânicas e de barreiras dos poliméricos mesmo com baixas concentrações de NCCs (Rosa et al., 2010; Ng et al., 2015; Ogundare, Moodley, & Zyl, 2017).

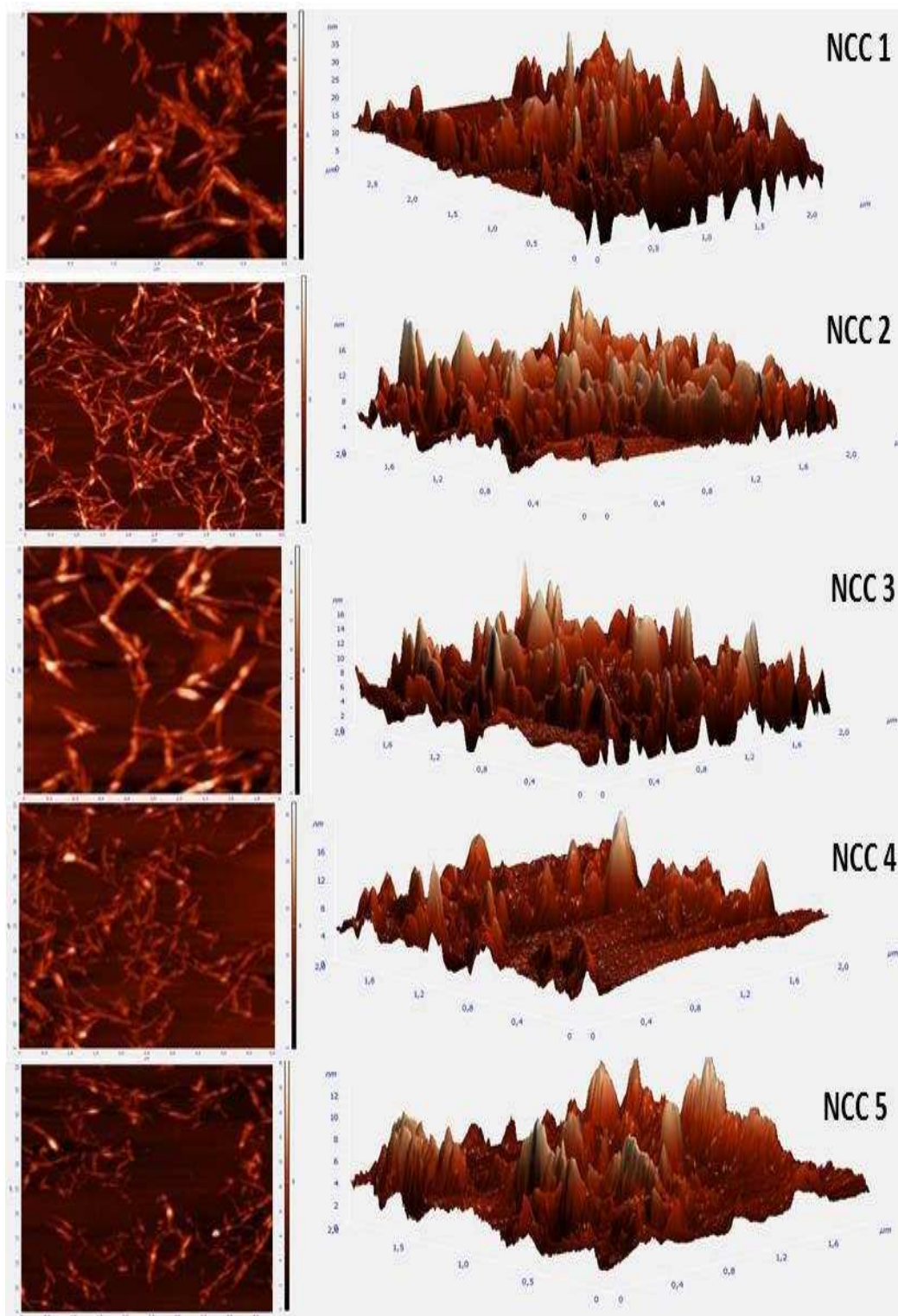


Figura 6. Imagens de MFA em 2D e 3D obtidos dos NCCs isolados com 30 (NCC1), 60 (NCC2), 90 (NCC3), 120 (NCC4) e 150 min (NCC5).

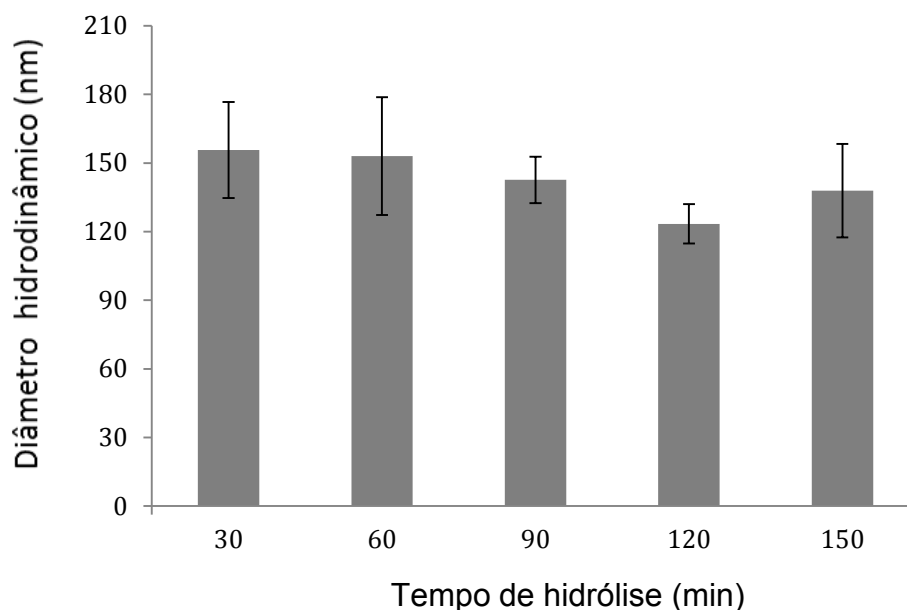


Figura 7. Diâmetro hidrodinâmico dos NCCs isolados de CAB obtidos por DLS para os diferentes tempos de hidrólise.

3.7. Potencial Zeta (ξ) e espectroscopia de energia dispersiva de raios-X (EDS)

A carga elétrica superficial é um parâmetro importante para avaliar a estabilidade da dispersão de NCCs em água. O valor médio do potencial zeta dos NCCs aumentou em função do tempo de hidrólise de forma significativa ($p < 0,05$) de 30 (-17 mV) a 60 minutos (-22 mV) e, após esse tempo não houve variação significativa no valor do potencial zeta (Tabela 2). Estudos também mostraram que o aumento do tempo de hidrólise provocou aumento do valor de potencial zeta e, conseqüentemente, aumentou a estabilidade das partículas (Kargarzadeh et al., 2012 Smyth; García, Rader, Foster, e Bras, 2017).

A suspensão de NCCs obtidas com 30 min apresentou-se mais aglomerada que as demais conforme evidenciado na imagem de MFA (Figura 6), que pode ser atribuído ao seu menor potencial zeta comparado aos demais tempos avaliados que mostraram maior dispersão (Figura 7). Segundo Zhou, Fu, Zheng, e Zhan. (2012) e Bano e Negi (2017) suspensões de NCCs com valores de potencial zeta maiores que $|15|$ mV possuem boa estabilidade, porém há autores que observaram que suspensões de NCCs com potencial zeta acima de $|25|$ e $|30|$ mV são consideradas mais estáveis, e valores inferiores podem promover a agregação das partículas e dificultar a redispersão desses materiais após secagem (Paulo et al., 2013;

Naduparambath et al., 2018). A estabilidade dos NCCs pode está relacionada aos ésteres de sulfatos ($-\text{SO}_3^-$) introduzidos aos NCCs durante a hidrólise com H_2SO_4 que produz grupos negativos de sulfatos na superfície dos NCC por sulfatação das hidroxilas presentes na superfície dos NCCs (Kargarzadeh et al., 2012; Smyth et al., 2017; Ferreira, Mariano, et al., 2018). Esses grupos promoveram a dispersão dos NCCS por repulsão eletrostática entre as cargas negativas, evitando aglomerações em suspensão aquosa.

Os comportamentos obtidos no presente trabalho estão de acordo com o teor de enxofre dos NCCs obtido na análise de EDS, em que, NCCs com maiores valores de potencial zeta, obtidos com maiores tempos de hidrólises (90,120 e 150 min), apresentaram maiores teores de enxofre (Tabela 2).

3.8. Avaliação do rendimento dos nanocristais de celulose

O rendimento para obtenção de NCCs aumentou de forma significativa ($p < 0,05$) em função do tempo de hidrólise de 30 (4,3%) a 120 min (29,9%), e, a partir de 120 min o rendimento tendeu a reduzir (Figura 8). Ao contrário desse trabalho, alguns estudos relataram que o aumento do tempo de hidrólise promoveu a diminuição do rendimento de NCCs (Santos et al., 2013; Martins et al., 2015; El et al., 2018). Essa diferença do comportamento do rendimento dos NCCs em função do tempo pode ser explicada pelas condições de hidrólise de cada pesquisa. Este estudo usou concentrações de H_2SO_4 (55% m/v) inferior aos demais estudos, que usaram cerca de 60 a 65%, levando mais tempo até que se iniciasse a hidrólise dos domínios cristalinos dos NCCs, que foi bem acentuada a partir 150 min conforme observado na análise de DRX e FTIR.

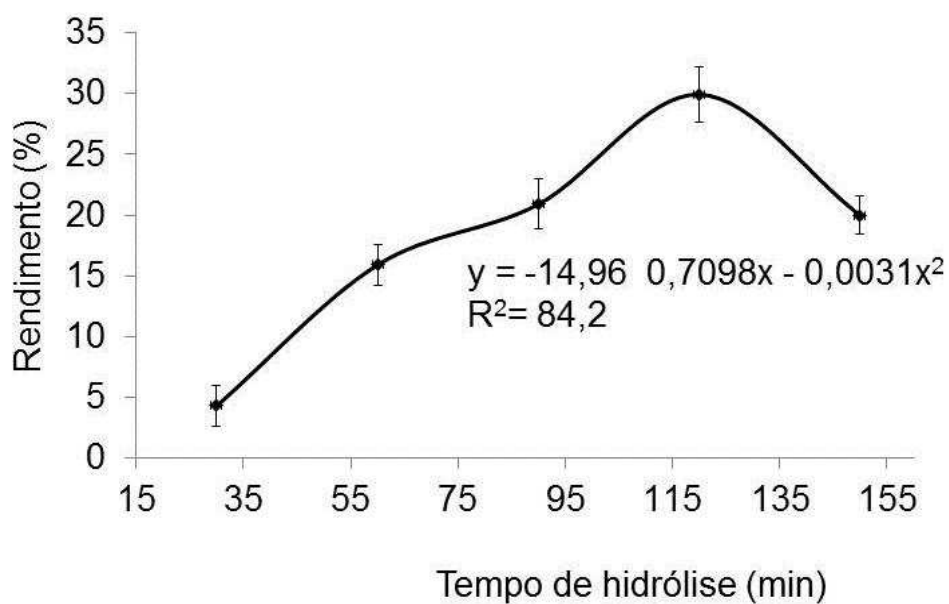


Figura 8. Rendimento dos NCCs isolados de CAB em função do tempo de hidrólise, ajustado pela análise de regressão.

3.9. Avaliação da redispersão dos NCCs em água

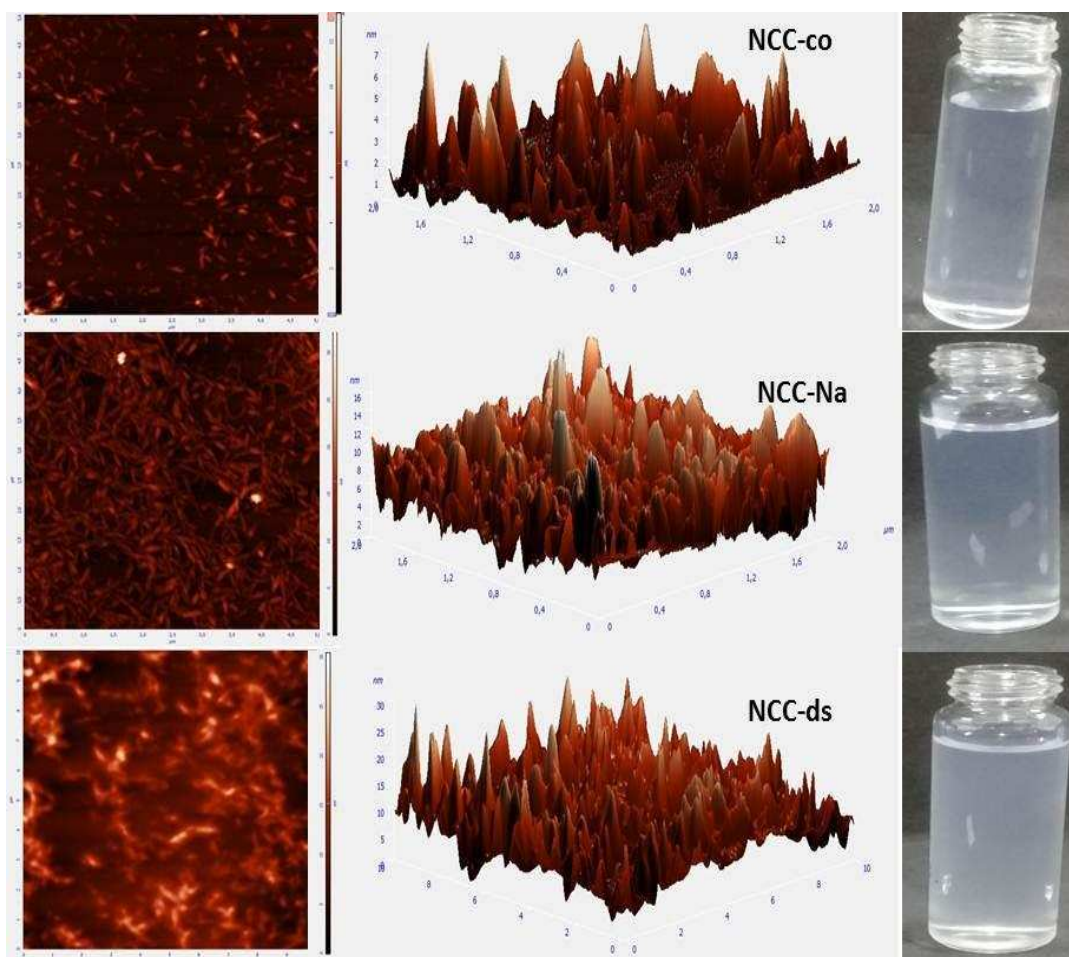


Figura 9. Imagens de MFA em 2D e 3D de NCC comercial (NCC-co), NCC isolados de coroa de abacaxi com 90 min de hidrólise (NCC-Na) com ajuste de pH da suspensão com NaOH e NCC dialisados (NCC-ds), seguidos de liofilização e redispersos em água.

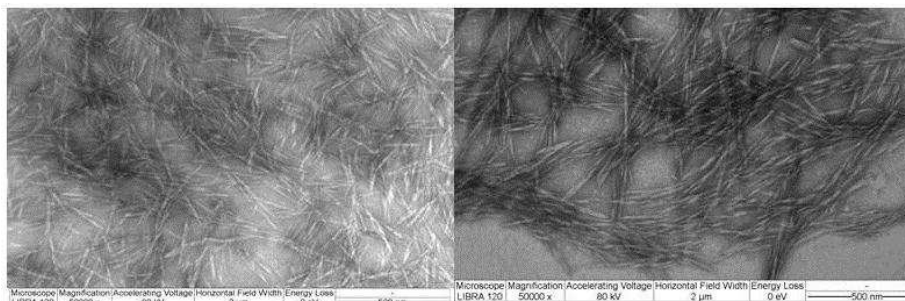


Figura 10. Imagens de MET dos NCC-co (A) (Fonte: Pola 2017) e NCC-Na (B) após redispersão em água.

A dispersão dos NCCs em água foram avaliadas após secagem por liofilização de amostras submetidas a diálise e amostras neutralizadas com NaOH. As dimensões após redispersão em água foram estimadas pela medição do comprimento e diâmetro nas imagens de MFA e MET (Tabela 3). Os comprimentos dos NCC-co e NCC-Na apresentaram valores maiores pela análise de MFA, isso ocorreu devido ao efeito de ampliação da ponta que resulta na superestimação das dimensões dos NCCs, que gerou erros nas medidas (Martins et al., 2015). Mesmo assim, foi possível avaliar que a diferença entre as amostras de NCCs avaliadas foi mantida (Tabela 3).

As imagens de MFA mostraram que NCCs secos na forma de sais de sódio apresentaram melhor dispersão que os NCCs dialisados (Figura 9). Isso ocorreu porque durante a secagem por liofilização ocorreu à aglomeração dos NCCs dificultando a redispersão dos NCCs em água. Já as amostras neutralizadas com NaOH dispersaram e apresentaram tamanho médio de $270 \text{ nm} \pm 137 \text{ nm}$, tamanhos similares aos encontrados antes da secagem. Estudo semelhante foi realizado por Beck, Bouchard, Berry, Boulevard, e Canada, (2012) que compararam a redispersão de NCCs na forma de sais de sódio e NCCs na forma ácida (com íons H^+) e observaram que NCC-Na redispersaram completamente, enquanto NCC-H não redispersaram, mesmo com sonicação intensa. De acordo com esse estudo as ligações de hidrogênio intermoleculares entre NCCs-H secos, foram mais fortes do que em NCC-Na causando maior agregação dos NCC-H, dificultando a sua redispersão.

Amostra	MFA			TEM			Potencial Zeta (mV)	EDS (S)	EDS (Na)
	Comprimento (nm)	Diâmetro (nm)	Razão de aspecto	Comprimento (nm)	Diâmetro (nm)	Razão de aspecto			
NCC-co	143 ± 72	2,0 ± 1,7	72,1±24,1	115 ± 23	10,3 ± 2,5	1,5 ± 2,3	44,7± 2,1	0,469	0,344
NCC-Na	271 ± 137	6,7 ± 5,9	38,8±19,7	212 ± 44	11,1 ± 3,2	19,3±3,9	-41,3 2,0	0,582	0,908
NCC-ds	869 ± 520	9,5 ± 9,2	90,7±54,0	-	-	-	-22,3 0,6	0,406	0,000

Tabela 3. Comprimento, diâmetro, razão de aspecto (comprimento/diâmetro), do NCC comercial (NCC-co), NCC seco após ajuste de pH com NaOH (NCC-Na) e NCC seco após diálise (NCC-ds) obtidos por imagens de MFA e MET, valor de potencial zeta e teor de enxofre obtido por EDS.

Os NCCs neutralizados obtiveram carga superficial, com potencial zeta médio de -41 mV, enquanto os NCC dialisados foram de -22 mV. O teor de enxofre do NCC-Na foi maior que o NCC-ds, que pode ser devido a resíduo de sal proveniente da neutralização do ácido sulfúrico com hidróxido de sódio que não foram completamente removidos. A presença de sódio foi encontrada na amostra de NCC-Na e NCC-co (Tabela 3), e não foi encontrada na amostra de NCC-ds, sugerindo que o Na⁺ aumentou a carga superficial dos NCCs, aumentando assim, a repulsão eletrostática entre os mesmos na redispersão dos NCC-Na após secagem.

Os NCCs comerciais apresentaram menores comprimentos e melhor dispersão do que os NCCs isolados de coroa de abacaxi tanto pela análise de MFA quanto por MET (Figura 9 e 10). O tamanho dos NCCs está relacionado com a característica da fonte de celulose utilizada para isolar os cristais, com os pré-tratamentos e com as condições de hidrólise de cada estudo (Ng et al., 2015). O potencial zeta do NCC-Na isolado da coroa do abacaxi redisperso foi próximo ao valor do NCC-co, e muito superior ao valor do NCC-ds, enquanto os valores de S foram muito próximos entre eles, indicado assim que o teor de enxofre não foi o principal fator de dispersão dos NCCs e que a presença do sódio pode contribuir para a redispersão dos NCC.

O estudo mostrou que NCCs na forma de sal de sódio, pode ser redisperso após secagem, apesar de apresentar regiões com aglomerados de NCCs, apontando que melhorias devem ser realizadas. A obtenção de NCCs na forma seca é importante, pois a comercialização requer que o NCC seja disponível na forma seca que minimiza o peso e volume no transporte, reduzindo custos. Além disso, a

secagem inibe crescimento de bactérias e fungos nos NCC e facilita a sua modificação em diferentes solventes ampliando suas possibilidades de aplicações (Beck et al., 2012).

4. Conclusões

Os nanocristais de celulose foram isolados com sucesso da coroa de abacaxi, resíduo da indústria de alimentos, por meio de tratamento alcalino, seguido de branqueamento e hidrólise ácida. O tempo de hidrólise influenciou nas características dos NCCs, obtendo NCCs com comprimentos variando de 274 a 295 nm, diâmetro de 3,7 a 11 nm, relação de aspectos de 24,9 a 69,8, potencial zeta de -17,3 a -24,6 mV e cristalinidade de 56 a 85%. O maior rendimento foi obtido com 120 min de hidrólise, com cerca de 29,9% e o maior índice de cristalinidade com 60 min (85%). O estudo indicou que as principais características dos NCCs para seu uso como reforço, podem ser potencializadas com tempos de hidrólise entre 60 a 120 min.

Concluiu-se também que foi possível obter NCC isolados de coroa de abacaxi capazes de redispersar em água, quando os NCC foram secos na forma de sais de sódio. Os NCCs aqui isolados apresentaram índice de cristalinidade e potencial zeta próximo aos valores do NCC-comercial e alta relação de aspecto. Portanto, ficou evidenciado que os nanocristais isolados de coroa de abacaxi, também possuem características desejáveis, para serem utilizados como material de reforço no desenvolvimento de filmes biodegradáveis. Além disso, o trabalho mostrou uma forma alternativa para obtenção de NCCs, que poderá ser utilizado na forma seca para aplicação em diferentes áreas da ciência, agregando valor à coroa de abacaxi.

5. Referências

- Abdul Khalil, H. P. S., Davoudpour, Y., Saurabh, C. K., Hossain, M. S., Adnan, A. S. Dungani, R. Haafiz, M. K. M. (2016). A review on nanocellulosic fibres as new material for sustainable packaging: Process and applications. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 64, 823–836.
- Araki, J., Wada, M., Kuga, S., & Okano, T. (1998). Flow properties of microcrystalline cellulose suspension prepared by acid treatment of native cellulose. *Colloids and Surfaces* 142, 75–82.
- Barbosa, L. C. A, 2007. Espectroscopia no infravermelho na caracterização de compostos orgânicos. Viçosa: Editora UFV.
- Bano, S., & Negi, Y. S. (2017). Studies on cellulose nanocrystals isolated from groundnut shells. *Carbohydrate Polymers*, 157, 1041–1049. 9
- Beck, S., Bouchard, J., Berry, R., Boulevard, S. J., & Canada, Q. C. H. R. (2012). Dispersibility in Water of Dried Nanocrystalline Cellulose. *Biomacromolecules*, 13, 1486–149.
- Beuguel, Q., Tavares, J. R., Carreau, P. J., & Heuzey, M. (2018). Journal of Colloid and Interface Science Ultrasonication of spray- and freeze-dried cellulose nanocrystals in water. *Journal of Colloid And Interface Science*, 516, 23–33.
- Callister, W. D., & Wiley, J. (2007). *Materials Science and Engineering An Introduction*. (C. ©, Ed.) (7th ed.). United States of America.
- Cudjoe, E., Hunsen, M., Xue, Z., Way, A. E., Barrios, E., Olson, R. A., Rowan, S. J. (2017). *Miscanthus Giganteus*: A commercially viable sustainable source of cellulose nanocrystals. *Carbohydrate Polymers*, 155, 230–241.
- El, M., Kassab, Z., Aboulkas, A., Gaillard, C., & Barakat, A. (2018). International Journal of Biological Macromolecules Reuse of red algae waste for the production of cellulose nanocrystals and its application in polymer nanocomposites. *International Journal of Biological Macromolecules*, 106, 681–691.
- FAOSTAT – Food and Agriculture Organization of the United Nations Statistical Database, 2010. Crops database. Disponível em <http://faostat.fao.org/ste/567/DesktopDefault>. Acesso: 20 de novembro de 2018.
- Ferreira, F. V, Dufresne, A., Pinheiro, I. F., Souza, D. H. S., Gouveia, R. F., Mei, L. H. I., & Lona, L. M. F. (2018). How do cellulose nanocrystals affect the overall properties of biodegradable polymer nanocomposites: A comprehensive review. *European Polymer Journal* ,108, 274–285.
- Ferreira, F. V, Mariano, M., Rabelo, S. C., Gouveia, R. F., & Lona, L. M. F. (2018). *Applied Surface Science* Isolation and surface modification of cellulose nanocrystals

from sugarcane bagasse waste: From a micro- to a nano-scale view. *Applied Surface Science*, 436, 1113–1122.

Grishkewich, N., Mohammed, N., Tang, J., & Tam, K. C. (2017). Current Opinion in Colloid & Interface Science Recent advances in the application of cellulose nanocrystals. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 29, 32–45.

Han, J., Zhou, C., Wu, Y., Liu, F., & Wu, Q. (2013). Self-Assembling Behavior of Cellulose Nanoparticles during Freeze- Drying: Effect of Suspension Concentration, Particle Size, Crystal Structure, and Surface Charge Biomacromolecules.

Jiang, Y., Zhou, J., Zhang, Q., Zhao, G., Heng, L., & Chen, D. (2017). Preparation of cellulose nanocrystals from *Humulus japonicus* stem and the influence of high temperature pretreatment. *Carbohydrate Polymers*, 164, 284–293.

Kargarzadeh, H., Ahmad, I., Abdullah, I., Dufresne, A., Zainudin, S. Y., & Sheltami, R. M. (2012). Effects of hydrolysis conditions on the morphology, crystallinity, and thermal stability of cellulose nanocrystals extracted from kenaf bast fibers. *Cellulose*, 19, 855–866.

Kengkhetkit, N., & Amornsakchai, T. (2014). A new approach to “Greening” plastic composites using pineapple leaf waste for performance and cost effectiveness. *Journal of materials & design*, 55, 292–299.

Kunaver Matjaz, A. A., & Ema, Z. (2016). The fast and effective isolation of nanocellulose from selected cellulosic feedstocks. *Carbohydrate Polymers*, 148, 251–258.

Lu, P., & Hsieh, Y. (2012). Cellulose isolation and core – shell nanostructures of cellulose nanocrystals from chardonnay grape skins. *Carbohydrate Polymers*, 87, 2546–2553.

Lu, P., & Hsieh, Y. Lo. (2010). Preparation and properties of cellulose nanocrystals: Rods, spheres, and network. *Carbohydrate Polymers*, 82, 329–336.

Mandal, A., & Chakrabarty, D. (2011). Isolation of nanocellulose from waste sugarcane bagasse (SCB) and its characterization. *Carbohydrate Polymers*, 86, 1291–1299.

Mariano, M., Cercená, R., & Soldi, V. (2016). Thermal characterization of cellulose nanocrystals isolated from sisal fibers using acid hydrolysis. *Industrial Crops and Products*, 94, 454–462.

Martins, D. F., Souza, A. B. De, Henrique, M. A., Silvério, H. A., Pires, W., Neto, F., & Pasquini, D. (2015). The influence of the cellulose hydrolysis process on the structure of cellulose nanocrystals extracted from capim mombaca (*Panicum maximum*). *Industrial Crops & Products*, 65, 496–505.

Meng, F., Wang, G., Du, X., Wang, Z., Xu, S., & Zhang, Y. (2018). Preparation and characterization of cellulose nanofibers and nanocrystals from liquefied banana pseudo-stem residue. *Composites Part B*.

Milanez, M., Dias, Á., Cristina, K., Carvalho, C. De, Jacobus, H., Voorwald, C., Ciof, H. (2019). International Journal of Biological Macromolecules Obtainment and characterization of nanocellulose from an unwoven industrial textile cotton waste: Effect of acid hydrolysis conditions, 126, 496–506.

Moreira, F. K. V. (2010). Desenvolvimento de Nanocompósitos Poliméricos Biodegradáveis a partir de Pectina, Amido, e Nanofibras de Celulose. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de São Carlos.

Moriana, R., Vilaplana, F., & Ek, M. (2016). Cellulose Nanocrystals from Forest Residues as Reinforcing Agents for Composites: A Study from Macro- to Nano-Dimensions. *Carbohydrate Polymers*, 139, 139–149.

Naduparambath, S., Jinitha, T. V, Shaniba, V., Sreejith, M. P., & Balan, A. K. (2018). Isolation and characterisation of cellulose nanocrystals from sago seed shells. *Carbohydrate Polymers*, 180, 13–20.

Ng, H. M., Sin, L. T., Tee, T. T., Bee, S. T., Hui, D., Low, C. Y., & Rahmat, A. R. (2015). Extraction of cellulose nanocrystals from plant sources for application as reinforcing agent in polymers. *Composites Part B: Engineering*, 75, 176–200

Nopparut, A., & Amornsakchai, T. (2016). Influence of pineapple leaf fiber and its surface treatment on molecular orientation in , and mechanical properties of , injection molded nylon composites. *Polymer Testing*, 52, 141–149.

Ogundare, S. A., Moodley, V., & Zyl, W. E. Van. (2017). Nanocrystalline cellulose isolated from discarded cigarette filters. *Carbohydrate Polymers*, 175, 273–281.

Paulo, J., Morais, S., Freitas, M. De, De, M., Souza, M. De, Dias, L., Ribeiro, A. (2013). Extraction and characterization of nanocellulose structures from raw cotton linter. *Carbohydrate Polymers*, 91, 229–235.

Peng, Y., & Gardner, D. J. (2013). Influence of drying method on the material properties of nanocellulose I: thermostability and crystallinity. *Cellulose*.

Pola, C. C. Nanocompósitos biodegradáveis à base de amido de milho e poli (vinil álcool) como novos materiais para. embalagens ativas antimicrobianas. (2017) Tese de Doutorado. Universidade Federal de Viçosa.

Prado, K. S., & Spinacé, M. A. S. (2019). International Journal of Biological Macromolecules Isolation and characterization of cellulose nanocrystals from pineapple crown waste and their potential uses. *International Journal of Biological Macromolecules*, 122, 410–416.

- Reddy, M. M., Vivekanandhan, S., Misra, M., Bhatia, S. K., & Mohanty, A. K. (2013). Progress in Polymer Science Biobased plastics and bionanocomposites: Current status and future opportunities. *Progress in Polymer Science*, 38, 1653–1689.
- Reid, M. S., Villalobos, M., & Cranston, E. D. (2016). Benchmarking Cellulose Nanocrystals: From the Laboratory to Industrial Production. *Langmuir*, 1-56.
- Roman, M., & Winter, W. T. (2004). Effect of sulphate groups from sulphuric acid hydrolysis on the thermal degradation behaviour of bacterial cellulose. *Biomacromolecules*, 5, 1671–1677.
- Rosa, M. F., Medeiros, E. S., Malmonge, J. A., Gregorski, K. S., Wood, D. F., Mattoso, L. H. C., Imam, S. H. (2010). Cellulose nanowhiskers from coconut husk fibers: Effect of preparation conditions on their thermal and morphological behavior. *Carbohydrate Polymers*, 81, 83–92.
- Santos, R. M. dos, Flauzino Neto, W. P., Silvério, H. A., Martins, D. F., Dantas, N. O., & Pasquini, D. (2013). Cellulose nanocrystals from pineapple leaf, a new approach for the reuse of this agro-waste. *Industrial Crops and Products*, 50, 707–714.
- Segal, L. C., Creely, J., Martin, A. E. J., & Conrad, C. M. (1959). An empirical method for estimating the degree of crystallinity of native cellulose using the X-ray diffractometer. *Textile Research Journal*, 29, 786–794.
- Sena, A. R., Araujo, M. A. M., Barboza, R. M. P., Fonseca, A. S., Tonoli, G. H. D., Souza, F. V. D., Marconcini, J. M. (2015). Comparative study of 12 pineapple leaf fiber varieties for use as mechanical reinforcement in polymer composites. *Industrial Crops & Products*, 64, 68–78.
- Sena, A. R., Araujo, M. A. M., Souza, F. V. D., Mattoso, L. H. C., & Marconcini, J. M. (2013). Characterization and comparative evaluation of thermal, structural, chemical, mechanical and morphological properties of six pineapple leaf fiber varieties for use in composites. *Industrial Crops & Products*, 43, 529–537.
- Siqueira, G., Bras, J., & Dufresne, A. (2010). Cellulosic bionanocomposites: A review of preparation, properties and applications. *Polymers*, 2, 728–765.
- Smyth, M., García, A., Rader, C., Foster, E. J., & Bras, J. (2017). Industrial Crops & Products Extraction and process analysis of high aspect ratio cellulose nanocrystals from corn (*Zea mays*) agricultural residue. *Industrial Crops & Products*, 108, 257–266.
- Tang, J., Sisler, J., Grishkewich, N., & Tam, K. C. *Journal of Colloid and Interface Science* Functionalization of cellulose nanocrystals for advanced applications. *Journal of Colloid And Interface Science*, 494, 397–409.
- Tran, A. Van. (2006). Chemical analysis and pulping study of pineapple crown leaves. *Industrial Crops and Products*, 24, 66–74.

Wang, N., Ding, E., & Cheng, R. (2007). Thermal degradation behaviors of spherical cellulose nanocrystals with sulfate groups. *Polymer*, 48, 3486–3493.

Wang, Z., Yao, Z., Zhou, J., He, M., Jiang, Q., Li, S., & Ma, Y. (2018). International Journal of Biological Macromolecules Isolation and characterization of cellulose nanocrystals from pueraria root residue. *International Journal of Biological Macromolecules*.

Xing, L., Gu, J., Zhang, W., Tu, D., & Hu, C. (2018). Cellulose I and II nanocrystals produced by sulfuric acid hydrolysis of Tetra pak cellulose I. *Carbohydrate Polymers*, 192, 184–192.

Zhou, Y. M., Fu, S. Y., Zheng, L. M., & Zhan, H. Y. (2012). Effect of nanocellulose isolation techniques on the formation of reinforced poly (vinyl alcohol) nanocomposite films, 6, 794–804.

ARTIGO 2

PRODUÇÃO DE NANOCRISTAIS DE CELULOSE HIDROFÓBICOS DISPERSÁVEIS EM ACETONA

RESUMO

Os nanocristais de celulose (NCCs) são um material em tamanho nano, renovável e biodegradável, que têm capacidade de reforço em polímeros. Entretanto, sua alta polaridade limita sua aplicação em polímeros hidrofóbicos. Dessa forma, a modificação de superfície desse material torna-se atrativa por ampliar sua potencialidade de uso. Neste trabalho, NCCs foram isolados de fibras de pinus e tiveram sua superfície modificada utilizando o surfactante catiônico hexadeciltrimetilamônio (CTAB). O principal objetivo foi modificar os NCCs, inicialmente hidrofílicos, tornando-os capazes de dispersarem em solvente acetona após a funcionalização. De acordo com os resultados, foi possível extrair os NCCs das fibras de pinus, com comprimento e dimensões em tamanho nano e com estabilidade em água. Os resultados de FTIR, EDS e potencial zeta indicaram que houve a adsorção das moléculas do CTAB na superfície dos NCCs, mantendo-se a estrutura cristalina e a estabilidade térmica. Foi observado que a modificação com CTAB tornaram-os capazes de se dispersarem em solvente acetona, enquanto os não modificados não dispersaram. Este trabalho demonstrou que o CTAB é uma alternativa para a modificação de superfície de NCCs, pois não alterou suas características, apresentando potencial para serem aplicados como agente de reforço na produção de polímeros que utilizam a acetona como meio para solubilização.

Palavras-chave: Nanocristais de celulose. Brometo de hexadeciltrimetilamônio, Hidrofílico. Hidrofóbico. Modificação de superfície.

1. Introdução

Nos últimos anos, vários materiais têm sido pesquisados promover a melhoria das propriedades dos polímeros biodegradáveis como alternativa para o uso de polímeros tradicionais obtidos de recurso fóssil (Abdul Khalil et al., 2016; Ferreira et al., 2018). Dentre eles, os nanocristais de celulose destacam-se devido a sua capacidade de reforço em polímeros (Kassab, Ben youcef, Hannache, e El Achaby, 2019), que poderão ser utilizados em várias áreas da ciência (Grishkewich, Mohammed, Tang, & Tam, 2017; Tang, Sisler, Grishkewich, & Tam, 2017; Shankaran, 2018; Fang, Hou, Chen, & Hu, 2019).

Nanocristais de celulose são estruturas cristalinas compactas que podem ser isolados a partir de fontes vegetais, de bactérias e de animais. Apresentam dimensões que podem variar entre 5 e 25 nm de diâmetro e entre 100 e 500 nm de comprimento e exibem formato de hastes ou de filamentos alongados emaranhados (BAST, 2009; NG et al., 2015).

O interesse pelo uso dos NCCs se dá por sua ampla disponibilidade, baixa toxicidade e biodegradabilidade (Ng et al., 2015). Além disso, apresentam características que os conferem propriedades de reforço em polímeros, como a sua estrutura cristalina (68-94%), seus grupos hidroxilas abundantes, sua baixa densidade (1,58–1,59 g·cm⁻³), sua grande área superficial específica (estimado em maior que 100 m²·g⁻¹), sua alta razão de aspecto (comprimento/diâmetro), seu alto módulo de Young (130-250 GPa) e sua alta resistência mecânica (cerca de 7,5 GPa) (Lu; Hsieh, 2010; Savadekar; Mhaske, 2012; Leite, 2015; Moriana; Vilaplana; Ek, 2016; Ng et al., 2015; Cudjoe et al., 2017). A capacidade dos NCCs em promover melhorias nas propriedades mecânicas e de barreiras de polímeros vêm sendo demonstrada (Lu; Hsieh, 2010; Ng et al., 2015; Moriana; Vilaplana; ek, 2016; Abdul khalil et al., 2016; Oksman et al., 2016; Cudjoe et al., 2017).

Apesar disso, o uso dos NCCs ainda é limitado a polímeros hidrofílicos, uma vez que apresentam alta polaridade, o que dificulta sua interação interfacial e dispensabilidade com vários polímeros hidrofóbicos (Kaboarani & Riedl, 2015). Dessa forma, para ampliar suas possibilidades de aplicações, modificações na superfície dos NCCs podem ser realizadas, visto que os NCCs possuem grupos hidroxilas e uma elevada área superficial em relação ao volume, e por esse motivo

são compostos reativos e que permite a alteração da sua polaridade (Ly e Mekonnen, 2019).

Várias abordagens foram desenvolvidas para funcionalizar a superfície e melhorar a dispersão dos NCCs em matrizes polimérica hidrofóbicas, tais como: modificações químicas; modificações físicas e modificação bacteriana (Kuo; yan; Sain, 2013; Ng et al., 2015).

A modificação física, não covalente, por meio do uso de surfactantes têm sido preferida em relação à química (Kaboarani; riedl, 2015; Oksman et al., 2016; Tardy et al., 2017), que é mais demorada e muitas vezes utiliza solventes tóxicos, com impacto negativo no meio ambiente (Kaboarani & Riedl, 2015). Além disso, o uso de surfactantes para funcionalização de superfície indicam que a modificação altera apenas a superfície do cristal, preservando sua morfologia original e mantendo a sua integridade e resistência, características importantes para sua propriedade de reforço e barreira em polímeros (Ly & Mekonnen, 2019). Essa transformação consiste em adsorver surfactantes nas superfícies dos NCCs, estabilizando-os em meios orgânicos não polares e reduzindo a sua energia de superfície (Islam, Alam, e Zoccola, 2013).

Agentes tensoativos são eficazes em melhorar a dispersão de NCC em solventes apolares. Tensoativos como mono e di-ésteres de ácido fosfórico (Ljungberg et al., 2005), sais de quaternário de amônio (Salajkova et al., 2012), brometo de didecildimetilamônio (DMAB) e brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) (Hu, Ballinger, Pelton, & Cranston, 2015; Kaboarani e Riedl, 2015) têm sido estudados. O emprego destes surfactantes pode aumentar o potencial de aplicação dos NCCs para uso em polímeros hidrofóbicos, bem como evitar a agregação dos NCCs durante a etapa de secagem após a sua extração da celulose. No entanto, nenhum desses estudos mostraram a relação entre a carga superficial dos NCCs após modificação do surfactante e sua hidrofobicidade, nem sua dispersão em solvente acetona, principal meio de solubilização do polímero acetato de celulose, para produção de filme biodegradável.

Nesse contexto, objetivou-se com este estudo produzir NCCs isolados a partir de fibra de pinus e modificados com surfactante CTAB, de forma a diminuir sua hidrofobicidade e permitir sua dispersão em solvente acetona.

2. Materiais e métodos

2.1. Materiais

Para este estudo polpas de celulose obtidas a partir de pinus foram fornecidas pela indústria de papel e celulose Klabin (São Paulo, Brasil); e seguintes materiais foram utilizados: brometo de hexadeciltrimetilamônio (CTAB) (99% de pureza, Sigma-Aldrich, EUA); hidróxido de sódio (Vetec Química Fina Ltda, P.A., Brasil); ácido sulfúrico (Vetec Química Fina Ltda, P.A, Brasil); membrana de celulose (76 mm) (D9402-100FT, Sigma-Aldrich, E.U.A);

2.2. Pré-tratamento da polpa de pinus

Polpa de celulose de pinus (PP) foi previamente hidratada em 500 mL de água destilada por 24 h sob refrigeração (7-10 °C) (Ethiktechnology, 20 modelo 400/*ND 200, Brasil). Após esse período, foi adicionado à polpa hidratada NaOH concentrado a 50% (m/v) até obter concentração de NaOH final de 4% (m/v), foi utilizado a proporção de 1:20 de polpa para NaOH. A mistura foi aquecida a 60 °C por 2 horas sob agitação mecânica (Fisatom, modelo 725A, Brasil) conforme reportado por Santos et al. (2013). Em seguida, foi lavada com água destilada até pH neutro (7-7,5), e seca por 12 horas a 50 °C em estufa.

2.3. Isolamento de nanocristais de celulose

Os nanocristais foram isolados da polpa de celulose pré-tratada, utilizando 20 mL de ácido sulfúrico a 60% para cada grama de fibra e mantidos sob agitação por 90 min. A reação foi paralisada com água gelada (5 a 8 °C), utilizando o mesmo volume da hidrólise ácida. A mistura foi centrifugada (Beckman Coulter, modelo J2MC) a 8500 g por 10 min a 20 °C por 4 vezes até a suspensão dos NCCs em pH 2. Em seguida, o pH da dispersão de NCCs foi ajustado com NaOH até atingir pH 7. Posteriormente, ela foi dialisada com membranas de diálise por 5 dias. A suspensão dos NCCs foi submetida à agitação ultrassônica (desruptor de células digital, QR500, ECO-SONICS, Brasil) a 400 W com frequência de 60 KHz por 10 min em banho de gelo, e, então, armazenada a 4 °C. Os nanocristais foram secos por processo de liofilização (FreeZone 2.5 benchtop, Labconco, Canadá) por três dias.

2.4. Modificação de superfície de NCC por adsorção de surfactantes

Após o isolamento do NCC, foi realizada a modificação de superfície com surfactante catiônico, brometo de hexadeciltrimetilamônio (CTAB) (kaboorani e Riedi., 2015). Foram redispersos 0,5 g de NCCs em 400 mL de água ultra pura com auxílio de ultrassom de ponta (desruptor de células digital, QR500, ECO-SONICS, Brasil) a 400 W por 20 min em banho de gelo. Em seguida foram adicionados diferentes quantidades de CTAB, (0,05, 0,1, 0,250, 0,4, 0,5 g), previamente solubilizadas em 100 mL de água a 60 °C, à dispersão de NCCs, permanecendo sob agitação por 2 horas. Passado o tempo, a dispersão foi centrifugada a 8500 g durante 10 minutos por 3 vezes. Ao final da centrifugação, as dispersões dos NCCs modificados foram dialisadas com membranas por 3 dias. As amostras foram mantidas em um ultrafreezer a -80 °C por 24 horas e depois secas por liofilização (FreeZone 2.5 benchtop, Labconco, Canadá) por 2 dias.

2.5. Avaliação da dispersão dos nanocristais de celulose

A dispersão dos NCCs e dos nanocristais modificados (NCCM) foram avaliados em água ultrapura e em acetona. Para a dispersão em acetona, realizou-se a troca do solvente, de água para acetona, após a última centrifugação (3° centrifugação). As amostras foram dispersas no solvente utilizando o ultrassom (Unique Group, Indaiatuba, SP, Brasil) a 400 W por 20 min sob banho de gelo. A dispersão dos NCCs foi avaliada em função do tamanho, carga superficial (Zetasizer), morfologia (Microscopia de força atômica) e transmitância (Espectrofotômetro).

2.6. Caracterização dos nanocristais de celulose

2.6.1. Distribuição de tamanho da partícula e medidas de potencial zeta (ζ)

As análises de distribuição de tamanho e medida do potencial elétrico superficial foram realizadas com auxílio de Zetasizer NanoZS (NanoZS, Malvern, UK) em triplicata. A amostra foi dispersa na concentração de 2 mg·mL⁻¹ e as leituras foram realizadas utilizando temperatura de 25 ± 2 °C.

2.6.2. Avaliação do ângulo de contato

As medições dos ângulos de contato (AC) dos NCCMs foram realizadas usando o equipamento Goniômetro (Kruss®, Alemanha), conforme método utilizado

por Dhar et al. (2016). Os NCCMs liofilizados foram prensados (20 MPA por 2 min) dentro de uma prensa de KBr, e então foram secos a 50 °C por 6 horas em estufa. Para medir o ângulo de contato uma gota de água foi colocada sobre os grânulos de NCCs onde foi mensurado o ângulo de contato por meio de uma câmara CCD a temperatura de 25 ± 2 °C. Foram realizadas três medidas de cada amostra e reportado o valor médio do ângulo de contato com a água.

2.6.3. Avaliação da transmitância

A transmitância das dispersões de NCCMs (0,1% m/v) foi medida em comprimentos de onda de 300 a 700 nm usando espectrofotômetro UV-1800 (Shimadzu, UV-1800 UV-Vis, Japão), (Antti, Visanko, Laitinen, Ämmälä, e Liimatainen, 2016).

2.6.4. Espectroscopia de dispersão de energia por raios-X (EDS)

A estimativa da composição elementar relativa das amostras foi obtida usando um EDS acoplado a um microscópio eletrônico de varredura (modelo JEOL – JSM – 6010LA) operando com voltagem de aceleração de 15 kV.

2.6.5. Microscopia de força atômica (MFA)

As dimensões dos NCCs foram avaliadas por microscopia de força atômica (NT-MDT, modelo NTEGRA PRIMA, Rússia). A suspensão de NCCs (0,1% m/v) foi sonicada a 400 W, por 10 min, em um ultrassom (Unique Group, Indaiatuba, SP, Brasil). As medidas foram feitas no modo de contato intermitente, utilizando sonda com raio de curvatura de 10 nm, constante de força de 10 N/m e frequência de ressonância de aproximadamente 280 kHz.

2.6.6. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As morfologias superficiais dos NCCMs foram avaliadas pela análise de microscopia eletrônica de varredura (Tabletop Microscope, modelo TM3000, Shaumburg, IL, USA), operando com a voltagem de aceleração de 15 KV.

2.6.7. Espectroscopia na região de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros de FTIR dos materiais foram realizados em um espectrômetro FT-IR Nicolet 6700 (Thermo Scientific, EUA) utilizando região de varredura de 4000

cm^{-1} a 400 cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1} e um total de 32 varreduras por amostra (Moriani et al., 2016).

2.6.8. Difração de raios-X (DRX)

A cristalinidade foi obtida utilizando difratômetro (Shimadzu, Kyoto, Japan) com filtro de Ni e radiação Cu- $k\alpha$ ($\lambda = 1,5406 \text{ \AA}$), variação angular de 10 a 40° (2θ), velocidade de $3^\circ \cdot \text{min}^{-1}$, tensão de 40 kV e corrente de 40 mA . O índice de cristalinidade foi determinado pelo Método de Segal (Segal, 1959) conforme equação seguinte:

$$IC = \left[\frac{(I_{002} - I_{am})}{I_{002}} \right] \times 100 \quad \text{Equação 1}$$

Onde, I_{002} é a intensidade máxima de difração do pico principal em $2\theta = 22,5^\circ$, e I_{am} é a intensidade de difração da celulose amorfa em $2\theta = 18,4^\circ$.

2.6.9. Análise termogravimétrica (TGA)

As propriedades térmicas foram obtidas por meio de analisador termogravimétrico (Shimadzu, modelo 60, Japão) com programa de temperatura de 25 a $600 \text{ }^\circ\text{C}$, taxa de aquecimento de $10 \text{ }^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ e fluxo de $50 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, sob atmosfera de nitrogênio.

2.6.10. Análise estatística

O experimento foi realizado seguindo o delineamento inteiramente casualizado (DIC) utilizando três repetições. Os resultados de potencial zeta e ângulo de contato foram avaliados por meio de análise de regressão com 5% de probabilidade em software Minitab (Minitab 17, 2014).

3. Resultados e Discussão

3.1 FTIR

De acordo com os resultados de FTIR, observou-se a presença de bandas de absorção características da celulose tanto para o espectro da fibra de pinus tratada quanto para os espectros dos NCCs isolados, e dos NCCs após modificação superficial. As bandas características da celulose observadas nos espectros de FTIR foram em 3347 cm^{-1} , cuja a banda em formato de sino corresponde à presença

grupos OH, em 2900 cm^{-1} corresponde ao estiramentos simétricos e assimétricos de ligação C-H de grupos CH_3 , CH_2 e CH, em 1054 cm^{-1} devido ao estiramento C-O e em 895 devido à vibração de deformação angular no plano C-H da celulose (Babosa, 2007; Xing, Gu, Zhang, Tu, & Hu, 2018). Em 1640 cm^{-1} também está presente uma banda de absorção em todas as amostras que corresponde à vibração de flexão de OH devido à água adsorvida (Kumar, Negi, Choudhary, & Bhardwaj, 2014). Os NCCs após hidrólise ácida mantiveram as bandas características da celulose, no entanto, houve o aparecimento de um pico em 1205 cm^{-1} , atribuído à presença de grupos S=O nos nanocristais, devido a reações de esterificação após hidrólise ácida (Figura 1B) (Ng et al., 2015).

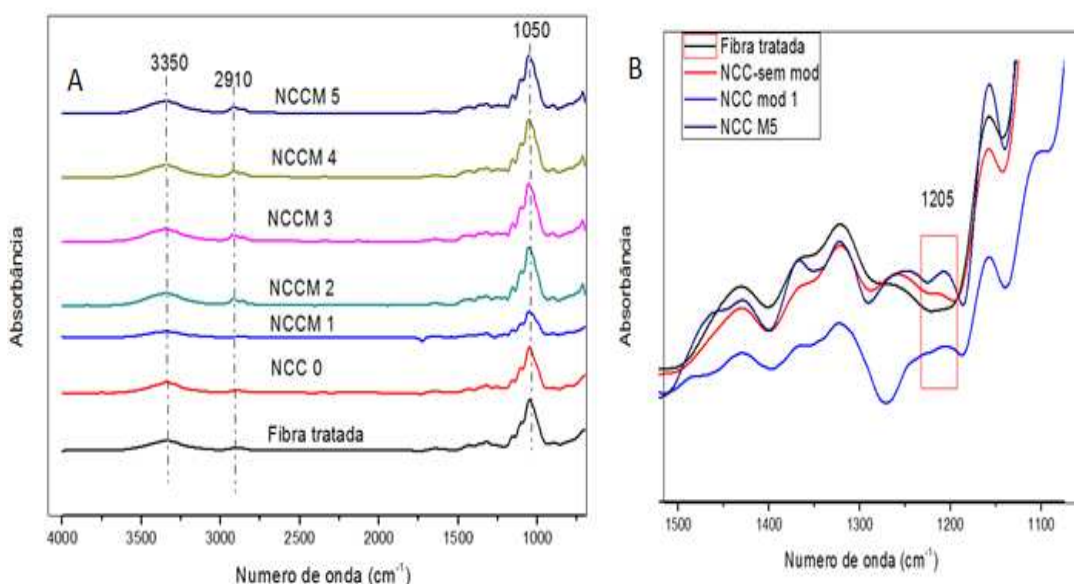


Figura 1. Espectros de absorção obtidos pelo FTIR da fibra de pinus tratada, NCC sem modificação (NCC 0) e nanocristais modificados com CTAB a $0,1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ (NCCM1), $0,2\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ (NCCM2), $0,4\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ (NCCM3), $0,8\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ (NCCM4) e $1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ (NCCM5) (A). Ampliação do pico em 1205 cm^{-1} (B).

3.2. DRX

Os perfis dos difratogramas da fibra de celulose, dos NCCs isolados e dos NCCs modificados apresentam picos de difrações de celulose tipo I e tipo II. O tipo I é caracterizado pelos picos em $2\theta = 15^\circ$ (plano 101), 22° (plano 200) e 34° (plano 004) (Milanez et al., 2019), e o tipo II, além desses, também apresenta pequenos picos de difração em 14° e 20° (Xing, Gu, Zhang, Tu, & Hu, 2018). Isso indica que não houve transformação polimórfica da celulose após o isolamento dos NCC e após modificação superficial (Moreira, 2010; Cudjoe et al., 2017).

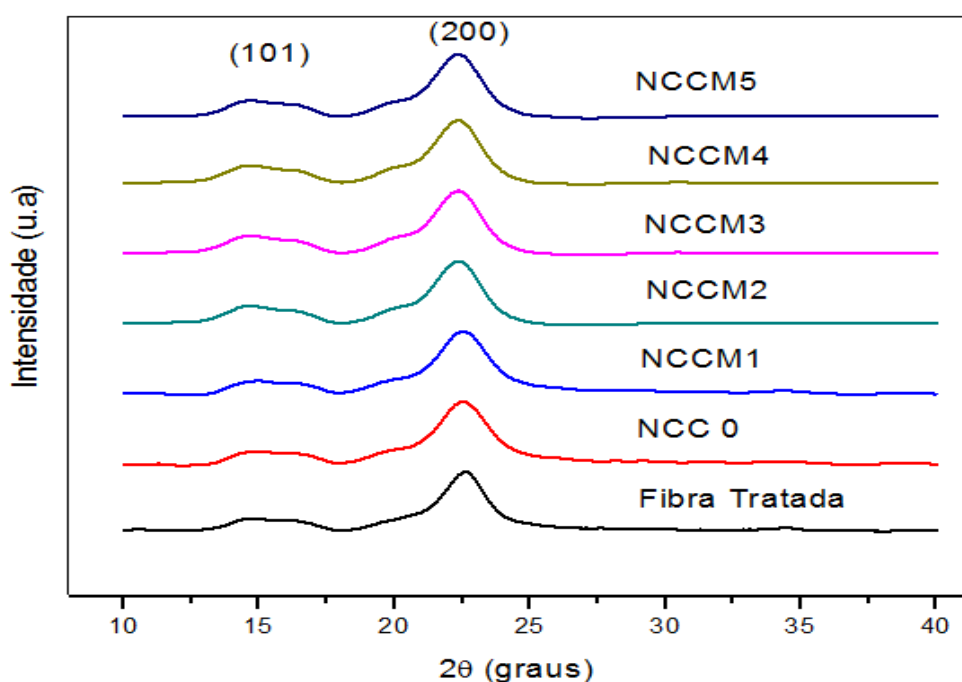


Figura 2. Difratogramas de raios-x da fibra de pinus tratada, NCC sem modificação (NCC 0) e nanocristais modificados com CTAB a $0,1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ (NCCM1), $0,2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ (NCCM2), $0,4 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ (NCCM3), $0,8 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ (NCCM4) e $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ (NCCM5).

As amostras apresentaram IC próximos, cujos valores de $74 \pm 5\%$ para a fibra de pinus tratada, de $76 \pm 7\%$ para o NCC isolado e de 80% para os NCCs após modificação de sua superfície com diferentes concentrações de CTAB (Figura 2). Esses resultados mostraram que tanto a modificação quanto as concentrações de surfactantes utilizadas neste estudo não afetaram a estrutura cristalina dos NCCs, sugerindo que as reações do CTAB com o NCC, ocorreram apenas ao nível de superfície. Outros estudos também apontaram que a modificação superficial dos NCCs com surfactante CTAB não afetou a sua estrutura cristalina (Salajkova et al., 2012; Kaboorani & Riedl, 2015; Ly & Mekonnen, 2019). Preservar intactas essas regiões cristalinas é importante para manter o efeito de reforço dos NCCs para que possam ser utilizados em polímeros hidrofóbicos (Kaboorani & Riedl, 2015).

3.3. TGA

Em todas as amostras foram observadas uma pequena perda inicial de massa, abaixo da temperatura de $100 \text{ }^\circ\text{C}$, referente à evaporação da água adsorvida nas fibras (Figura 3 A e B). A fibra de pinus apresentou dois estágios de

degradação, sendo o primeiro (241 a 250 °C) referente à degradação da cadeia de celulose, onde ocorreram a despolimerização, desidratação e decomposição das unidades glicosídicas da celulose (Araki, Wada, Kuga, & Okano, 1998; Bano & Negi, 2017). A segunda etapa está relacionada com a degradação do resíduo carbonizado, gerando produtos gasosos de baixa massa molecular (Roman & Winter, 2004; Milanez et al., 2019). Esse perfil de degradação indicou que a celulose da fibra de pinus foi isolada dos demais componentes associados a ela, uma vez que na presença desses componentes não celulósicos (lignina, hemicelulose e pectina), as faixas de temperatura de degradação seriam mais baixas, cerca de 240 °C (Jiang et al., 2017). Esses resultados evidenciaram a importância do pré-tratamento da fibra para facilitar o processo de extração dos NCCs por hidrólise ácida, uma vez que fibras tratadas apresentam menos impurezas.

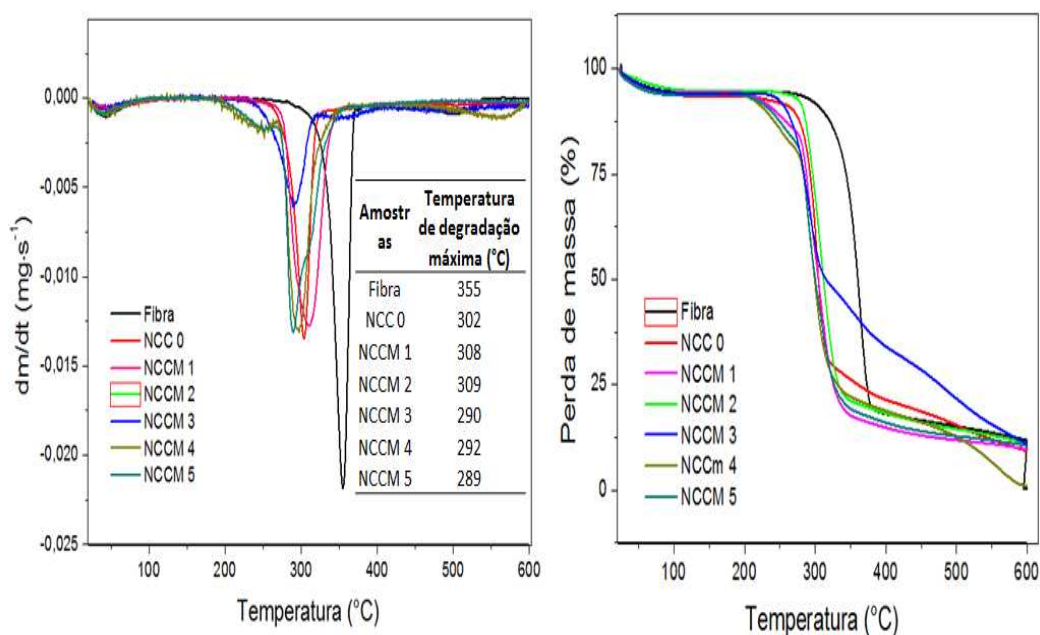


Figura 3. Curvas de DTG (A) e Termogramas (B) da fibra de pinus tratada, NCC sem modificação (NCC 0) e dos nanocristais modificados com CTAB a $0,1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ (NCCM1), $0,2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ (NCCM2), $0,4 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ (NCCM3), $0,8 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ (NCCM4) e $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ (NCCM5).

Os NCCs isolados apresentaram temperaturas de degradação menor que a da fibra previamente tratada (302 °C). Após a hidrólise da celulose com ácido sulfúrico, ocorreu a adsorção de grupos sulfato sobre a superfície da celulose, e

essa sulfonação apresentou um efeito catalítico nas reações de degradação térmica dos NCCs (Roman & Winter, 2004).

O perfil de degradação e a temperatura máxima de degradação dos NCCs modificados com concentrações menores de CTAB (NCCM1 e NCCM2,) foram similares ao do NCC sem modificação (Figura 3 A e B). No entanto, os NCCM3, NCCM4 e NCCM5 (0,4, 0,8 e 1 mg·mL⁻¹, respectivamente), também, mostraram uma pequena degradação entre 215 e 265 °C, além do pico de degradação em torno de 270 a 350 °C, que está relacionada com a degradação das cadeias de surfactante nas amostras, uma vez que o CTAB tem temperaturas de degradação em torno de 249,9 °C (Chaudhary, Rohilla, & Mehta, 2014.). O mesmo foi relatado por Ly & Mekonnen. 2019, que verificaram a presença desse tipo de pico na de 230 a 270 °C, característico da presença do surfactante CTAB no NCC.

Os NCCs modificados com o CTAB foram levemente afetados pela adsorção das cadeias de alcanos em sua superfície, o que os mantém estáveis termicamente para o uso em polímeros hidrofóbicos e também para processamento de materiais termoplásticos que possuem temperaturas de produção acima de 200 °C.

3.4. Potencial zeta

O potencial zeta dos NCCs isolados da fibra de pinus foi de $-40,6 \pm 1,3$ mV, a carga negativa dos NCCs foi atribuída aos grupamentos sulfônicos que foram introduzidos na superfície dos mesmos após hidrólise ácida das fibras de celulose (Kargarzadeh et al., 2012; Ferreira, Mariano, et al., 2018). A sulfonação das hidroxilas, confere aos NCCs uma boa dispersão em solução aquosa devido à repulsão eletrostática entre as cargas negativas, evitando aglomerações.

Foi possível ajustar um modelo de regressão (Figura 4) que explica a influência da adição de surfactante, CTAB, em concentrações crescentes, na carga superficial dos NCCs. Observou-se que, à medida que aumentava a concentração de surfactante na dispersão aquosa de NCCs, eles tornaram-se menos carregados negativamente, ocorrendo uma inversão de cargas, quando concentrações de CTAB acima de 0,32 mg·mL⁻¹ (ponto isoelétrico estimado pela equação de regressão) foram adicionadas. A modificação da carga superficial ocorreu devido à adsorção da cadeia de alcanos presente no CTAB, em sua superfície (N. Dhar et al., 2012; Ly & Mekonnen, 2019). A redução da carga superficial diminuiu a repulsão eletrostática entre os NCCs, ocasionando a aglomeração dos NCCs em água. Tal fato evidencia

que os NCCs diminuam sua hidrofiliçidade devido a regiões de alcanos presentes em sua superfície.

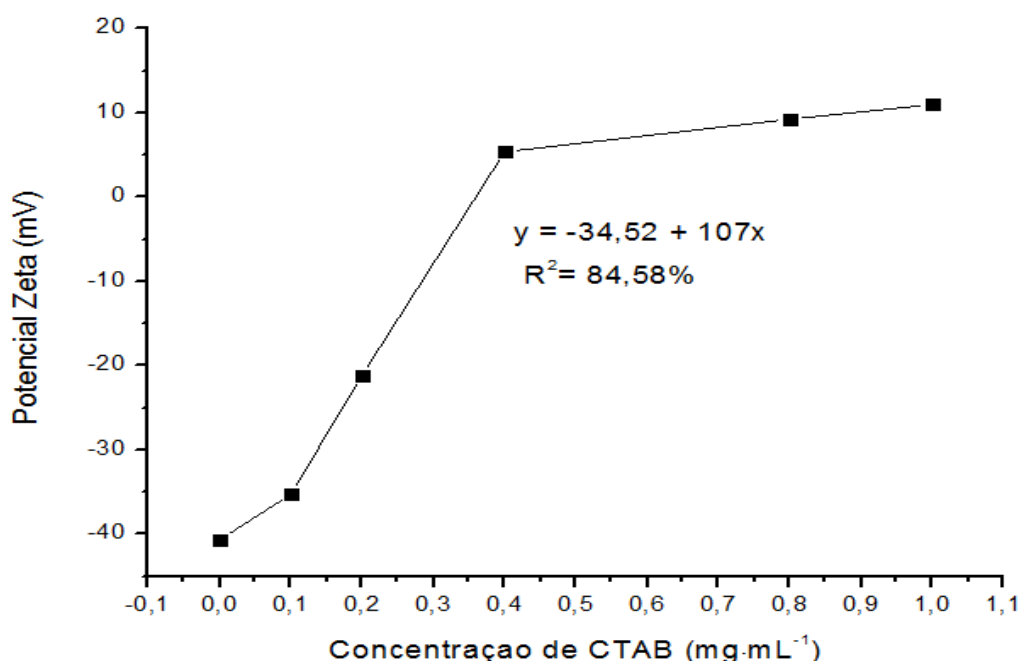


Figura 4. Potencial Zeta dos NCCs após modificação de superfície em função da concentração de CTAB, ajustado pela análise de regressão.

Até a concentração de $0,32 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ (ponto de carga zero), estimada pela equação ajustada (Figura 4), os NCCs ainda apresentaram cargas negativas, indicando que as moléculas de CTAB foram adsorvidas na superfície dos NCCs, não cobrindo completamente toda a superfície. Já nas concentrações acima do ponto de carga zero, ocorreu a formação de micelas de CTAB, que saturaram a superfície dos NCCs e induziram a agregação de duas ou mais hastes de NCCs, produzindo valores de potencial zeta positivos devido aos grupamentos amino do CTAB (Hasani, Cranston, Westman, & Gray, 2008; Beaupré, 2012; N. Dhar et al., 2012; Prathapan, Thapa, Garnier, & Tabor, 2016; Ly & Mekonnen, 2019).

A modificação da polaridade dos NCCs de hidrofílicos para hidrofóbicos pôde ser comprovada pela análise do potencial zeta, que corrobora com a análise de FTIR dos NCCMs, em que bandas de absorção da região dos alcanos foram identificadas. Além disso, a análise de EDS, discutida mais adiante, confirmará o aparecimento do elemento N, proveniente da adsorção das moléculas do surfactante, reforçando os dados de potencial zeta.

3.5. Ângulo de contato

A influência do aumento da concentração de CTAB adicionado à dispersão de NCC sobre o ângulo de contato (AC) dos NCCs modificados com a água pode ser observada na tabela 1.

Tabela 1: Valores de ângulo de contato ($^{\circ}$), potencial zeta (mV), distribuição de tamanho (nm) e índice de polidispersão dos NCC sem modificação (0) e NCCMs modificados com diferentes concentrações de CTAB.

Análises	Concentração de CTAB ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)					
	0	0,1	0,2	0,4	0,8	1
Ângulo de contato	24,1 \pm 3,8	59,6 \pm 1,2	71,3 \pm 8,4	42,9 \pm 7,4	39,8 \pm 1,48	39,6 \pm 6,5
**Potencial zeta(água)	-42,9 \pm 1,3	-35,3 \pm 1,2	-21,1 \pm 3,1	+5,4 \pm 0,5	+9,25 \pm 2,1	+11,0 \pm 1,4
Distribuição de Tamanho em água	164,4 \pm 63,35	*				
Índice de polidispersão (água)	0,386 \pm 0,04	**				
**Distribuição de Tamanho em acetona	*	499,0 \pm 128	435,9 \pm 48,8	472 \pm 155	521 \pm 138	557,6 \pm 185
Índice de polidispersão	*	0,60 \pm 0,03	0,7 \pm 0,24	0,55 \pm 0,66	0,74 \pm 0,21	0,52 \pm 0,11

*Resultados fora da capacidade de detecção do equipamento, referente a partículas aglomeradas.

** Os Resultados foram submetidos a análise de regressão com 5% de probabilidade.

O maior ângulo de contato com a água foi observado para os NCCs modificados com CTAB em concentração de 0,2 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. No entanto, apesar dos valores dos ACs terem diminuído, ainda continuaram superiores ao valor do AC dos NCCs sem modificação. O aumento do AC dos NCCMs pode ser atribuído à presença das cadeias alquílicas na superfície dos NCCs provenientes do surfactante CTAB após modificação. Estas cadeias são capazes de orientar suas regiões hidrofóbicas ao redor da superfície dos NCCs, diminuindo sua hidrofiliidade (N. Dhar et al., 2012) (Tabela 1).

O maior ângulo de contato ($71,3^{\circ}$) foi obtido quando concentrações de 0,2 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ foram utilizados para a modificação superficial de NCCs, sugerindo uma menor hidrofiliidade. Com a adição de 0,4 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ de CTAB, o ponto isoelétrico foi atingido, onde ocorreu a completa adsorção das cadeias de surfactantes na superfície dos NCCs, conforme observado na análise de potencial zeta. Assim, após a concentração crítica micelar do CTAB ser atingida, iniciou-se a formação de micelas de surfactantes na dispersão que se ligam cooperativamente, levando a

reversão da carga superficial devido aos grupamentos amino do CTAB, ocorrendo um aumento da hidrofiliabilidade da superfície dos NCCs (N. Dhar et al., 2012; Ly 2019). As cadeias de alcanos dos surfactantes ficaram orientadas para dentro, formando as micelas, e suas regiões polares orientadas para fora, fazendo com que haja uma diminuição do AC dos NCCMs (N. Dhar et al., 2012). Salajkova et al., 2012 e Ly & Mekonnen, 2019, também verificaram que a modificação dos NCCs com surfactantes CTAB promoveram o aumento do ângulo de contato com a água de 12° para 48° para o primeiro, e de 25, 5°C para 56,6°, para o segundo. No entanto, não estudaram a influência da concentração de surfactante na medida do ângulo de contato, como foi mostrado neste estudo. Assim, é possível, a partir do AC, selecionar qual concentração utilizar para favorecer uma menor hidrofiliabilidade e maior dispersão para cada tipo de solvente.

3.6. Espectroscopia de dispersão de energia por raios-X (EDS) dos NCCMs

A análise de EDS confirmou a presença de enxofre (S) na superfície dos NCCs após hidrólise ácida o que promoveu a sulfonação das hidroxilas, melhorando a estabilização da dispersão dos NCCs (Figura 5) (Kargarzadeh et al., 2012; Smyth et al., 2017; Ferreira, Mariano, et al., 2018) conforme discutido na análise da avaliação da dispersão dos NCCs e do potencial zeta.

Após a etapa de modificação superficial dos NCCs, foi identificado a presença do elemento nitrogênio (N) na composição dos NCCs, confirmando a adsorção das moléculas de surfactantes, na sua superfície (Figura 5). O N é proveniente da cadeia do grupamento amino ligado à cadeia de alcano do CTAB, que foi utilizado para modificação do NCC. Observou-se que a quantidade de nitrogênio foi proporcional ao aumento da concentração de CTAB, concordando com os dados de potencial zeta, em que concentrações diferentes de surfactante influenciaram na alteração da carga superficial do NCC.

Após a modificação, não foi detectada a presença de Na no NCCMs, mostrando que a funcionalização promoveu a remoção do Na da sua superfície, devido ao ataque seletivo do CTAB às ligações iônicas entre os grupamentos SO_2 e o Na presentes na superfície, substituindo o Na pela cadeia de grupamentos aminos ligados à cadeia de alcanos (Kaboarani & Riedl, 2015).

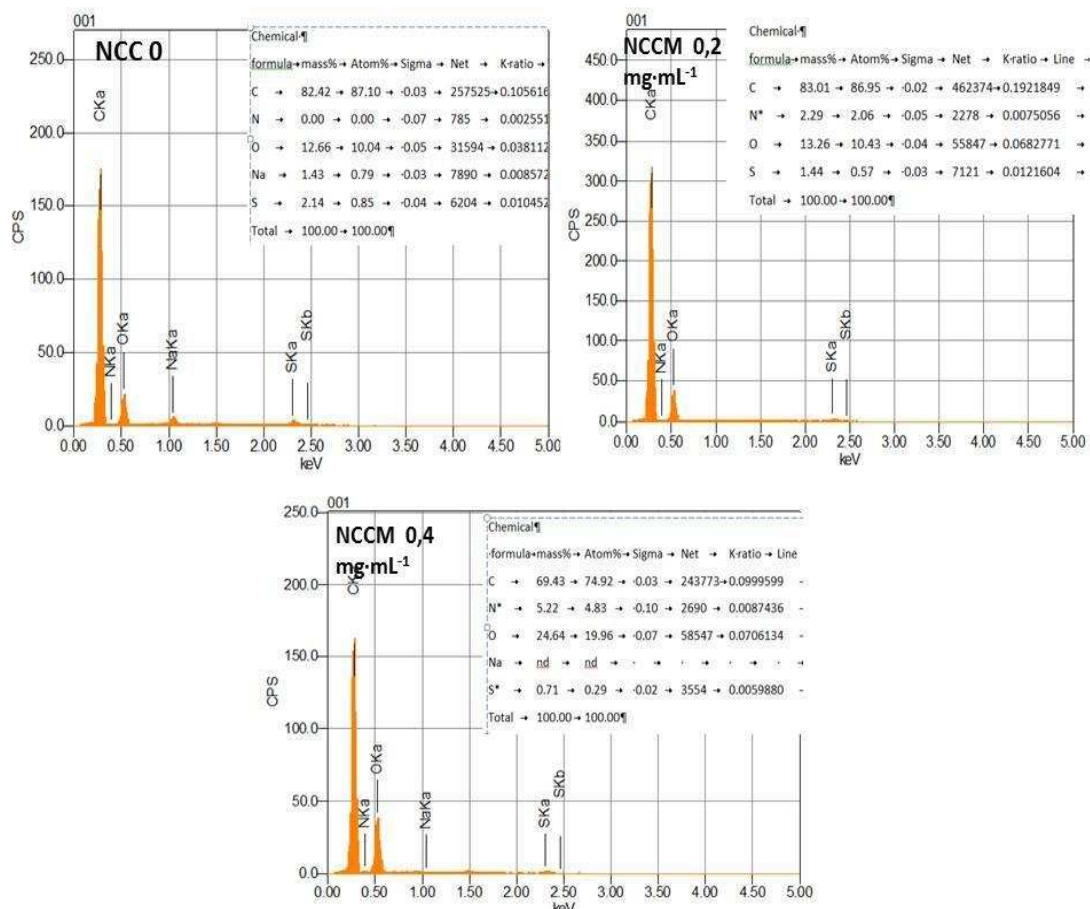


Figura 5. Gráficos de EDS com a tabela da composição estimada para o NCC sem modificação (NCC 0) e NCCM com 0,2 e 0,4 mg·mL⁻¹ de CTAB.

Estudos realizados por Kaboorani & Riedl (2015) e Ly & Mekonnen (2019) também evidenciaram a presença do elemento N após modificação do NCC com esse mesmo surfactante catiônico, e também, constataram que a concentração do mesmo aumentou a quantidade de N na composição dos NCCs.

A identificação por EDS está em conformidade com os resultados evidenciado pelo FTIR e potencial zeta, confirmando a modificação dos NCCs com CTAB.

3.7. Avaliação da dispersão

A Figura 6 mostra que os NCCs isolados da fibra de pinus tratada apresentaram dispersão estável em água, que pode ser explicado pela presença dos grupamentos sulfatos que conferiram aos NCCs carga superficial negativa (potencial zeta), conforme já discutido, resultando na repulsão eletrostática entre eles. De maneira contrária, os NCCs que foram modificados precipitaram completamente, sendo possível visualizar os aglomerados formados. Nos NCCs que foram modificados com concentrações de 0,1 e 0,2 mg·mL⁻¹ de CTAB, ocorreu a sua

agregação em dispersão aquosa (2, 3), porém não houve a separação de fases, como evidenciados nas imagens 4, 5 e 6 (Figura 6 A), esse comportamento está relacionado com a quantidade de surfactante que foi adsorvido na superfície dos NCCs. Em concentrações de CTAB de $0,2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, o valor do potencial zeta foi de -21 mV , onde a superfície do NCC não foi completamente coberta pelo surfactante mantendo os NCCMs ainda em suspensão sem ocorrer a separação de fases (Figura 6 A3). Já nos NCCMs com concentrações de CTAB igual ou maior que $0,4 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, foi verificado que as cargas superficiais foram positivas provenientes da formação de micelas de surfactantes ligados aos NCCs, promovendo a separação de fases (Tabela 1, Figura 6 A4).

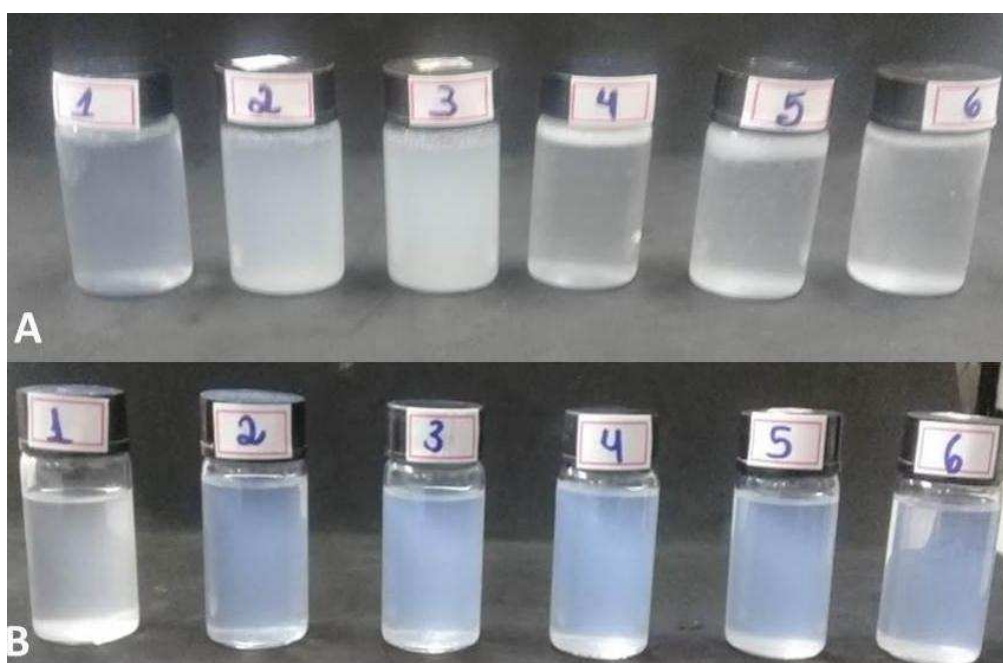


Figura 6. Imagem da dispersão dos NCC e NCCM em água (A) e em acetona (B). NCC sem modificação (1) e nanocristais modificados com CTAB a $0,1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ (2), $0,2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ (3), $0,4 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ (4), $0,8 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ (5) e $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ (6) após 30 min de repouso.

A dispersão dos NCCs e NCCMs em acetona, também foi estudada. Foi possível identificar que os NCCs não modificados não dispersaram em acetona (Figura 6 B1), fato já esperado, uma vez que apresentavam alta hidrofiliicidade. Antagonicamente, em acetona identificou-se que foi possível dispersar os NCCs modificados utilizando diferentes concentrações de CTAB (Figura 6 B2-6).

Kaboorani & Riedl (2015) e Ly & Mekonnen (2019) conseguiram produzir NCCs modificados com esse mesmo surfactante e dispersá-lo em tetrahidrofurano

(THF), e concluíram que a concentração de CTAB teve forte efeito na dispersão dos NCCs. Salajkova et al. (2012) modificaram NCCs com sais de quartenário de amônio e também obtiveram sucesso na dispersão dos nanocristais em clorofórmio e em tolueno. Já o presente trabalho demonstrou que foi possível dispersar NCCs em acetona utilizando CTAB, feito ainda não evidenciado na literatura. Dessa forma, esse estudo aumenta a possibilidade de aplicação dos NCCs em materiais hidrofóbicos, com o emprego do solvente acetona como meio de dispersão dos NCCs.

3.8. Transmitância

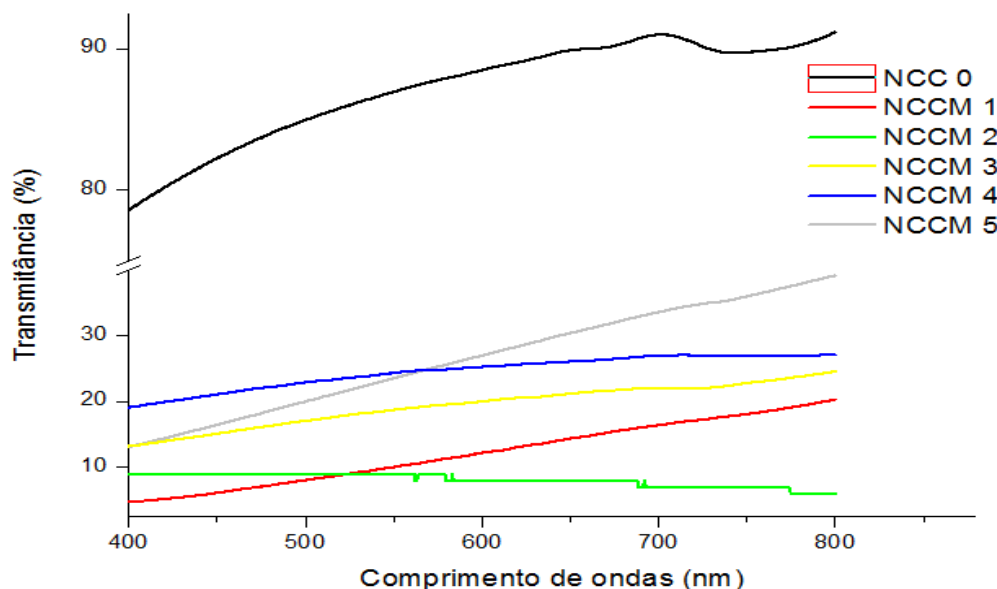


Figura 7: Espectro UV-visível da dispersão em água de NCC sem modificação (NCC 0) e dos NCC modificados com CTAB a $0,1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ (NCCM1), $0,2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ (NCCM2), $0,4 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ (NCCM3), $0,8 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ (NCCM4) e $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ (NCCM5).

O NCC sem modificação (NCC-0) exibiu transmitância acima de 78% na faixa de luz visível (Figura 7), indicando a ocorrência de NCCs dispersos em água assim como evidenciado na análise de MFA (Figura 8), e nas imagens da dispersão (Figura 6). Por outro lado, os NCCs modificados mostraram baixa transmitância, decorrente da formação de agregados de cristal que por passar pela modificação superficial e adsorver a cadeia de alcanos do CTAB, teve sua hidrofiliidade reduzida, uma vez que o CTAB possui cadeia hidrofóbica. Ainda foi observado que os NCCM-4, 5 e 6 apresentaram curva de transmitância acima dos NCCM 2 e 3, que

está relacionado com separação de fases ocorrida nos primeiros, devido a formação de agregados do tipo micelar (N. Dhar et al., 2012) que separaram-se da água, e consequentemente favoreceram a maior passagem de luz na fase dispersante. Dessa forma, a análise de transmitância das dispersões de NCC e NCCMs está em concordância com a análise visual. De acordo com os resultados, a análise de espectroscopia UV-Vis pode ser usada para indicar a eficiência da dispersão dos NCCs, auxiliando na discussão dos resultados.

3.9. Análise Morfológica e de Distribuição de Tamanho

As imagens obtidas em MEV mostraram que a morfologia da fibra de pinus e de NCCs são diferentes, enquanto a fibra é constituída por microfibrila em formato alongado com tamanho em micrômetros, o NCC é caracterizado pela formação de feixes de nanocristais aglomerados, devido à formação de ligações de hidrogênios entre as superfícies adjacentes dos NCCs durante o processo de congelamento anterior à etapa de secagem por liofilização (Naduparambath, Jinitha, Shaniba, Sreejith, & Balan, 2018) (Figura 8 A)

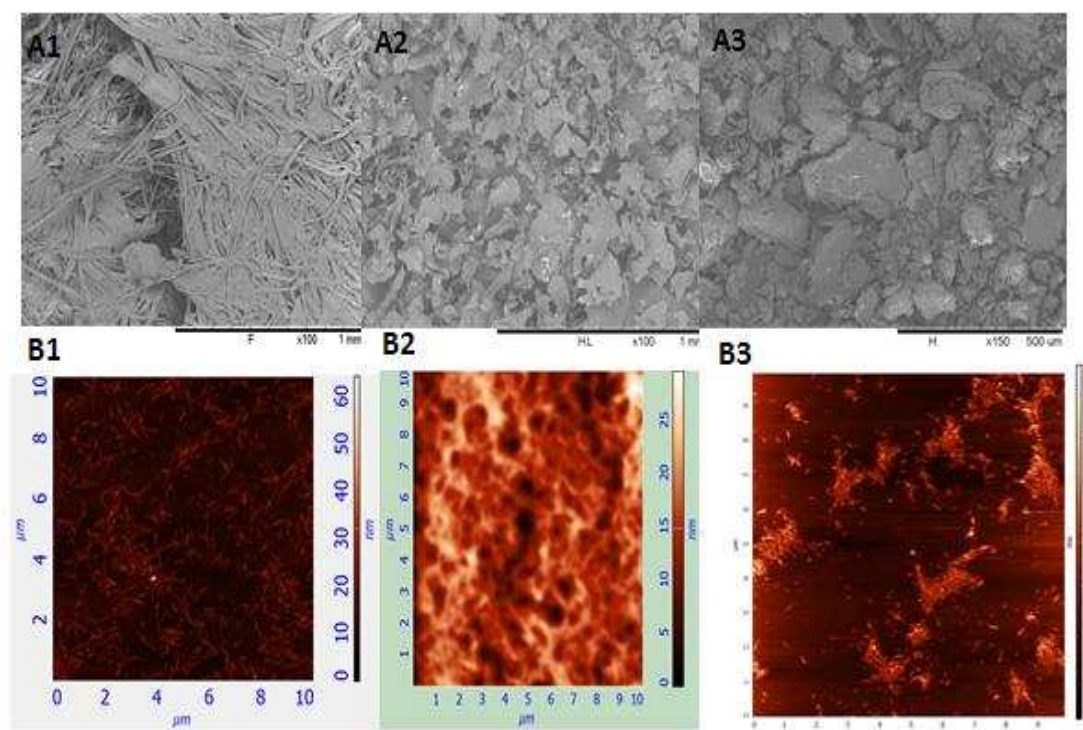


Figura 8: MEV (A) da fibra de pinus (A1), NCC sem modificação (A2) e NCC modificado com $0,2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ de CTAB (A3). E MFA em 2D dos NCC sem modificação (B1) NCCM com CTAB a $0,2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ disperso em água (B2) e disperso em acetona (B3).

A morfologia dos NCCs que passaram por modificação superficial não foi alterada (Figura 8 B) pela sua funcionalização, e portanto, as propriedades de reforço e térmicas dos NCCs hidrofóbicos produzidos foram mantidas em comparação aos NCCs não modificados, corroborando com os resultados de DRX e TGA.

As análises morfológicas e de tamanho das partículas foram realizadas para validar as dimensões e a qualidade da dispersão dos NCCs e dos NCCMs em dois solventes, água e acetona. A análise de MFA mostrou que os NCCs isolados da fibra de pinus apresentaram estruturas em forma de bastonetes, e boa dispersão em água (Figura 8 B1), o que está em consonância com os resultados reportados na literatura demonstrando que o NCC foi isolado com sucesso. O comprimento e largura dos NCCs dispersos em água estimados a partir da imagem AFM foram de 295 ± 135 nm de comprimento e $7,0 \pm 5$ de diâmetro (Tabela 1). Já pela análise de DLS foi de $164,4 \pm 63,35$ nm do raio hidrodinâmico (Tabela 1).

Após modificação superficial, um comportamento oposto para os NCCs em água foi observado, ocorrendo a sua aglomeração (Figura 8 B2), como foi evidenciado na imagem da dispersão (Figura 6). O surfactante CTAB cuja cadeia de alcanos conferiu característica menos polar ao composto foi adsorvido na superfície dos NCCs, conferindo a eles uma baixa afinidade com a água e promovendo a sua agregação (N. Dhar, Au, Berry, & Tam, 2012).

As dimensões estimadas dos NCCs modificados com $0,2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ de CTAB disperso em acetona (solvente de polaridade intermediária), foram: comprimento de 350 ± 160 nm e $8,3 \pm 6,2$ nm de largura, estimado pela técnica de AFM (Tabela 1), e $435,9 \pm 48,8$ nm (raio hidrodinâmico) pela a de DLS (Tabela 1). A partir desses resultados foi possível inferir que a funcionalização não afetou a forma dos NCCs, mas, embora os NCCMs tenham se dispersado melhor em acetona, ainda sim ocorreu aglomeração, apresentando maiores dimensões (Figura 8 B3).

Esses dados mostraram que a modificação realizada possibilitou a dispersão de NCCs em solvente com polaridade menor que a água, ampliando assim, suas possibilidades de aplicações.

4. Conclusão.

NCCs estáveis em dispersão aquosa foram isolados da fibra de pinus, cujas dimensões apresentadas foram de 295 ± 135 nm de comprimento e 7 ± 5 de diâmetro.

O surfactante CTAB exibiu capacidade para modificar a superfície dos NCCs, alterando sua carga superficial e sua hidrofobicidade. Esses parâmetros foram afetados pela concentração do surfactante utilizado. A maior hidrofobicidade dos NCCs modificados foi alcançada nos sistemas adicionados de 0,2% (m/g) de CTAB quando o maior ângulo de contato com a água (71°), e valores de potencial zeta de -21,1 mV. A modificação promoveu a dispersão dos NCCs em solvente de baixa polaridade, como a acetona, independente da concentração de CTAB adsorvidos. Somente os NCCs não modificados não dispersaram.

O CTAB não modificou a estrutura dos NCCs, visto que não ocorreram alterações na sua morfologia, no seu índice de cristalinidade e na sua estabilidade térmica. Assim, a modificação aqui realizada não comprometeu a capacidade de reforço dos NCCMs em polímeros.

Portanto, os resultados desta pesquisa indicaram que o NCC modificado obtidos possuem potencial para ser utilizados na produção de polímeros que venham a ser solubilizados em acetona, que pode aumentar a compatibilidade entre o polímero e o NCC.

5. Referências

- Abdul Khalil, H. P. S., Davoudpour, Y., Saurabh, C. K., Hossain, M. S., Adnan, A. S., Dungani, R., Haafiz, M. K. M. (2016). A review on nanocellulosic fibres as new material for sustainable packaging: Process and applications. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 64, 823–836. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.06.072>
- Antti, J., Visanko, M., Laitinen, O., Ämmälä, A., & Liimatainen, H. (2016). Amino-modified cellulose nanocrystals with adjustable hydrophobicity from combined regioselective oxidation and reductive amination. *Carbohydrate Polymers*, 136, 581–587. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.09.089>
- Araki, J., Wada, M., Kuga, S., & Okano, T. (1998). Flow properties of microcrystalline cellulose suspension prepared by acid treatment of native cellulose. 142, 75–82.
- Barbosa, L. C. A, 2007. Espectroscopia no infravermelho na caracterização de compostos orgânicos. Viçosa: Editora UFV.
- Bano, S., & Negi, Y. S. (2017). Studies on cellulose nanocrystals isolated from groundnut shells. *Carbohydrate Polymers*, 157, 1041–1049. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.10.069>
- Beaupré, J. J. (2012). *Chemically Enhanced Water Removal in Paper Making*. 173.
- Beck, S., Bouchard, J., Berry, R., Boulevard, S. J., & Canada, Q. C. H. R. (2012). Dispersibility in Water of Dried Nanocrystalline Cellulose Beck, S., Bouchard, J., Berry, R., Boulevard, S. J., & Canada, Q. C. H. R. (2012). Dispersibility in Water of Dried Nanocrystalline Cellulose.
- Chaudhary, S., Rohilla, D., & Mehta, S. K. (2014.). Surfactant adsorption and aggregate structure of silica nanoparticles : a versatile stratagem for the regulation of particle size and surface modification. *Materials Research Express* 1, 2053-1591. <https://doi.org/10.1088/2053-1591/1/1/015011>
- Cudjoe, E., Hunsen, M., Xue, Z., Way, A. E., Barrios, E., Olson, R. A., ... Rowan, S. J. (2017). Miscanthus Giganteus: A commercially viable sustainable source of cellulose nanocrystals. *Carbohydrate Polymers*, 155, 230–241. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.08.049>
- Dhar, N., Au, D., Berry, R. C., & Tam, K. C. (2012). Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects Interactions of nanocrystalline cellulose with an oppositely charged surfactant in aqueous medium. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 415, 310–319. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2012.09.010>
- Dhar, P., Bhasney, S. M., Kumar, A., & Katiyar, V. (2016). Acid functionalized cellulose nanocrystals and its effect on mechanical, thermal, crystallization and surfaces properties of poly (lactic acid) bionanocomposites films: A comprehensive study. *Polymer*, 101, 75–92. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2016.08.028>

Ding, C., Cai, C., Yin, L., Wu, Q., Pan, M., & Mei, C. (2019). Mechanically adaptive nanocomposites with cellulose nanocrystals: Strain- field mapping with digital image correlation. *Carbohydrate Polymers*, 211(October 2018), 11–21. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.01.098>

Ferreira, F. V, Mariano, M., Rabelo, S. C., Gouveia, R. F., & Lona, L. M. F. (2018). Applied Surface Science Isolation and surface modification of cellulose nanocrystals from sugarcane bagasse waste: From a micro- to a nano-scale view. *Applied Surface Science*, 436, 1113–1122. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2017.12.137>

Hasani, M., Cranston, E. D., Westman, G., & Gray, D. G. (2008). Cationic surface functionalization of cellulose nanocrystals. *Soft Matter*, 4(11), 2238–2244. <https://doi.org/10.1039/b806789a>

Hu, Z., Ballinger, S., Pelton, R., & Cranston, E. D. (2015). Surfactant-enhanced cellulose nanocrystal Pickering emulsions. *Journal of Colloid and Interface Science*, 439, 139–148. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2014.10.034>

Islam, M. T., Alam, M. M., & Zoccola, M. (2013). REVIEW on MODIFICATION of NANOCELLULOSE for APPLICATION in. 2(10), 5444–5451.(arrumar)

Jiang, Y., Zhou, J., Zhang, Q., Zhao, G., Heng, L., & Chen, D. (2017). Preparation of cellulose nanocrystals from Humulus japonicus stem and the influence of high temperature pretreatment. *Carbohydrate Polymers*, 164, 284–293. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.02.021>

Kaboorani, A., & Riedl, B. (2015). Surface modification of cellulose nanocrystals (CNC) by a cationic surfactant. *Industrial Crops and Products*, 65, 45–55. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.11.027>

Kargarzadeh, H., Ahmad, I., Abdullah, I., Dufresne, A., Zainudin, S. Y., & Sheltami, R. M. (2012). Effects of hydrolysis conditions on the morphology, crystallinity, and thermal stability of cellulose nanocrystals extracted from kenaf bast fibers. *Cellulose*, 19(3), 855–866. <https://doi.org/10.1007/s10570-012-9684-6>

Kumar, A., Negi, Y. S., Choudhary, V., & Bhardwaj, N. K. (2014). *Characterization of Cellulose Nanocrystals Produced by Acid-Hydrolysis from Sugarcane Bagasse as Agro-Waste*. (January), 0–8. <https://doi.org/10.12691/jmpc-2-1-1>

Kuo, P., Yan, N., & Sain, M. (2013). Influence of cellulose nanofibers on the curing behavior of epoxy / amine systems. *European Polymer Journal*, 49(12), 3778–3787. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2013.08.022>

Leite, L. S. F. (2015). *Preparação e caracterização de compósitos de acetato de celulose e nanocristais de celulose*. UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS.

Ljungberg, N., Bonini, C., Bortolussi, F., Boisson, C., Heux, L., & Cavallé, J. Y. (2005). New nanocomposite materials reinforced with cellulose whiskers in atactic polypropylene: Effect of surface and dispersion characteristics. *Biomacromolecules*, 6(5), 2732–2739. <https://doi.org/10.1021/bm050222v>

Lu, P., & Hsieh, Y. Lo. (2010). Preparation and properties of cellulose nanocrystals: Rods, spheres, and network. *Carbohydrate Polymers*, 82(2), 329–336. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.04.073>

Ly, M., & Mekonnen, T. H. (2019). Journal of Industrial and Engineering Chemistry Cationic surfactant modified cellulose nanocrystals for corrosion protective nanocomposite surface coatings. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2019.12.014>

Mehdi Jonoobi; Jalaludin Harun; Alireza Shakeri; Manjusri Misra; Kristiina Oksman. (2009). Chemical composition, crystallinity, and thermal degradation of bleached and unbleached kenaf bast. *Bioresources*, 4, 626–639.

Milanez, M., Dias, Á., Cristina, K., Carvalho, C. De, Jacobus, H., Voorwald, C., Ciof, H. (2019). *International Journal of Biological Macromolecules Obtainment and characterization of nanocellulose from an unwoven industrial textile cotton waste: Effect of acid hydrolysis conditions*. 126, 496–506. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.12.202>

Moreira, F. K. V. (2010). *Desenvolvimento de Nanocompósitos Poliméricos Biodegradáveis a partir de Pectina, Amido, e Nanofibras de Celulose*. 1–185. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>

Moriana, R., Vilaplana, F., & Ek, M. (2016). Cellulose Nanocrystals from Forest Residues as Reinforcing Agents for Composites: A Study from Macro- to Nano-Dimensions. *Carbohydrate Polymers*, 139, 139–149. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.12.020>

Naduparambath, S., Jinitha, T. V, Shaniba, V., Sreejith, M. P., & Balan, A. K. (2018). Isolation and characterisation of cellulose nanocrystals from sago seed shells. *Carbohydrate Polymers*, 180(April 2017), 13–20. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.09.088>

Ng, H. M., Sin, L. T., Tee, T. T., Bee, S. T., Hui, D., Low, C. Y., & Rahmat, A. R. (2015). Extraction of cellulose nanocrystals from plant sources for application as reinforcing agent in polymers. *Composites Part B: Engineering*, 75, 176–200. <https://doi.org/10.1016/j.compositesb.2015.01.008>

Oksman, K., Aitomäki, Y., Mathew, A. P., Siqueira, G., Zhou, Q., Butylina, S., ... Hooshmand, S. (2016). Review of the recent developments in cellulose nanocomposite processing. *Composites Part A: Applied Science and Manufacturing*, 83, 2–18. <https://doi.org/10.1016/j.compositesa.2015.10.041>

Prathapan, R., Thapa, R., Garnier, G., & Tabor, R. F. (2016). Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects Modulating the zeta potential of cellulose nanocrystals using salts and surfactants. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 509, 11–18. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2016.08.075>

Roman, M., & Winter, W. T. (2004). Effect of sulphate groups from sulphuric acid hydrolysis on the thermal degradation behaviour of bacterial cellulose. *Biomacromolecules*, (5), 1671–1677. <https://doi.org/10.1021/BM034519+>

Salajkova, M., Berglund, L. a., Zhou, Q., Salajková, M., Berglund, L. a., & Zhou, Q. (2012). Hydrophobic cellulose nanocrystals modified with quaternary ammonium salts. *Journal of Materials Chemistry*, 22(37), 19798. <https://doi.org/10.1039/c2jm34355j>

Santos, R. M. dos, Flauzino Neto, W. P., Silvério, H. A., Martins, D. F., Dantas, N. O., & Pasquini, D. (2013). Cellulose nanocrystals from pineapple leaf, a new approach for the reuse of this agro-waste. *Industrial Crops and Products*, 50, 707–714. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.08.049>

Savadekar, N. R., & Mhaske, S. T. (2012). Synthesis of nano cellulose fibers and effect on thermoplastics starch based films. *Carbohydrate Polymers*, 89(1), 146–151. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.02.063>

Segal, L. C., Creely, J., Martin, A. E. J., & Conrad, C. M. (1959). An empirical method for estimating the degree of crystallinity of native cellulose using the X-ray diffractometer. *Textile Research Journal*, 29, 786–794.

Smyth, M., García, A., Rader, C., Foster, E. J., & Bras, J. (2017). Industrial Crops & Products Extraction and process analysis of high aspect ratio cellulose nanocrystals from corn (*Zea mays*) agricultural residue. *Industrial Crops & Products*, 108(May), 257–266. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.06.006>

Tardy, B. L., Yokota, S., Ago, M., Xiang, W., Kondo, T., Bordes, R., & Rojas, O. J. (2017). Current Opinion in Colloid & Interface Science Nanocellulose – surfactant interactions. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 29, 57–67. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2017.02.004>

Xing, L., Gu, J., Zhang, W., Tu, D., & Hu, C. (2018). Cellulose I and II nanocrystals produced by sulfuric acid hydrolysis of Tetra pak cellulose I. *Carbohydrate Polymers*, 192(November 2017), 184–192. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.03.042>

ARTIGO 3

PRODUÇÃO DE NANOCOMPÓSITO ATIVO DE ACETATO DE CELULOSE INCORPORADO COM NANOCRISTAL DE CELLULOSE MODIFICADO E LISOZIMA.

RESUMO

Neste trabalho filmes nanocompósitos ativos biodegradáveis a partir de acetato de celulose (AC) incorporados com lisozima (LIS) e nanocristais de celulose modificados (NCCM) com brometo de hexadeciltrimetilamônio (CTAB) foram produzidos e caracterizados. Os filmes nanocompósitos foram avaliados quanto as suas propriedades mecânicas, permeabilidade ao vapor de água (TPVA), morfologia, transparência, resistência térmica e atividade antimicrobiana. Os filmes foram produzidos por meio do método *casting*. A modificação dos NCCs foi capaz de promover uma boa dispersão dos mesmos na matriz de AC, mantendo a transparência dos filmes, enquanto a lisozima não dispersou-se na matriz formando aglomerados na sua superfície. Por conseguinte, o NCCM (3% m/m) proporcionou aumento da resistência mecânica do filme e das propriedades de barreira ao vapor de água enquanto a adição da lisozima comprometeu essas propriedades. Também, nessa mesma concentração de NCCM (3% m/m) foi observado o maior ângulo de contato com a água, 71°. O filme nanocompósito apresentou atividade antimicrobiana sobre *L. inócua* e *S. aureus* apenas os filmes adicionados de 10% (m/m) de lisozima exibiram halo de inibição de 0,5 cm e de 0,3 cm, respectivamente. Essa atividade foi limitada pela retenção da lisozima na matriz polimérica que dificultou sua difusão. O estudo demonstrou que o uso do NCCM é uma alternativa para utilizar NCCs em matrizes hidrofóbicas, porém torna-se necessário melhorar a dispersão da lisozima, bem como sua difusão, de forma a potencializar as suas propriedades mecânicas, de barreiras e sua atividade antimicrobiana.

Palavra chave: Nanocompósito. Nanocristal de celulose modificado. Lisozima. Acetato de celulose.

1. Introdução

Tecnologias inovadoras na área de embalagens são desenvolvidas com o objetivo principal de conservação de alimentos perecíveis. Dentre as novas tecnologias se encontram as embalagens ativas com incorporação de substâncias antimicrobianas na matriz polimérica que, interagem com os alimentos, visando alterar, de maneira desejável, suas características (Soares et al., 2009; Sadaka et al., 2013; Fu et al., 2016;). Dentre os antimicrobianos que podem ser adicionados aos alimentos, tem-se a lisozima que é um antibacteriano aplicado nas indústrias de alimentos, e uma vez incorporada na embalagem, pode agir como um fator adicional para a garantia da qualidade de produtos (Huang et al., 2012, Ben et al., 2016; Wu et al., 2019)

A lisozima é uma enzima utilizada para conservação de alimentos, e seu uso é autorizado na União Europeia, no regulamento relativo aos aditivos alimentares (sob 2008/1333/CE) (Ben, Eghbal, Oulahal, Degraeve, & Gharsallaoui, 2016). É aceita como agente antimicrobiano em produtos alimentícios pela “Food and Drug Administration” nos EUA (FDA, 1998). É usada como conservante para alimentos como carnes, peixe, produtos de peixe, leite e produtos lácteos, frutas e hortaliças (Gyawali & Ibrahim, 2014). Estudos verificaram que a lisozima quando incorporada em matriz polimérica controlou o crescimento de microrganismos contaminantes de alimentos como *S.aureus* (Huang et al., 2012); *Bacillus subtilis* (W. Ma, Tang, Yin, Yang, & Qi, 2013); *Kocuria rhizophila* e *Listeria innocua* (Ben et al., 2016); *Micrococcus lysodeikticus* (Bayarri, Oulahal, Degraeve, & Gharsallaoui, 2014).

Além da preocupação com a segurança dos alimentos, existe também, uma grande discussão relativa ao acúmulo de embalagens plásticas no ambiente que traz uma série de problemas quanto à contaminação ambiental (Ojijo e Ray, 2013). Dessa forma, observa-se o interesse crescente pela produção de embalagens a partir de materiais biodegradáveis e de recursos renováveis, como por exemplo, o acetato de celulose que é um polímero com propriedades para formação de filmes. No entanto, o seu uso como embalagem de alimentos ainda é restrito devido a limitações em suas propriedades de barreira, mecânicas e térmicas (César, 2013). Com isso, a incorporação de materiais que melhorem suas propriedades a fim de produzir um novo material que responda às exigências mecânicas e de barreira para aplicações em embalagens de alimentos vem sendo pesquisadas.

Estudos indicam que a incorporação de nanocristais de celulose em bases poliméricas biodegradáveis é promissora para produção de nanocompósitos, pois, esses materiais são isolados de fonte renovável, que apresentam alto módulo de elasticidade e resistência mecânica, possuem elevada área superficial específica e podem atuar como reforço dos filmes poliméricos, mantendo a biodegradabilidade do sistema (Lu; Hsieh, 2010; Ng et al., 2015; Moriana; Vilaplana; Ek, 2016; Abdul khalil et al., 2016; Oksman et al., 2016; Cudjoe et al., 2017; El et al., 2018; Fang, Hou, Chen, & Hu, 2019; Chen, Zhou, Zou, & Gao, 2019).

No entanto, a produção de filmes hidrofóbicos biodegradáveis como o acetato de celulose com NCCs apresenta algumas dificuldades decorrentes da falta de compatibilidades entre esses compostos. Esse comportamento é proveniente do caráter hidrofóbico da matriz polimérica em oposição ao caráter hidrofílico dos NCCs, uma vez que uma baixa interação na região da interface é observada, as propriedades do material podem ser afetadas negativamente (Leite, 2015).

Dessa forma, para que os NCCs possam ser aplicados a polímeros hidrofóbicos de forma eficiente, uma alternativa é realizar tratamentos nas superfícies dos mesmos para aumentar as interações na região da interface e, conseqüentemente, melhorar a transferência de tensões em nanocompósitos (Ng et al., 2015). O uso de NCCs modificados e incorporados em materiais poliméricos hidrofóbicos foram demonstrados (Haque, Puglia, Fortunati, & Pracella, 2017; Lee & Kim, 2017; Chen et al., 2019; Jonoobi, Ashori, & Siracusa, 2019; Li et al., 2019). Esses estudos têm revelado que essa técnica é uma alternativa promissora para aumentar a dispersão dos NCCs nessas matrizes hidrofóbicas, e conseqüentemente, promoverem melhorias nas propriedades, seja mecânicas, de barreiras ou térmicas.

O uso de surfactantes para modificar a superfície dos NCCs tem sido eficiente para diminuir a sua hidrofobicidade, sem, contudo, alterar sua morfologia original. Por conseguinte, características importantes para os NCCs atuarem como agentes de reforço e barreiras em polímeros são mantidas, como a integridade e a resistência deste cristal (Ljungberg et al., 2005; Salajkova et al., 2012; Kaboorani e Riedl, 2015; Hu, Ballinger, Pelton, & Cranston, 2015; Oksman et al., 2016; Tardy et al., 2017). Como, por exemplo, no estudo de Kaboorani e Riedl. (2015) que conseguiram modificar a superfície dos NCCs com reduzidas quantidades de CTAB.

Assim, no presente estudo foi produzido um nanocompósito ativo antimicrobiano a base de acetato de celulose, por meio da incorporação de lisozima e nanocristais de celulose modificado com o surfactante CTAB. Avaliou-se também a compatibilidade desses aditivos na matriz polimérica e seus efeitos nas propriedades térmicas, mecânicas, de barreira e atividade antimicrobiana do filme.

2. Materiais e métodos

2.1. Materiais

Lisozima (Sigma-Aldrich, EUA); polpa de celulose obtida a partir de pinus fornecidas pela indústria de papel e celulose Klabin (São Paulo, Brasil); brometo de hexadeciltrimetilamônio (CTAB) (99% de pureza, Sigma-Aldrich, EUA); acetato de celulose (GS = 2,5; MM= 2.024.000 g mol⁻¹) (Rhodia- grupo Solvay, Santo André, SP, Brasil); acetona (Vetec Química Fina Ltda, P.A, Brasil); trietil citrato (Vetec Química Fina Ltda, P.A, Brasil); ágar Mueller-Hinton, (MHA; DifcoTM Laboratories, França); ágar BHI (Brain Heart Infusion; DifcoTM, França; membrana de celulose (76 mm) (D9402-100FT, Sigma-Aldrich, E.U.A).

2.2. Isolamento de nanocristais de celulose

Os nanocristais foram isolados da polpa de celulose pré-tratada, utilizando 20 mL de ácido sulfúrico a 60% para cada grama de fibra e mantidos sob agitação por 90 min. A reação foi paralisada com água gelada (5 a 8 °C), utilizando o mesmo volume da hidrólise ácida. A mistura foi centrifugada a 8500 g por 10 min a 20 °C por 4 vezes até a suspensão dos NCCs obter o pH 2. Em seguida o pH da dispersão de NCCs, foi ajustado com NaOH para o valor de 7. Posteriormente, ela foi dialisada com membranas de diálise por 5 dias. A suspensão dos NCCs foi submetida à agitação ultrassônica (desruptor de células digital, QR500, ECO-SONICS, Brasil) a 400 W com frequência de 60 KHz por 10 min sob banho de gelo, e, então, armazenadas a 4 °C. Os nanocristais foram secos por liofilização (FreeZone 2.5 benchtop, Labconco, Canadá) por três dias (Santos, 2013).

2.3. Modificação de superfície de NCC por adsorção de surfactantes

Após o isolamento do NCC, foi realizada a modificação de superfície com surfactante catiônico, Brometo de hexadeciltrimetilamônio (CTAB) (kaboarani e Riedi., 2015). Foram redispersos 0,5 g de NCCs em 400 mL de água ultra pura com auxílio do ultrassom de ponta (desruptor de células digital, QR500, ECO-SONICS,

Brasil) a 400 W por 20 min, em banho de gelo. Em seguida foi adicionado 0,1 g de CTAB, previamente solubilizadas em 100 mL de água a 60 °C, à dispersão de NCCs sob agitação, permanecendo por 2 horas. Em seguida, a dispersão foi centrifugada a 8500 g durante 10 minutos por 3 vezes. No final da centrifugação, as dispersões dos NCCs modificados foram dialisadas por 3 dias. Após diálise, os NCCs foram novamente centrifugados, nas mesmas condições, e realizou-se a troca do solvente, água, por acetona. O gel de NCC sedimentado foi recolhido e utilizado para produção dos nanocompósitos.

2.4. Produção do Filme Nanocompósito

Os filmes de acetato de celulose foram produzidos pelo sistema “casting”, de acordo com metodologia descrita por Soares e Hotchkiss (1998) com modificações.

Primeiramente, os géis de NCCMs em diferentes concentrações (0 a 5% m/m) foram dispersos no solvente acetona, com auxílio de um desruptor de células (QR500, ECO-SONICS, Brasil) a 400 W de potência por 10 min em banho de gelo. Em seguida foi adicionada à suspensão, a lisozima em diferentes concentrações (0 a 10% (m/m)), e, também, o acetato de celulose (2% (m/v)) e foram misturados com auxílio de um ultra-turrax a 20000 rpm por 5 min. Posteriormente, foi incorporado a esta solução 30% (m/m) do trietil citrato. As misturas foram agitadas com bastão de vidro, permanecendo em repouso por 10 min e em seguida foram espalhadas sobre placas de vidro com auxílio de aplicador (K Paint applicator). Após a evaporação do solvente em condições ambiente (25 ± 2 °C), os filmes foram retirados das placas e acondicionados em embalagens de polietileno/náilon até a sua utilização. Os tratamentos estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1: Tratamentos (TRT) dos filmes de acetatos de celulose incorporados com LIS e NCCM em diferentes concentrações estimados pelo delineamento de superfície de resposta.

TRT	LIS % (m/m)	NCCM % (m/m)
1	1,5	0,9
2	8,5	0,9
3	1,5	5,2
4	8,5	5,1
5	0,0	3,0
6	10,0	3,0
7	5,0	0,0
8	5,0	6,0
9	5,0	3,0
10	5,0	3,0
11	5,0	3,0
12	5,0	3,0
13	5,0	3,0

2.5. Caracterização do Nanocompósito

2.5.1. Espessura

A espessura média dos filmes foi mensurada com auxílio de micrômetro (MITUTOYO, modelo 547-401, Japão). As medidas foram realizadas em 5 corpos de prova de cada tratamento em 10 pontos aleatórios. As medidas de espessura foram expressas em micrômetros (μm) (Camilloto et al., 2010).

4.5.2 Propriedades mecânicas

Os filmes produzidos foram submetidos a testes mecânicos para avaliação da resistência à tração (RM) (MPa), alongamento na ruptura (AR) (%) e módulo elástico (ME)(MPa) de acordo com a norma ASTM D882-12 (ASTM, 2012), utilizando a máquina Universal de Testes Mecânicos (INSTRON Corporation, modelo 3367). Foram avaliados 5 corpos de prova de cada tratamento, com dimensões de 17,5 cm de comprimento e 2,5 cm de largura. A máquina foi operada com carga de 1 kN, velocidade de separação das garras de $50 \text{ mm} \cdot \text{min}^{-1}$ e distância inicial de 100 mm.

2.5.3. Avaliação da taxa de permeabilidade ao vapor de água

A taxa de permeabilidade ao vapor d'água (TPVA) dos filmes foi determinada por meio do método dessecante, de acordo com a ASTM E96/E96M-14 (ASTM, 2014) com modificações. Foram utilizadas cápsulas circulares (metacrilato de metil)

($\varnothing = 82,3$ mm) com paredes impermeáveis, contendo 20 g de cloreto de lítio e 10 mL de água destilada. Os filmes foram vedados com parafina na junção filme/cápsula. As cápsulas contendo solução saturada de cloreto de lítio foram acondicionadas em dessecadores com umidade relativa em torno de $75\% \pm 5\%$ mantendo-se a temperatura a 25 ± 2 °C. Os dados foram reportados em $\text{g}\cdot\text{cm}/\text{m}^2\cdot\text{dia}\cdot\text{Pa}$ (Pola et al., 2016).

2.5.4. Análise Termogravimétrica (TGA)

A estabilidade térmica foi realizada com auxílio de um analisador térmico TGA (modelo 60, Shimadzu - Japão), onde cerca de 3 mg de amostra de filme foi aquecido na faixa de temperatura de 20 °C a 700 °C com razão de aquecimento de 10 °C $\cdot\text{min}^{-1}$ para cada tratamento. O fluxo de nitrogênio foi mantido em 50 mL $\cdot\text{min}^{-1}$ (César, 2013).

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

As análises foram realizadas no equipamento FT-IR Nicolet 6700 (Thermo Scientific, EUA). Os espectros de absorção na região do infravermelho foram obtidos em ampla região de varredura de 4000 a 400 cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1} e um total de 16 varreduras por amostra.

2.5.6. Difração de raios X (DRX)

Análises de difração de raios-X foram realizadas para avaliar o índice de cristalinidade dos filmes. Foi utilizado o difratômetro DRX, modelo X'Pert PRO (PANalytical, Almelo, Holanda) a uma velocidade de $1,2^\circ/\text{min}$, no intervalo de 5° a 70° (2θ). O cálculo do índice de cristalinidade (IC) destas amostras foi realizado de acordo com o método proposto por Segal e colaboradores (1959) segundo a Equação 1 (Q. Ma, Hu, & Wang, 2016).

$$IC = \left[\frac{(I_{002} - I_{am})}{I_{002}} \right] \times 100 \quad \text{Equação 1}$$

Sendo:

I_{002} = material cristalino e amorfo obtido a partir da altura do pico 200 ($2\theta = 22,6^\circ$).

lam = material amorfo obtido a partir do mínimo da intensidade entre os picos 200 e 110 ($2\theta = 18^\circ$).

2.5.7. Análise de transmitância

A transparência e a capacidade de passagem da luz UV dos filmes foram avaliadas medindo a porcentagem de transmitância de luz de 200 a 800 nm usando um espectrofotômetro UV/visível (Modelo UV-18000, Shimadzu Co., Kyoto, Japão). Os resultados foram expressos em porcentagem de transmitância em 660 nm (T660), representando transparência dos filmes (Oun & Rhim, 2016).

2.5.8. Atividade antimicrobiana *in vitro* dos filmes

Culturas puras de *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) e *Listeria monocytogenes* (ATCC 15313) foram usadas para testar a atividade antimicrobiana *in vitro* dos filmes ativos incorporados com lisozima. Os inóculos foram preparados de acordo com o procedimento realizado por Sousa (2015).

Para avaliar a atividade antimicrobiana do filme ativo foi aplicado o método de difusão em ágar, colocando-se discos ($\varnothing = 1$ cm) do filme ativo sobre a superfície do ágar contendo a suspensão dos microrganismos na concentração de 1×10^3 UFC·mL⁻¹.

Alíquotas de 100 μ L dos inóculos de *Staphylococcus aureus* foram espalhados sobre a superfície da placa contendo ágar MH (Ágar Mueller-Hinton, MHA; Difco Laboratories), e similarmente de 100 μ L de *Listeria monocytogenes* em placa com meio BHI (Agar cérebro coração). Sobre a superfície do ágar inoculado foram colocados os discos ($\varnothing = 1$ cm) dos filmes com os diferentes tratamentos.

As placas foram incubadas a 7 °C por 10 horas e posteriormente incubadas a 35 °C \pm 2, por 18 e 20 horas, para *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*, respectivamente. A atividade antimicrobiana foi determinada por meio da medição do halo de inibição em torno dos filmes (cm). Todas as amostras foram avaliadas em triplicata.

2.5.9. Delineamento experimental e análise estatística

O experimento foi realizado seguindo o delineamento inteiramente casualizado (DIC), e foi utilizado o delineamento composto central rotacional (DCCR) com duas variáveis para estudar o efeito combinado de NCC e lisozima e 5 repetições no ponto central. As propriedades mecânicas, de barreira ao vapor de

água, ângulo de contato e transparência dos filmes foram avaliadas pela metodologia de Superfície de Resposta (MSR), por meio de análise de regressão com 5% de probabilidade em software Minitab (Minitab 17, 2014).

3. Resultados

3.1. FTIR

Todos os filmes mostraram picos característicos de acetato de celulose. O pico a 1750 cm^{-1} (Figura 1) foi atribuído ao alongamento vibracional do grupo carbonila (C=O) dos ésteres presentes no acetato de celulose, que também exibiu um pico em 1050 cm^{-1} , atribuído à flexão da ligação C-O-C presentes nas moléculas de celulose referente ao anel de piranose, e nos radicais de acetato de celulose. Outro pico a 1255 cm^{-1} correspondente a ligação C-O e um pico a 1380 Todos os filmes mostraram bandas de absorção característicos de acetato de celulose e de NCC. A banda em 1750 cm^{-1} (Figura 1) foi atribuído ao estiramento do grupo carbonila (C=O) dos ésteres presentes no acetato de celulose, que também exibiu uma banda em 1050 cm^{-1} , atribuído à flexão da ligação C-O-C presente nas moléculas de celulose referente ao anel de piranose, e nos radicais de acetato de celulose. Também foram observadas uma banda típica de ligação C-O em 1255 cm^{-1} e uma em 1380 cm^{-1} associado à flexão de CH_3 (vibração do alongamento C-H de grupos metileno) (Babosa., 2007; Rodrigues Filho et al., 2008; Vallejos, Peresin, & Rojas, 2012; Pola et al., 2016).

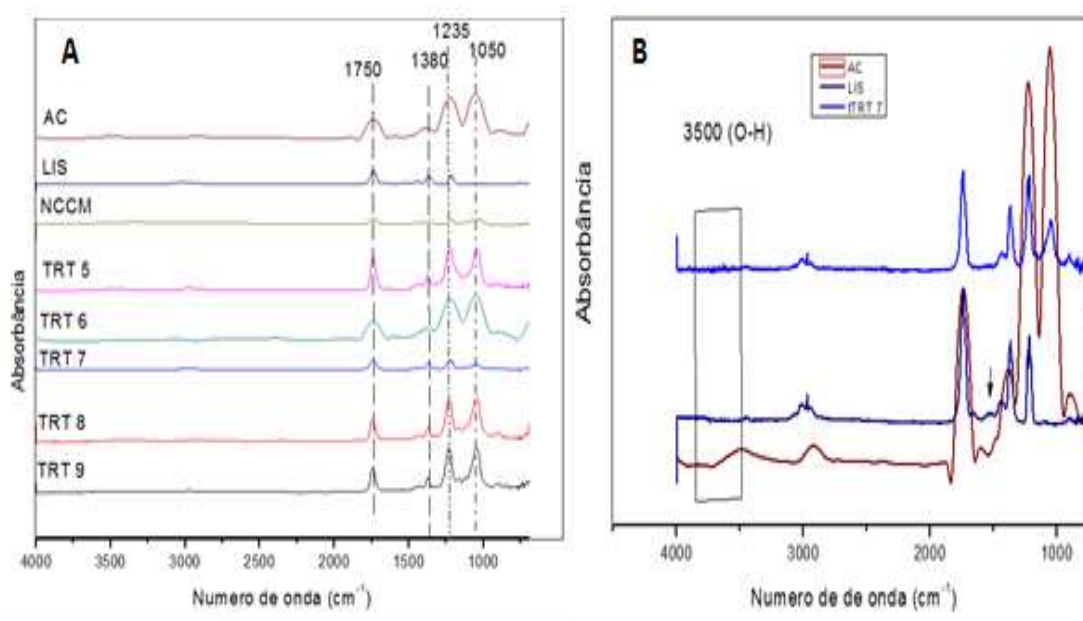


Figura 1. Espectros de FTIR dos filmes de AC (somente acetato de celulose), lisozima, NCCM e filmes de AC incorporado com: NCC a 3% (m/m) (TRT 5); LIS a 5% (m/m) (TRT 7); NCC a 3% (m/m) e LIS a 5% (TRT 9); NCC 6% (m/m) e LIS 5% (m/m) (TRT 8) e NCC 3% (m/m) e LIS 10% (m/m) (TRT 6).

A banda em 3290 cm^{-1} corresponde ao alongamento de NH dos grupos amino livres, e a absorção a 2943 cm^{-1} é característica do alongamento de CH presentes na lisozima. Essas bandas características da lisozima são sobrepostas pelas bandas características dos filmes, não sendo possível identificar a presença da lisozima no filme pela presença dessas bandas. No entanto, no filme somente com a lisozima (TRT 7) houve o desaparecimento da banda de absorção em 3500 cm^{-1} (O-H), quando comparado ao filme de somente de acetato de celulose (Figura 1B) sugerindo que houve interação da lisozima com a matriz polimérica. Já nos filmes com lisozima e NCCs (6, 8 e 9) houve diminuição dessa banda, não desaparecendo completamente, o que pode estar relacionado com a ligação da lisozima preferencialmente com os NCCs do que com a matriz polimérica.

As bandas características dos NCCs são semelhantes as do acetato de celulose que também são sobrepostos pelo filme, não sendo possível diferencia-los.

3.2. DRX

É possível observar que a matriz de acetato de celulose plastificada apresentou dois picos difusos em aproximadamente 8° e 18° , o que indicou que o acetato de celulose possui estrutura amorfa, mostrando a sua baixa estrutura cristalina (Leite, 2015; Abdel-Naby et al., 2014; Dauda et al. 2015; Pola et al., 2016) (Figura 2).

A adição de lisozima na matriz de acetato de celulose não influenciou na cristalinidade dos filmes, uma vez que apresentaram padrão de difração semelhante. Somente o filme adicionado com 3% (m/m) de NCC (TRT 5) e o com maior quantidade de NCC a 6% (m/m) (TRT 8) é que apresentaram uma pequena alteração no difratograma, onde apareceu uma leve inclinação no ângulo de intensidade de 22° , característico da região cristalina de NCCs. Esse comportamento indicou que a cristalinidade do filme de acetato não foi alterada, todavia com o acréscimo de NCCs na matriz polimérica a cristalinidade do sistema aumentou. Comportamentos semelhantes foram identificados por Santos 2016; Li et al., 2019 e Hammami et al., 2020, onde a adição de NCCs em filme de acetato de

celulose, PLLA e PVA, respectivamente, promoveram o aparecimento do pico em 22° em todos os filmes. De acordo com Pei et al., 2010, a mudança no comportamento cristalino dos nanocompósitos, observada por DRX, pode ser atribuída a um efeito nucleante dos nanocristais de celulose, favorecendo o crescimento dos domínios cristalinos nos nanocompósitos.

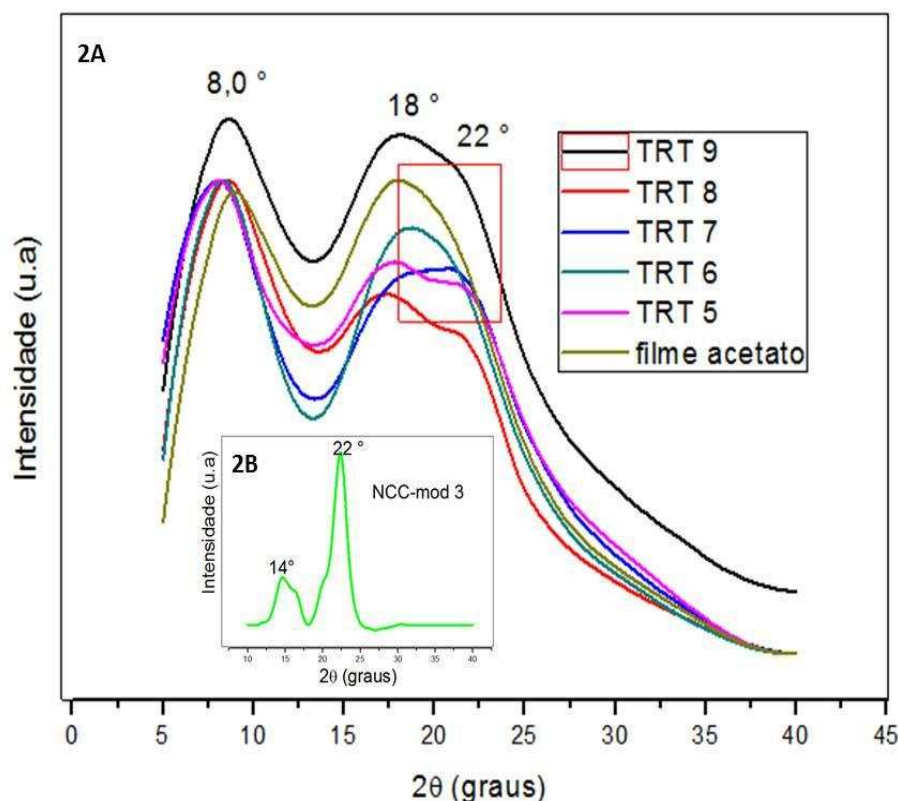


Figura 2. Difratomogramas de raios-x dos filmes de AC (somente acetato de celulose), filmes de AC incorporado com: NCC a 3% (m/m) (TRT 5); LIS a 5% (m/m) (TRT 7); NCC a 3% (m/m) e LIS a 5% (TRT 9); NCC 6% (m/m) e LIS 5% (m/m) (TRT 8) e NCC 3% (m/m) e LIS 10% (m/m) (TRT 6) (figura 2A) e o NCC modificado com $0,4 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ de surfactante CTAB(NCC-mod 3) (Figura 2B).

3.3. TGA

No filme de acetato de celulose, foram identificados 3 eventos de degradação. O primeiro evento de degradação ocorreu em torno de 50°C , e correspondeu a perda de água (Figura 3). O segundo evento, ocorreu próximo a 350°C correspondendo à decomposição do material orgânico devido à cisão da cadeia polimérica, liberando grupos acetila (Ouajai & Shanks, 2009; Leite, 2015). Já o terceiro evento, foi observado em temperaturas superiores a 500°C , que está

relacionado à degradação do resíduo carbonáceo produzido no estágio de degradação anterior (Mandal e Chakrabarty, 2014; Pola et al., 2016).

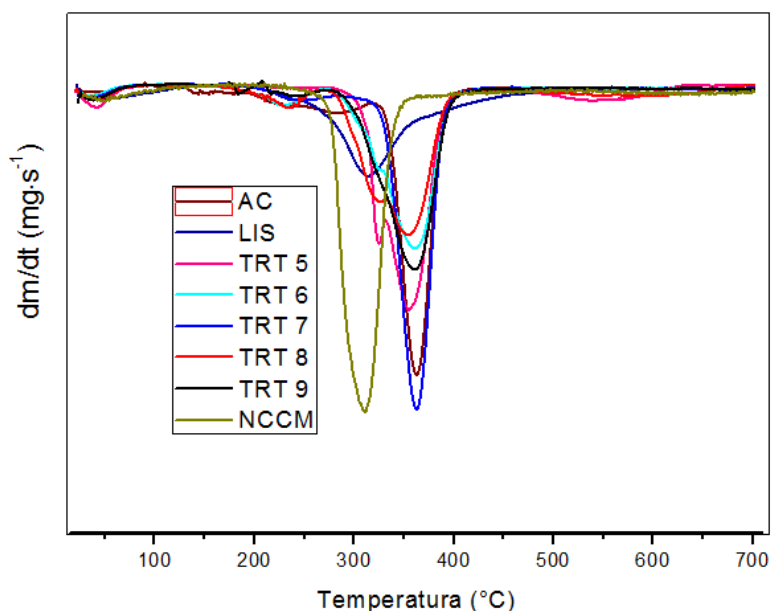


Figura 3. Curvas de TGA (A) dos filmes de AC (somente acetato de celulose), NCCM, e filmes de AC incorporado com: NCC a 3% (m/m) (TRT 5); LIS a 5% (m/m) (TRT 7); NCC a 3% (m/m) e LIS a 5% (m/m) (TRT 9); NCC 6% (m/m) e LIS 5% (m/m) (TRT 8) e NCC 3% (m/m) e LIS 10% (m/m) (TRT 6).

Nos filmes incorporados com NCCs foram observados, além dos eventos já mencionados, uma degradação em 320 °C. Esse comportamento pode ser atribuído à degradação média dos NCCM, cuja degradação ocorreu em temperaturas próximas de 310 °C, e da lisozima com temperatura de degradação próxima a 330 °C (Roman & Winter, 2004)

Apesar de haver pequenos eventos de degradação provocados pela adição de NCC e da lisozima, não ocorreram mudanças significativas no comportamento térmico da matriz de AC.

3.4. Avaliação visual e Transmissão de luz dos filmes

De acordo com os dados estatísticos as adições de NCCs em diferentes concentrações não afetaram significativamente ($p > 0,05$) a transmitância dos filmes (Tabela 2 e 3). Esses resultados sugeriu que a modificação no NCC com CTAB, possibilitou a dispersão do mesmo no filme de AC, devido à ausência de agregados, indicando uma boa compatibilidade do NCCM com a matriz de AC.



Figura 4: Imagens dos filmes de AC incorporado com: NCC a 3% (m/m) (TRT 5); LIS a 5% (m/m) (TRT 7); NCC a 3% (m/m) e LIS a 5% (TRT 9); NCC 6% (m/m) e LIS 5% (m/m) (TRT 8) e NCC 3% (m/m) e LIS 10% (m/m) (TRT 6).

Lee & Kim, 2017, também constataram que adição de NCCs modificados com (3-aminopropil) tretoxisilano (APTES), não interferiu na transmitância do filme de poliamida, atribuindo esse resultado a boa dispersão do NCC na matriz polimérica, promovida pela modificação do NCC. Comportamento semelhante também foi verificado por Luzi et al., 2017, em que a adição de NCCs em filme de PVA não influenciou na transparência do filme, com transmitância a 600 nm de 94,2%. Outras pesquisas relataram que a transparência de filmes nanocompósitos de carboximetil celulose incorporados com NCCs de estruturas semelhantes à teia e com alta relação de aspecto, foi menor do que a incorporada com nanopartículas menores (El Miri et al., 2015; Oun & Rhim, 2015) que, provavelmente, foi devido à melhor dispersão sem aglomeração dos pequenos NCCs na matriz polimérica (Xu et al., 2017).

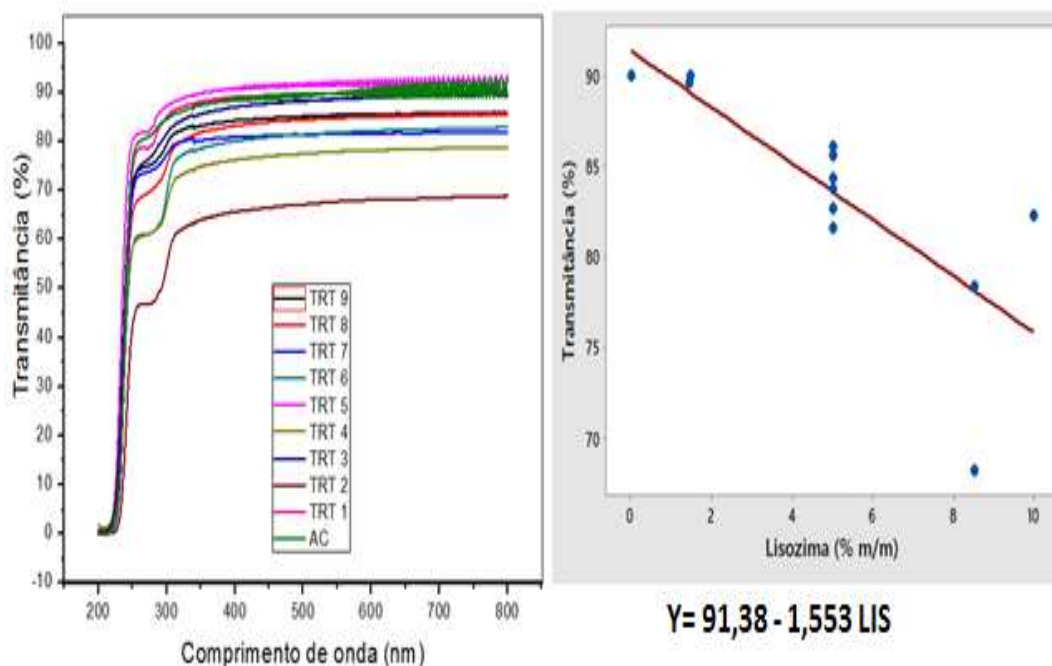


Figura 5: Transmitância de todos os filmes de 200 a 800 nm (A) e gráfico do comportamento do efeito do conteúdo de lisozima na transmitância dos filme de AC estimado pela análise de regressão.

A adição de lisozima influenciou de forma negativa na transparência dos filmes, reduzindo-a para 82%, e esse comportamento foi estimado por meio um modelo de regressão que explicou a influência da lisozima na transparência do filme (Figura 5) (Tabela 3). A lisozima por ser de caráter hidrofílico, apresentou incompatibilidade com a matriz polimérica de AC, que mesmo após a utilização do ultrassom não foi possível dispersá-la para obter uma boa homogeneização no filme. Além disso, a presença do NCC não influenciou na dispersão desse agente ativo na matriz. A diminuição na transmitância da luz dos filmes nanocompósitos produzidos, pode ser resultado dos agregados de lisozima na matriz polimérica, que promoveram uma barreira física, e conseqüentemente, impediu a passagem de luz através do filme.

Tabela 2: Concentração de NCCM e LIS nas formulações filmogênicas à base de acetato de celulose e resultados observados da caracterização das propriedades dos diferentes filmes.

TRT	LIS/ (m/m)	NCCM / (m/m)	T _{660 nm} (%)	ES (μm)	RM (MPa)	ME (Mpa)	AR (%)	TPVA (g·cm/m ² ·dia·Pa)	Angulo (°)
1	1,5	0,9	90,04	72,8	19,18	1065,53	3,69	8,56	61,8
2	8,5	0,9	68,23	82,4	18,60	1173,40	1,75	8,04	62,0
3	1,5	5,2	89,59	78,6	35,51	1994,78	2,91	8,77	66,2
4	8,5	5,1	78,37	100,6	19,81	1226,49	2,07	9,95	54,1
5	0,0	3,0	93,04	32,4	48,14	3151,63	2,32	6,88	70,6
6	10,0	3,0	82,31	106,0	29,64	2070,00	2,99	9,80	55,1
7	5,0	0,0	81,59	84,8	6,32	760,32	2,70	16,40	61,1
8	5,0	6,0	86,08	114,6	10,50	929,42	3,34	5,80	60,9
9	5,0	3,0	85,65	89,4	15,77	1116,35	2,96	10,29	62,0
10	5,0	3,0	84,36	89,8	15,07	1116,00	1,83	9,57	67,0
11	5,0	3,0	84,35	87,5	15,46	999,58	2,11	10,00	65,4
12	5,0	3,0	82,66	93,8	13,52	1122,50	2,14	11,27	64,0
13	5,0	3,0	83,72	77,9	10,22	1212,18	2,23	10,16	67,6

Tabela 3: Modelos estatísticos estimados para características de espessura, resistência máxima a tração, transmitância e ângulo de contato dos filmes incorporados com LIS e NCCM.

Propriedade	Equação*	R ²	Faj**
Espessura (μm)	Y= 35,6 + 12,97 LIS+ 3,91 NCC - 0,817 LIS*LIS	0,68	0,062
Resistência máxima a tração (Mpa)	Y= 28,71 - 9,86 LIS + 7,75 NCC + 0,9864 LIS*LIS - 0,646 NCC*NCC - 0,499 LIS*NCC	0,94	0,264
Transmitância (%) (660 nm)	Y= 91,38 - 1,553 LIS	0,56	0,07
Ângulo de contato	Y= 91,38 - 1,553 LIS	0,71	0,38

*Equações ajustadas pela análise de regressão

**Valor p para falta de ajuste estatístico do modelo (não significativo para p> 0,05)

**Valor p para falta de ajuste estatístico do modelo (não significativo para p> 0,05)

3.5. Propriedade mecânica

Foi possível ajustar um modelo de regressão para a variável espessura (p < 0,05), em função da a adição de NCCM e da lisozima . O aumento da espessura dos filmes de AC apresentou comportamento linear para o NCCM e quadrático para a lisozima (Figura 6 e Tabela 3). Embora, não tenha ocorrido interação entre esses fatores. O aumento da espessura do filme com o aumento da quantidade de NCC

incorporado em matrizes poliméricas tem sido discutido na literatura (Shankar e Rhim., 2016; Alves et al., 2015; Wang *et al.*, 2017 e Pola 2017). De acordo com esses autores, o aumento da espessura está diretamente relacionado com o aumento da quantidade de partículas sólidas na matriz polimérica, resultando numa maior matéria seca nos filmes (Benelhadj et al., 2016).

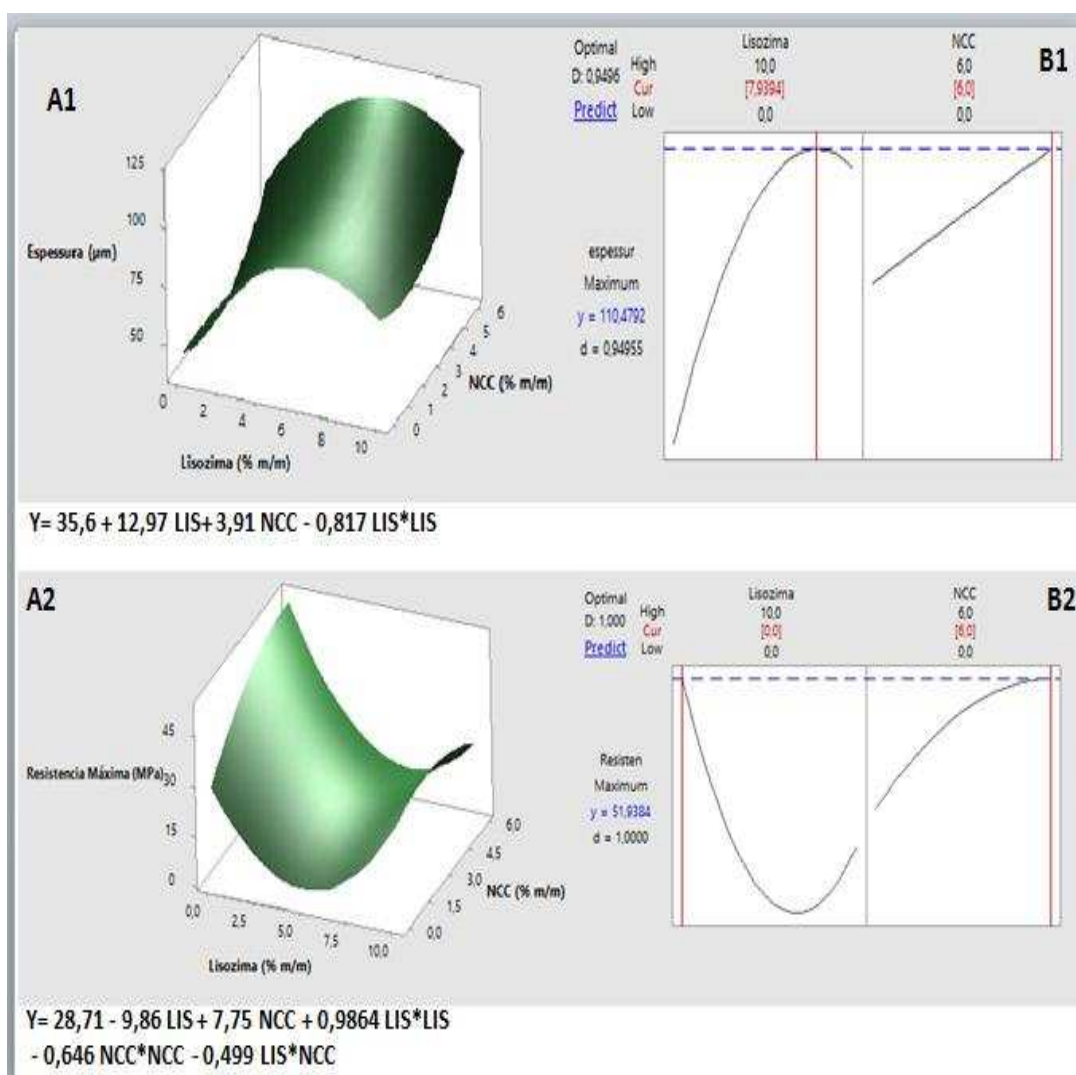


Figura 6: Gráfico de superfície de resposta do efeito de NCCM e LIS na espessura e na resistência máxima a tração do filme de acetato de celulose (A). Resultados da otimização simultânea usando a função de desejabilidade para maximizar os valores de espessura e resistência máxima a tração dos filmes (B)

O modelo de regressão ajustado que representou a influência do NCCM e da lisozima sobre a resistência máxima à tração foi significativo ($p < 0,05$) (Figura 6 e Tabela 2), enquanto para o módulo de elasticidade e alongamento do filme, não foram significativos ($p > 0,05$) (Tabela 3). O NCCM promoveu o aumento da resistência máxima à tração com adição deste composto na matriz polimérica,

enquanto a adição de lisozima contribuiu para a redução dessa propriedade. Esses compostos agiram sinergeticamente, porém com coeficiente de interação negativo. Dessa forma, o estudo indica que o NCCM contribui para aumentar resistência à tração mantendo a elasticidade e o módulo de elasticidade. Valores máximos foram observados quando 6% de NCCM e 0% de lisozima foram adicionados (Figura 6 B2).

O efeito do NCCM no aumento da resistência à tração está relacionado à dispersão dos NCCMs na matriz polimérica, que devido apresentarem elevada razão de aspecto, com enorme área interfacial, permite o ganho de reforço devido à boa dispersão na matriz polimérica (Dufresne, 2017). Essa boa dispersão do NCCMs foi evidenciada no resultado de transmitância. Por apresentar grande quantidade de grupamentos OH, assim como a matriz polimérica, o NCCM conseguiu interagir fortemente com as cadeias do polímero aumentando a compactação das cadeias dando origem a uma estrutura contínua, na qual o estresse é distribuído de forma mais uniforme, restringindo parcialmente sua mobilidade e, conseqüentemente, aumentando a resistência à tração dos filmes (Azeredo *et al.*, 2017; Dufresne, 2017; Pola 2017).

Outras tentativas em promover a melhoria da propriedade mecânica de filme de acetato de celulose, já foram realizadas, no entanto essas não foram eficientes. Leite. 2015, produziu filme de AC com NCC modificado com ácido acético e ácido carboxílico, e obteve redução das propriedades mecânicas, e o resultado foi atribuído à aglomeração dos NCCs na matriz e a baixa quantidade de NCCs adicionados (1,5% m/m). Yang *et al.* (2013) também relataram perdas nas propriedades mecânicas para baixas composições de NCCs (~5%), reforçado com ácido acético em filmes de acetato de celulose de algodão obtidos pelo método casting. Os autores atribuíram esta diminuição de desempenho à presença de aglomerados de nanocristais na matriz polimérica. Já o presente trabalho, mostrou que foi possível a melhoria da propriedade mecânica do filme de AC com adição de NCCMs, possivelmente pela melhor dispersão do NCCM, promovido pela sua modificação com CTAB.

A lisozima reduziu à resistência a tração do filme de AC, provavelmente devido à má dispersão na matriz, formando aglomerados que ocasionaram pontos de fratura, conforme demonstrado nas imagens e nos dados de transmitância (Figura 4 e 5). O efeito da aglomeração diminuiu a eficácia da relação de aspecto das

partículas, reduzindo sua propriedade mecânica (Ansari, Salajkova, Zhou, & Berglund, 2015). A literatura relata que a lisozima foi capaz de enfraquecer a estrutura e a integridade do filme de quitosana (Pack 2004), relacionado à ligação e dispersão da lisozima na matriz. De acordo com Gemili, Gemili, Yemenicioğlu, & Altinkaya, 2009 a incorporação de lisozima nos filmes preparados com solução de acetato de celulose 15% (m/m) causou uma redução significativa na resistência à tração e na capacidade de estiramento (alongamento à ruptura) dos filmes antes da ruptura. Isto pode estar relacionado à dissolução incompleta de lisozima em solução de polímero concentrado com uma quantidade reduzida de água, que resulta em distribuição não homogênea de agregados de lisozima em suspensão na estrutura final do filme.

Outro estudo mostrou que a adição de lisozima não alterou significativamente as propriedades mecânicas dos filmes de proteína isolada da planta *Spirulina*, no entanto, um claro aumento da rigidez dos filmes de caseinato de sódio e uma diminuição de sua flexibilidade e extensibilidade foram observados quando a lisozima foi adicionada, o que foi associado a uma boa dispersão da lisozima na matriz (Behinj 2016).

3.6. Ângulo de contato dos filmes nanocompósitos com a água

A molhabilidade ou hidrofobicidade das superfícies de filmes nanocompósitos são geralmente avaliadas pelos ângulos de contato com a água. Quanto maior o ângulo de contato, maior a hidrofobicidade do filme nanocompósito.

Foi possível ajustar um modelo que explicou o efeito da adição de NCCM e lisozima na variação do ângulo de contato do filme de AC. De acordo com os dados observou-se que, para concentrações de NCCMs de até 4,9% (m/m), à medida que a concentração deste composto aumentou na matriz de AC, maior foi o ângulo de contato entre a água e o filme nanocompósito (Figura 7). Acima da 4,9% (m/m) de NCC uma pequena redução no ângulo de contato foi verificada. Já a adição de lisozima proporcionou uma ligeira diminuição no ângulo de contato, à medida que aumentou-se a sua concentração. Observou-se uma interação negativa entre a lisozima e o NCCM no ângulo de contato entre os filmes nanocompósitos ativos e a água, cujo efeito foi negativo na hidrofobicidade do filme.

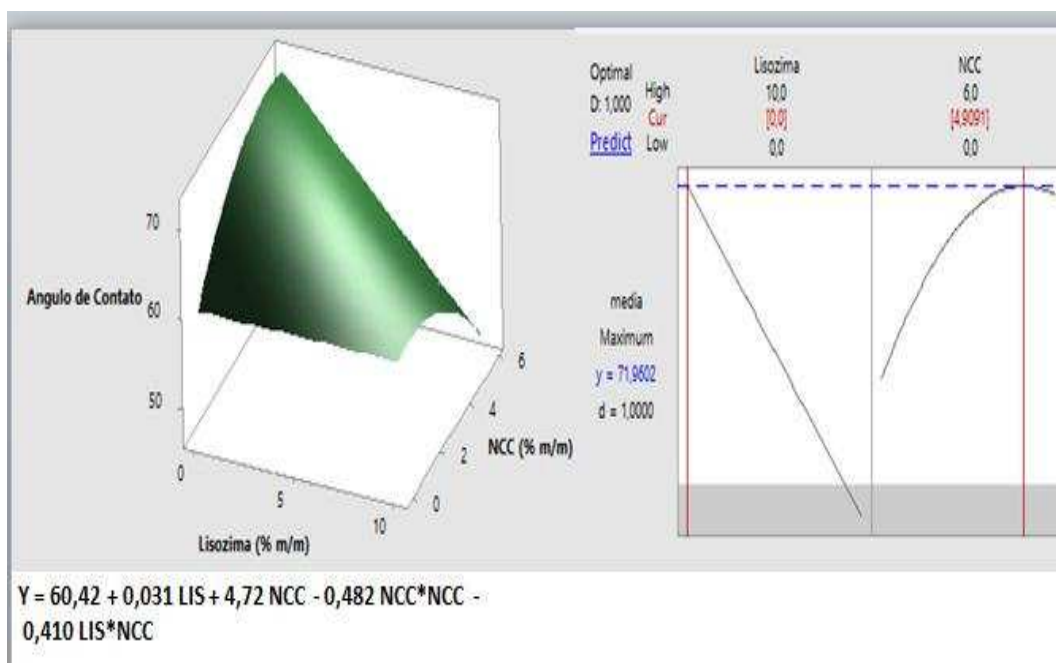


Figura 7: Gráfico de superfície de resposta do efeito de NCCM e LIS no ângulo de contato entre a água e o filme de acetato de celulose (A). Resultados da otimização usando a função de desejabilidade para maximizar os valores de espessura e resistência máxima a tração dos filmes (B).

Os resultados deste estudo mostraram que os NCCMs foram capazes de reduzir a molhabilidade e aumentou a resistência à umidade das superfícies dos filmes nanocompósitos, provavelmente devido à adição de nanocristais de maior hidrofobicidade (71,3 °) nos filmes de AC de 55°. No entanto, o efeito combinado com a lisozima, prejudicou a hidrofobicidade, possivelmente devido ao caráter hidrofílico do agente ativo.

Chen, Zhou, Zou, & Gao, 2019, também verificaram que a adição de NCCM com ácido cítrico e amidados com quitosana em filme de amido, provocou o aumento do ângulo de contato de 57,36° para 67,74° e atribuíram esse aumento à redução de hidroxila nas superfícies dos NCCs modificados, assim as chances de interação com a umidade foram reduzidas.

3.7. Permeabilidade ao vapor de água

Não foi possível estimar um modelo de regressão que explicasse a influência do NCCM e lisozima sobre a permeabilidade ao vapor de água para os filmes nanocompósitos ativos produzidos (Tabela 1). Apesar disso, os dados indicaram que o filme incorporado somente com lisozima (TRT 7) apresentou maior TPVA de 16,4 g·cm/m²·dia·Pa que os demais filmes. Enquanto o filme adicionado com apenas

NCCM (TRT 5) teve reduzida TPVA de $6,8 \text{ g}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{dia}\cdot\text{Pa}$. Esse comportamento está em concordância com os dados de ângulo de contato, em que a adição de 3% (m/m) de NCCM aumentou a hidrofobicidade dos filmes, reduzindo a passagem de vapor de água pelas moléculas do filme. Chen et al., 2019 observaram comportamento semelhante, e conseguiram reduzir a TPVA de filme de amido em até 87,4% quando 8% (m/m) de NCCM foram utilizados na produção do filme, pois os NCCMs eram mais hidrofóbicos quando comparados com os NCCs puros. Os NCCMs criaram efetivamente um caminho tortuoso para o vapor de água atravessar o filme nanocompósito, o que resultou em uma maior distância para as moléculas do vapor de água percorrerem (Bangyekan et al., 2006, Babaei et al., 2015, Miri et al., 2015).

A dispersão do NCCM ao longo da matriz polimérica foi capaz de promover a formação de um caminho tortuoso, aumentando o percurso de difusão das moléculas de água através do filme e, conseqüentemente, reduzindo a permeabilidade (Ferrer et al., 2017).

A capacidade de formação do caminho tortuoso se deve, exatamente, à elevada razão de aspecto apresentada pelos NCC. Além disso, a formação de interações de hidrogênio entre NCC e a matriz polimérica contribuem para a compactação e formação de uma estrutura coesa, reduzindo os espaços vazios entre as cadeias poliméricas, e conseqüentemente diminuindo a difusividade da água pelo filme (Abdollahi et al., 2013).

Comportamento similar foi reportado por Kakroodi, Kazemi, Pola 2017; Nofar & Park, 2017; Espino-Pérez et al., 2018 e Ly & Mekonnen, 2019, em que a adição de NCC provocou o aumento da propriedade de barreira ao vapor de água. Essa melhoria pode ser atribuído à dispersão do NCC na matriz e ao aumento da cristalinidade do nanocompósito produzido devido à incorporação de NCC com alta cristalinidade. Lee & Kim, 2017 observaram que o nanocompósito de poliamida com nanocristal modificado tiveram a TPVA reduzida em 60% quando 3% de NCCM foram adicionados. De acordo com os autores as fibras cristalinas impermeáveis tornaram o caminho tortuoso levando a processos de difusão mais lentos, e em menores valores de TPVA.

A adição da lisozima contribuiu para aumentar a TPVA dos filmes, mesmo aqueles contendo NCCM apresentaram maior TPVA quando comparados ao filme contendo somente NCCM (TRT 7). Esse fato pode ser explicado pelo caráter

hidrofílico da lisozima que dificulta sua dispersão na matriz, formando agregados, comprometendo a compactação da matriz polimérica.

3.8. Atividade antimicrobiana do nanocompósito ativo

Não foi ajustado um modelo estatístico ($p < 0,05$) que explicasse a influência dos NCCMs e da lisozima na atividade antimicrobiana dos nanocompósitos. Foi observado atividade antimicrobiana contra *L. innocua* e *S. aureus* em filmes ativos incorporados com 10% (m/m) de lisozima (TRT 6) formando um pequeno halo de inibição de 0,5 cm e de 0,2 cm para *L. innocua* e *S. aureus*, respectivamente. Os filmes com 8,5% e 5% (m/m) de lisozima (TRT 3, 4, 8 e 9) não formaram halo de inibição, no entanto não houve crescimento das bactérias na superfície dos filmes. Em contrapartida, em filmes incorporados somente com NCCM (TRT 5) houve crescimento das bactérias na sua superfície, indicando que o NCCM não apresentou atividade antimicrobiana.

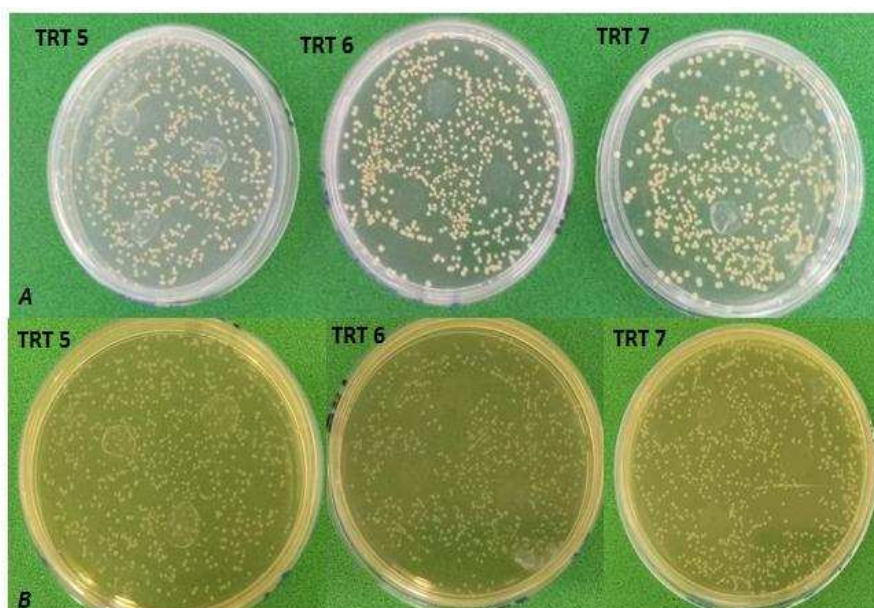


Figura 8: Atividade antimicrobiana, pela formação de halo (cm) dos filmes de AC incorporado com NCCM 3% (m/m) (TRT 5); LIS a 5% (m/m) (TRT 7); NCCM 3% (m/m) e LIS 10% (m/m) (TRT 6) sobre *S. aureus* (A) e *Listeria inócua* (B)

Comportamento similar foi observado por Mecitogli 2007 em que o filme de zeína contendo lisozima apresentou baixa atividade antimicrobiana sobre *S. aureus*. O aumento da afinidade da lisozima com os filmes de zeína por meio da formação de interações iônicas adicionais e de ligações H entre os compostos dificultaram a difusão da lisozima na matriz.

Atividade antimicrobiana de filme ativo com lisozima já foram relatadas na literatura, em filme de quitosana (Huang et al., 2012), alginato de sódio (Ben et al., 2016), gelatina (W. Ma et al., 2013), caseinato de sódio (Mendes de Souza, Fernández, López-Carballo, Gavara, & Hernández-Muñoz, 2010) acetato de celulose (Gemili et al., 2009) pectina (Bayarri et al., 2014), isolado protéico de soro (Ozer, Uz, Oymaci, & Altinkaya, 2016) e zeína (Güçbilmez, Yemenicioğlu, & Arslanoğlu, 2007). Barbiroli et al, 2012 demonstraram a redução de 0,5 ciclo logarítmico na população de *L. innocua* que esteve em contato com o filme contendo lisozima em comparação com o filme controle. Em outro estudo, houveram maior redução de *L. innocua*, sendo que 2,13 ciclo log dessa população de bactérias foi reduzida, no final de 24 h (Fajardo et al. 2014). Fabra, Sánchez-González, & Chiralt, 2014 comprovaram a eficácia antimicrobiana de filme de amido contendo lisozima contra *Listeria monocytogenes*.

O mecanismo de ação desta enzima baseia-se na capacidade de hidrolisar a ligação glicosídica entre os resíduos de açúcares aminados β -1,4 ácido N-acetilmurâmico e N-acetilglucosamina presentes nas cadeias de peptidoglicano da parede celular bacteriana, danificando sua parede celular (Chung e Hancock, 2000, Were et al., 2003, Callewaert, Walmagh, Michiels, & Lavigne, 2011, Lopes et al., 2019).

No presente trabalho esperava-se uma maior atividade antimicrobiana dos filmes nanocompositos ativos produzidos com lisozima, visto que a atividade antimicrobiana da lisozima contra essas bactérias já é bem consolidada na literatura (Huang et al., 2012; W. Ma et al., 2013, Ozer et al., 2016, Ben et al., 2016, Wu et al., 2019). Provavelmente o resultado aqui encontrado está relacionado com a retenção da lisozima na matriz de AC, dificultando a difusão desta para o ágar. Essa retenção pode ser devido a interação eletrostática da lisozima, de carga positiva, com o acetato de celulose e, ou, com NCCM de cargas negativas (Ben et al., 2016).

Assim, tornam-se necessários mais estudos para melhorar a difusão da lisozima da matriz polimérica de AC. Estudos realizados por Benelhadj et al., 2016, mostraram que a alteração do pH da lisozima de 7 para 3 aumentou sua difusão no filme de proteína isolada da planta *Arthrospira platensis* (Spirulina) (API). Em pH 3, a lisozima teve uma carga líquida positiva, enquanto a carga líquida das proteínas era zero ou quase zero. Assim, a ausência de interações eletrostáticas ou a presença de

interações eletrostáticas fracas entre lisozima e caseinato de Na ou API provavelmente contribuíram para a liberação mais rápida da lisozima nesse pH.

De acordo com Gemili et al., 2009 para aumentar a taxa de difusão de agentes ativos em filmes, plastificantes e aditivos podem ser incorporados. No entanto, deve-se ter o cuidado para não afetar adversamente a conformação inicial da lisozima. Bayarri et al., 2014 demonstraram que a adição de enzima pectinase aumentou a taxa de liberação da lisozima de filme a base de pectina..

4. Conclusão

A incorporação de NCCM e lisozima promoveu alterações nas propriedades mecânicas, de barreira e na transparência dos filmes. A transparência do filme de acetato foi mantida mesmo após a adição do NCCM, comprovando uma boa dispersão do NCCM na matriz e demonstrando que a modificação do NCC com CTAB foi eficiente para essa dispersão, proporcionando melhorias na propriedade mecânica e de barreira do filme de acetato de celulose. A lisozima contribuiu para a redução dessas propriedades, e não houve efeito sinérgico entre o NCCM e a lisozima para melhoria das propriedades do filme de acetato de celulose. Não foi possível estimar neste estudo condições ótimas de concentrações de lisozima e NCCMs para produção de um nanocompósito ativo. As melhores respostas foram obtidas para o filme adicionados com 4,9% (m/m) e 6%(m/m) de NCCM para ângulo de contato e resistência máxima a tração, respectivamente, com valores mínimos de lisozima.

Dessa forma mais estudos devem ser realizados para melhorar a dispersão da lisozima na matriz de acetato de celulose a fim de potencializar suas propriedades mecânicas e de barreiras.

A atividade antimicrobiana foi obtida com adição de 10% (m/m) de lisozima com halo de inibição de 0,5 cm para *Listeria Inocua*. Os NCCMs não apresentaram nenhuma atividade antimicrobiana. Uma possível retenção da lisozima na matriz dificultou a sua difusão, comprometendo sua atividade antimicrobiana. Assim, torna-se necessário outras pesquisas para aumentar a difusão dessa proteína.

5. Referências

- Abdel-Naby, A. S.; Al-Ghamdi, a. a. (2014) Poly(vinyl chloride) blend with biodegradable cellulose acetate in presence of N-(phenyl amino) maleimides. *International Journal of Biological Macromolecules*, 70, 124–130.
- Abdollahi, M.; Alboofetileh, M.; Behrooz, R.; Rezaei, M.; Miraki, R. (2013) Reducing water sensitivity of alginate bio-nanocomposite film using cellulose nanoparticles. *International Journal of Biological Macromolecules*, 54, 166-173.
- Abdul Khalil, H. P. S.; Davoudpour, Y.; Saurabh, C. K.; Hossain, M. S.; Adnan, A. S.; Dungani, R.; Paridah, M. T.; Islam Sarker, M. Z.; Fazita, M. N.; Syakir, M. .; Haafiz, M. K. M. (2016). A review on nanocellulosic fibres as new material for sustainable packaging: Process and applications. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 64, 823–836.
- Alves, J. S.; Dos Reis, K. C.; Menezes, E. G. T.; Pereira, F. V.; Pereira, J. (2015). Effect of cellulose nanocrystals and gelatin in corn starch plasticized films. *Carbohydrate Polymers*, 115, 215-222.
- Ansari, F., Salajkova, M., Zhou, Q., & Berglund, L. A. (2015). *Strong Surface Treatment Effects on Reinforcement Efficiency in Biocomposites Based on Cellulose Nanocrystals in Poly(vinyl acetate) Matrix*. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.5b01245>
- ASTM (2014) American Society Standard Testing and Materials. Standard test method for water vapor transmission of materials. E96/E96M-14 Philadelphia: ASTM, 2014.
- ASTM International. (2012). ASTM D882: Standard Test Method for Tensile Properties of Thin Plastic Sheeting. *ASTM Standards*, 12. <https://doi.org/10.1520/D0882-12.2>
- Azeredo, H. M. C.; Rosa, M. F.; Mattoso, L. H. C. (2017). Nanocellulose in biobased food packaging applications. *Industrial Crops and Products*, 97, 664-671.
- Barbiroli, A., Bonomi, F., Capretti, G., Iametti, S., Manzoni, M., Piergiovanni, L., et al. (2012). Antimicrobial activity of lysozyme and lactoferrin incorporated in cellulose-based food packaging. *Food Control*, 26 (2), 387 e 392.
- Barbosa, L. C. A, 2007. Espectroscopia no infravermelho na caracterização de compostos orgânicos. Viçosa: Editora UFV.
- Bayarri, M., Oulahal, N., Degraeve, P., & Gharsallaoui, A. (2014). Properties of lysozyme/low methoxyl (LM) pectin complexes for antimicrobial edible food packaging. *Journal of Food Engineering*, 131, 18–25. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2014.01.013>

Ben, C., Eghbal, N., Oulahal, N., Degraeve, P., & Gharsallaoui, A. (2016). Properties of lysozyme / sodium alginate complexes for the development of antimicrobial films. *Food Research International Journal*. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.08.015>

Ben, C.; Eghbal, N.; Oulahal, N.; Degraeve, P.; Gharsallaoui, A. (2016). Properties of lysozyme / sodium alginate complexes for the development of antimicrobial films. *Food Research International journal*.

Benelhadj, S., Fejji, N., Degraeve, P., Attia, H., Ghorbel, D., & Gharsallaoui, A. (2016). Properties of lysozyme/Arthrospira platensis (Spirulina) protein complexes for antimicrobial edible food packaging. *Algal Research*, 15, 43–49. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.02.003>

C. Bangyekan, D. Aht-Ong, K. Srikulkit. (2006). Preparation and properties evaluation of chitosan-coated cassava starch films, *Carbohydr. Polym.* 63 (1), 61–71.

Callewaert, L., Walmagh, M., Michiels, C. W., & Lavigne, R. (2011). Food applications of bacterial cell wall hydrolases. *Current Opinion in Biotechnology*, 22(2), 164–171. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2010.10.012>.

Camilloto, G. P., Pires, A. C. S., Soares, N. de F. F., Araújo, E. A., Andrade, N. J., & Ferreira, S. O. (2010). Effect of active packaging incorporated with triclosan on bacteria adhesion. *Journal of Food Science*, 75(8). <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2009.01502.x>.

César, N. R. (2013) Nanocompósito de acetato de celulose reforçado com whiskers extraídos da macrófita *Typha domingensis*. 174 f. Dissertação (título de Magister Scientiae)- Programa de Pós-Graduação em Ciência dos materiais da Universidade Federal de São Carlos, Sorocaba.

Chen, Q. J., Zhou, L. L., Zou, J. Q., & Gao, X. (2019). The preparation and characterization of nanocomposite film reinforced by modified cellulose nanocrystals. *International Journal of Biological Macromolecules*, 132, 1155–1162. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.04.063>.

Chung, W., & Hancock, R. E. W. (2000). Action of lysozyme and nisin mixtures against lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 60,25–32

Clinical Laboratory Standards Institute - CLSI (2003) Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests. Norma aprovada - Oitava Edição. M2- A8, 23, 1.

Cudjoe, E.; Hunsen, M.; Xue, Z.; Way, A. E.; Barrios, E.; Olson, R. A.; Hore, M. J. A.; Rowan, S. J. (2017). *Miscanthus Giganteus*: A commercially viable sustainable source of cellulose nanocrystals. *Carbohydrate Polymers*, 155, 230–241.

Daud, W. R. W.; Djuned, F. M. (2015) Cellulose acetate from oil palm empty fruit bunch via a one step heterogeneous acetylation. *Carbohydrate Polymers*, 132, 252–260.

Dufresne, A. (2017) Cellulose nanomaterial reinforced polymer nanocomposites. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, v. 29, p. 1-8.

El Miri, N.; Abdelouahdi, K.; Barakat, A.; Zahouily, M.; Fihri, A.; Solhy, A.; El Achaby, M. (2015). Bio-nanocomposite films reinforced with cellulose nanocrystals: Rheology of film-forming solutions, transparency, water vapor barrier and tensile properties of films. *Carbohydrate Polymers*, . 129, 156-167.

Espino-Pérez, E., Bras, J., Almeida, G., Plessis, C., Belgacem, N., Perré, P., & Domenek, S. (2018). Designed cellulose nanocrystal surface properties for improving barrier properties in polylactide nanocomposites. *Carbohydrate Polymers*, 183, 267–277.

Fabra, M. J., Sánchez-González, L., & Chiralt, A. (2014). Lysozyme release from isolate pea protein and starch based films and their antimicrobial properties. *LWT - Food Science and Technology*, 55(1), 22–26. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.08.001>.

Fang, Z., Hou, G., Chen, C., & Hu, L. (2019). Nanocellulose-based films and their emerging applications. *Current Opinion in Solid State and Materials Science*, 23(4), 100764. <https://doi.org/10.1016/j.cossms.2019.07.003>.

Food and Drug Administration: (FDA) (1998). Direct food substances affirmed as generally recognized as safe: egg white lysozyme. *Federal Register*, 63, 4, 12421 e 12426.

Fu, Y.; Sarkar, P.; Bhunia, A. K.; Yao, Y. (2016). Trends in Food Science & Technology Delivery systems of antimicrobial compounds to food. *Trends in Food Science & Technology*, v. 57, p. 165–177.

Gemili, S., Yemenicioğlu, A., & Altinkaya, S. A. (2009). Development of cellulose acetate based antimicrobial food packaging materials for controlled release of lysozyme. *Journal of Food Engineering*, 90(4), 453–462. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2008.07.014>.

Güçbilmez, Ç. M., Yemenicioğlu, A., & Arslanoğlu, A. (2007). Antimicrobial and antioxidant activity of edible zein films incorporated with lysozyme, albumin proteins and disodium EDTA. *Food Research International*, 40(1), 80–91. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2006.08.007>.

Gyawali, R., & Ibrahim, S. A. (2014). Natural products as antimicrobial agents. *Food Control*, 46, 412–429. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.05.047>.

Hammami, I., Benhamou, K., Hammami, H., Soretoteixeira, S., Arous, M., Kaddami, H., ... Costa, L. C. (2020). Electrical , morphology and structural properties of biodegradable nanocomposite polyvinyl-acetate / cellulose nanocrystals. *Materials Chemistry and Physics*, 240(April 2019), 122182. <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2019.122182>.

Haque, M. M. U., Puglia, D., Fortunati, E., & Pracella, M. (2017). Effect of reactive functionalization on properties and degradability of poly(lactic acid)/poly(vinyl acetate) nanocomposites with cellulose nanocrystals. *Reactive and Functional Polymers*, 110, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2016.11.003>.

Hu, Z., Ballinger, S., Pelton, R., & Cranston, E. D. (2015). Surfactant-enhanced cellulose nanocrystal Pickering emulsions. *Journal of Colloid and Interface Science*, 439, 139–148. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2014.10.034>.

Huang, W., Xu, H., Xue, Y., Huang, R., Deng, H., & Pan, S. (2012). Layer-by-layer immobilization of lysozyme – chitosan – organic rectorite composites on electrospun nano fibrous mats for pork preservation. *FRIN*, 48(2), 784–791. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.06.026>.

Jonoobi, M., Ashori, A., & Siracusa, V. (2019). Characterization and properties of polyethersulfone/ modified cellulose nanocrystals nanocomposite membranes. *Polymer Testing*, 76(February), 333–339. <https://doi.org/10.1016/j.polymertesting.2019.03.039>.

Kaboorani, A., & Riedl, B. (2015). Surface modification of cellulose nanocrystals (CNC) by a cationic surfactant. *Industrial Crops and Products*, 65, 45–55. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.11.027>.

Kakroodi, A. R., Kazemi, Y., Nofar, M., & Park, C. B. (2017). Tailoring poly(lactic acid) for packaging applications via the production of fully bio-based in situ microfibrillar composite films. *Chemical Engineering Journal*, 308, 772–782.

Lee, H., & Kim, G. (2017). Polyimide / amine-functionalized cellulose nanocrystal nanocomposite films. *Materials Today Communications*, 13(August), 275–281. <https://doi.org/10.1016/j.mtcomm.2017.10.010>.

Leite, L. S. F. (2015). *Preparação e caracterização de compósitos de acetato de celulose e nanocristais de celulose*. UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS.

Li, L., Bao, R., Gao, T., Liu, Z., Xie, B., Yang, M., & Yang, W. (2019). *Dopamine-induced functionalization of cellulose nanocrystals with polyethylene glycol towards poly (L -lactic acid) bionanocomposites for green packaging*. 203(August 2018), 275–284. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.09.057>.

Ljungberg, N., Bonini, C., Bortolussi, F., Boisson, C., Heux, L., & Cavallé, J. Y. (2005). New nanocomposite materials reinforced with cellulose whiskers in atactic polypropylene: Effect of surface and dispersion characteristics. *Biomacromolecules*, 6(5), 2732–2739. <https://doi.org/10.1021/bm050222v>.

Lopes, N. A., Barreto Pinilla, C. M., & Brandelli, A. (2019). Antimicrobial activity of lysozyme-nisin co-encapsulated in liposomes coated with polysaccharides. *Food Hydrocolloids*, 93(February), 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.02.009>.

Lu, P.; Hsieh, Y. Lo. (2010). Preparation and properties of cellulose nanocrystals: Rods, spheres, and network. *Carbohydrate Polymers*, v. 82, n. 2, p. 329–336.

- Luzi, F., Fortunati, E., Giovanale, G., Mazzaglia, A., Torre, L., & Balestra, G. M. (2017). Cellulose nanocrystals from *Actinidia deliciosa* pruning residues combined with carvacrol in PVA-CH films with antioxidant/antimicrobial properties for packaging applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, *104*, 43–55. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.05.176>.
- Ly, M., & Mekonnen, T. H. (2019). Journal of Industrial and Engineering Chemistry Cationic surfactant modified cellulose nanocrystals for corrosion protective nanocomposite surface coatings. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2019.12.014>.
- M. Babaei, M. Jonoobi, Y. Hamzeh, A. Ashori, (2015). Biodegradability and mechanical properties of reinforced starch nanocomposites using cellulose nanofibers, *Carbohydr. Polym.* 132 1–8.
- Ma, Q., Hu, D., & Wang, L. (2016). Preparation and physical properties of tara gum film reinforced with cellulose nanocrystals. *International Journal of Biological Macromolecules*, *86*, 606–612. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.01.104>.
- Ma, W., Tang, C., Yin, S., Yang, X., & Qi, J. (2013). Genipin-crosslinked gelatin films as controlled releasing carriers of lysozyme. *FRIN*, *51*(1), 321–324. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.12.039>.
- Mandal, A., & Chakrabarty, D. (2011). Isolation of nanocellulose from waste sugarcane bagasse (SCB) and its characterization. *Carbohydrate Polymers*, *86*, 1291–1299.
- Mendes de Souza, P., Fernández, A., López-Carballo, G., Gavara, R., & Hernández-Muñoz, P. (2010). Modified sodium caseinate films as releasing carriers of lysozyme. *Food Hydrocolloids*, *24*(4), 300–306. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2009.10.005>.
- Miao, C., & Hamad, W. Y. (2016). In-situ polymerized cellulose nanocrystals (CNC)—poly(l-lactide) (PLLA) nanomaterials and applications in nanocomposite processing. *Carbohydrate Polymers*, *153*, 549–558. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.08.012>.
- Moriana, R.; Vilaplana, F.; EK, M. (2016) Cellulose Nanocrystals from Forest Residues as Reinforcing Agents for Composites: A Study from Macro- to Nano-Dimensions. *Carbohydrate Polymers*, v. 139, p. 139–149..
- N.E. Miri, K. Abdelouahdi, A. Barakat, M. Zahouily, A. Fihri, A. Solhy, M.E. Achaby. (2015). Bio-nanocomposite films reinforced with cellulose nanocrystals: rheology of film-forming solutions, transparency, water vapor barrier and tensile properties of films, *Carbohydr. Polym.* 129, 156–167.
- Ng, H. M., Sin, L. T., Tee, T. T., Bee, S. T., Hui, D., Low, C. Y., & Rahmat, A. R. (2015). Extraction of cellulose nanocrystals from plant sources for application as reinforcing agent in polymers. *Composites Part B: Engineering*, *75*, 176–200. <https://doi.org/10.1016/j.compositesb.2015.01.008>.

Ojijo, V., & Ray, S. S. (2014). Nano-biocomposites based on synthetic aliphatic polyesters and nanoclay. *Progress in Materials Science*, 62, 1–57.

Oksman, K.; Aitomäki, Y.; Mathew, A. P.; Siqueira, G.; Zhou, Q.; Butylina, S.; Tanpichai, S.; Zhou, X.; Hooshmand, S. (2016) Review of the recent developments in cellulose nanocomposite processing. *Composites Part A: Applied Science and Manufacturing*, v. 83, p. 2–18.

Ouajai, S., & Shanks, R. A. (2009). Biocomposites of cellulose acetate butyrate with modified hemp cellulose fibres. *Macromolecular Materials and Engineering*, 294 (3), 213–221.

Oun, A. A., & Rhim, J.-W. (2016). Isolation of cellulose nanocrystals from grain straws and their use for the preparation of carboxymethyl cellulose-based nanocomposite films. *Carbohydrate Polymers*, 150, 187–200. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.05.020>.

Ozer, B. B. P., Uz, M., Oymaci, P., & Altinkaya, S. A. (2016). Development of a novel strategy for controlled release of lysozyme from whey protein isolate based active food packaging films. *Food Hydrocolloids*, 61, 877–886. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.07.001>.

PEI, A.; ZHOU, Q.; BERGLUND, L. A. (2010) Functionalized cellulose nanocrystals as biobased nucleation agents in poly(L-lactide) (PLLA) – Crystallization and mechanical property effects. *Composites Science and Technology*, vol. 70, n° 5, pp. 815–821.

Pola, C. C., Medeiros, E. A. A., Pereira, O. L., Souza, V. G. L., Otoni, C. G., Camilloto, G. P., & Soares, N. F. F. (2016a). Cellulose acetate active films incorporated with oregano (*Origanum vulgare*) essential oil and organophilic montmorillonite clay control the growth of phytopathogenic fungi. *Food Packaging and Shelf Life*, 9, 69–78. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2016.07.001>.

Ro, J., Park, C., Kim, J. T., Kim, H., Lee, Y. E., Yoo, S. Y., et al. (2017). Enhancing lysozyme loading in powdered liposomes by controlling encapsulation process. *Bulletin of the Korean Chemical Society*, 38, 744–750.

Rodrigues Filho, G., Monteiro, D. S., Meireles, C. d. S., de Assunção, R. M. N., Cerqueira, D. A., Barud, H. S., et al. (2008). Synthesis and characterization of cellulose acetate produced from recycled newspaper. *Carbohydrate Polymers*, 73 (1), 74–82.

Roman, M., & Winter, W. T. (2004). Effect of sulphate groups from sulphuric acid hydrolysis on the thermal degradation behaviour of bacterial cellulose. *Biomacromolecules*, (5), 1671–1677. <https://doi.org/10.1021/BM034519>.

Sadaka, F.; Nguimjeu, C.; Brachais, C.; Vroman, I. Withdrawn (2013) Review on antimicrobial packaging containing essential oils and their active biomolecules. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, v. 20, p. 350.

Salajkova, M., Berglund, L. a., Zhou, Q., Salajková, M., Berglund, L. a., & Zhou, Q. (2012). Hydrophobic cellulose nanocrystals modified with quaternary ammonium salts. *Journal of Materials Chemistry*, 22(37), 19798. <https://doi.org/10.1039/c2jm34355j>.

Santos, R. M. dos; Flauzino Neto, W. P.; Silvério, H. A.; martins, D. F.; Dantas, N. O.; Pasquini, D. (2013). Cellulose nanocrystals from pineapple leaf, a new approach for the reuse of this agro-waste. *Industrial Crops and Products*, v. 50, p. 707–714.

Soares, N. F. F., & Hotchkiss, J. H. (1998). Naringinase Immobilization in Packaging Films for Reducing Naringin Concentration in Grapefruit Juice. *Journal of Food Science*, 63(1), 61–65. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1998.tb15676>.

SOUSA, M. M. (2015) Desenvolvimento e caracterização de filme ativo a base de metil celulose incorporado com nanopartículas de quitosana e nisina. 99f Dissertação (título de Magister Scientiae)- Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

Tardy, B. L., Yokota, S., Ago, M., Xiang, W., Kondo, T., Bordes, R., & Rojas, O. J. (2017). Current Opinion in Colloid & Interface Science Nanocellulose – surfactant interactions. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 29, 57–67. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2017.02.004>.

Vallejos, E., Peresin, M. S., & Rojas, O. J. (2012). *All-Cellulose Composite Fibers Obtained by Electrospinning Dispersions of Cellulose Acetate and Cellulose Nanocrystals*. 1075–1083. <https://doi.org/10.1007/s10924-012-0499-1>.

WANG, L.-F.; SHANKAR, S.; RHIM, J.-W. (2017). Properties of alginate-based films reinforced with cellulose fibers and cellulose nanowhiskers isolated from mulberry pulp. *Food Hydrocolloids*,. 63, 201-208, 2017.

Were, L. M., Bruce, B., Davidson, M., & Weiss, J. (2003). Size, stability, and entrapment efficiency of phospholipid nanocapsules containing polypeptide antimicrobials. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 8073–8079.

Wu, T., Jiang, Q., Wu, D., Hu, Y., Chen, S., Ding, T., ... Chen, J. (2019). What is new in lysozyme research and its application in food industry? A review. *Food Chemistry*, 274, 698–709. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.09.017>.

Wu, T., Wu, C., Fu, S., Wang, L., Yuan, C., Chen, S., et al. (2017). Integration of lysozyme into chitosan nanoparticles for improving antibacterial activity. *Carbohydrate Polymers*, 155, 192–200.

Xu, Y.; Scales, A.; Jordan, K.; Kim, C.; Sismour, E. (2017). Starch nanocomposite films incorporating grape pomace extract and cellulose nanocrystal. *Journal of Applied Polymer Science*, 134,. 6, 44438.

Yang, Z.Y. et al.(2013). The transparency and mechanical properties of cellulose acetate nanocomposites using cellulose nanowhiskers as fillers. *Cellulose* 20, 159–168.

CONCLUSÃO GERAL

No Artigo 1 foi possível isolar NCCs da coroa de abacaxi. O tempo de hidrólise influenciou nas características dos NCCs, obtendo-se NCCs de comprimentos entre 274 e 295 nm, diâmetro de 3,7 e 11 nm, relação de aspectos de 24,9 a 69,8, potencial zeta de -17,3 a -24,6 mV e cristalinidade de 56 a 85%. O maior rendimento foi obtido com 120 min de hidrólise, com cerca de 29,9% (m/m), e o maior índice de cristalinidade com 60 min (85%). O estudo indicou que as principais características dos NCCs para seu uso como reforço, podem ser potencializadas com tempos de hidrólise entre 60 a 120 min.

No artigo 2 constatou-se que o surfactante CTAB foi capaz de modificar a superfície dos NCCs, alterando sua carga superficial e sua hidrofobicidade, e que esses, são dependentes da concentração de surfactante utilizado. A maior hidrofobicidade dos NCCs modificados foi obtida quando 0,2% (m/m) de CTAB foi usado, obtendo-se o maior ângulo de contato com a água (71°). Nessa condição o potencial zeta foi de -21,1 mV. A modificação promoveu a dispersão dos NCCs em solvente de baixa polaridade como a acetona. Assim, pode-se aplicar esse NCC modificado (0,2% m/v) em acetato de celulose, polímero hidrofóbico, conforme abordado no artigo 3.

No artigo 3, desenvolveu-se o nanocompósito ativo adicionado de lisozima, agente antimicrobiano, e do NCCM. A incorporação de NCCM e lisozima promoveu alterações nas propriedades de resistência a tração, de barreira a vapor de água e na transparência dos filmes. A transparência do filme de acetato foi mantida mesmo após a adição do NCCM, indicando uma boa dispersão do NCCM na matriz e demonstrando que a modificação do NCC com CTAB foi eficiente para essa dispersão. Houve melhoria na propriedade mecânica e de barreira do filme de acetato de celulose. A lisozima contribuiu para redução dessas propriedades. Não houve efeito sinérgico entre o NCC e a lisozima para melhoria das propriedades do filme de acetato de celulose. Não foi possível estimar neste estudo condições ótimas de concentrações de lisozima e NCC simultâneos para produção de um nanocompósito ativo. As melhores respostas foram obtidas para o filme adicionados com 4,9% e 6% de NCC para ângulo de contato e resistência máxima a tração, respectivamente, com valores mínimos de lisozima.

A atividade antimicrobiana foi obtida com adição de 10% (m/m) de lisozima com halo de inibição de 0,5 cm para *Listeria Inocua*. O NCCM não apresentou

nenhuma atividade antimicrobiana. Dessa forma, outros estudos devem ser realizados para melhorar a dispersão e difusão da lisozima na matriz de acetato de celulose a fim de potencializar suas propriedades. O estudo sugere que avaliação de diferentes concentrações de plastificantes pode ser uma alternativa de melhorar a difusão da lisozima. Um outro estudo seria a alteração da carga superficial da lisozima, por meio da alteração do pH do meio, e também um estudo da difusão da lisozima da matriz de acetato para o alimento em função do tempo, variando os fatores como pH e concentração de plastificantes.

O trabalho também sugere a avaliação da incorporação de NCCM com CTAB na matriz de acetato de celulose com diferentes potenciais zeta, a fim de observar como a carga superficial dos NCCMs influenciará em algumas de suas propriedades de barreira, mecânicas ou térmicas.