

# NANOCRISTAIS DE CELULOSE BACTERIANA A PARTIR DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

## *Bacterial Cellulose Nanocrystals from Enzymatic Hydrolysis*

Letícia de Souza\*  
Derce O. S. Recouvreur\*\*

### **Resumo**

Nanocristais de celulose são estruturas com dimensões nanométricas, altamente cristalinas, que vem se destacando na área de nanocompósitos. Suas propriedades, como elevada área superficial, baixa densidade, resistência mecânica e facilidade de modificação, são interessantes para o preparo de vários tipos de nanomateriais multifuncionais em diferentes áreas de aplicação. Além disso, os nanocristais de celulose são provenientes de fontes abundantes e renováveis, sendo biodegradáveis. O método enzimático de produção de nanocristais de celulose é um método alternativo, menos dispendioso, dispensando a necessidade de produtos químicos e requerendo muito menos energia. Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi isolar nanocristais de celulose a partir da hidrólise enzimática de celulose bacteriana produzida utilizando glicerol como fonte de carbono. Foi também determinado o rendimento de nanocristais de celulose em função da massa de celulose hidrogel, mantendo constante a quantidade de enzimas. Os resultados demonstraram que o método enzimático atingiu o melhor rendimento quando foi utilizado 2 g de hidrogel de celulose para 40  $\mu$ L de enzima celulase (endoglucanase) e 1 mL de tampão citrato. Foi observado também que o rendimento de nanocristais diminui com o aumento do tempo necessário para o processo da hidrólise enzimática.

**Palavras-chave:** Celulose bacteriana. Hidrólise enzimática. Celulases. Nanocristais de celulose.

\* Graduada em Ciência e Tecnologia. UFSC - Centro de Joinville. Email: le.souza19@hotmail.com

\*\* Orientadora. UFSC - Centro Tecnológico de Joinville. Email: derce.recouvreur@ufsc.br

## **Abstract**

Cellulose nanocrystals are highly crystalline structures with nanoscopic scale (nanoscale) dimensions that have received increased attention in the nanocomposites area. Its properties such as large surface area, low density, mechanical strength and ease of modification are attractive to the preparation many kinds of nanomaterials applied multifunctional in various fields. Besides, the cellulose nanocrystals are from abundant and renewable sources being biodegradable. The method to obtain cellulose nanocrystal from of enzymatic hydrolysis is an alternative, less expensive, does not use chemicals and requires much less energy. In this sense, the primary objective of this study was produced bacterial cellulose using glycerol as a carbon source and isolate cellulose nanocrystals from bacterial cellulose using the enzymatic hydrolysis. This study also investigated the yield of cellulose nanocrystals depending on the weight of the cellulose hydrogel, keeping constant some enzymes. The study shows us that the enzymatic method got the best performance when used cellulose hydrogel 2 g to 40  $\mu$ L cellulase enzyme (endoglucanase) and 1 mL of citrate buffer. Also, it was observed that yield nanocrystals decrease with increasing time required for the hydrolysis.

**Keywords:** Bacterial cellulose. Enzymatic hydrolysis. Cellulase. Cellulose nanocrystals.

## 1 Introdução

Nos dias atuais, é crescente a procura por materiais de fontes renováveis para o desenvolvimento sustentável. Atualmente, as pesquisas científicas e tecnológicas no campo da celulose, com melhores propriedades e funcionalidades, tem sido crescente, em resposta à importância global de recursos renováveis e materiais ambientalmente compatíveis.

### 1.1 Celulose

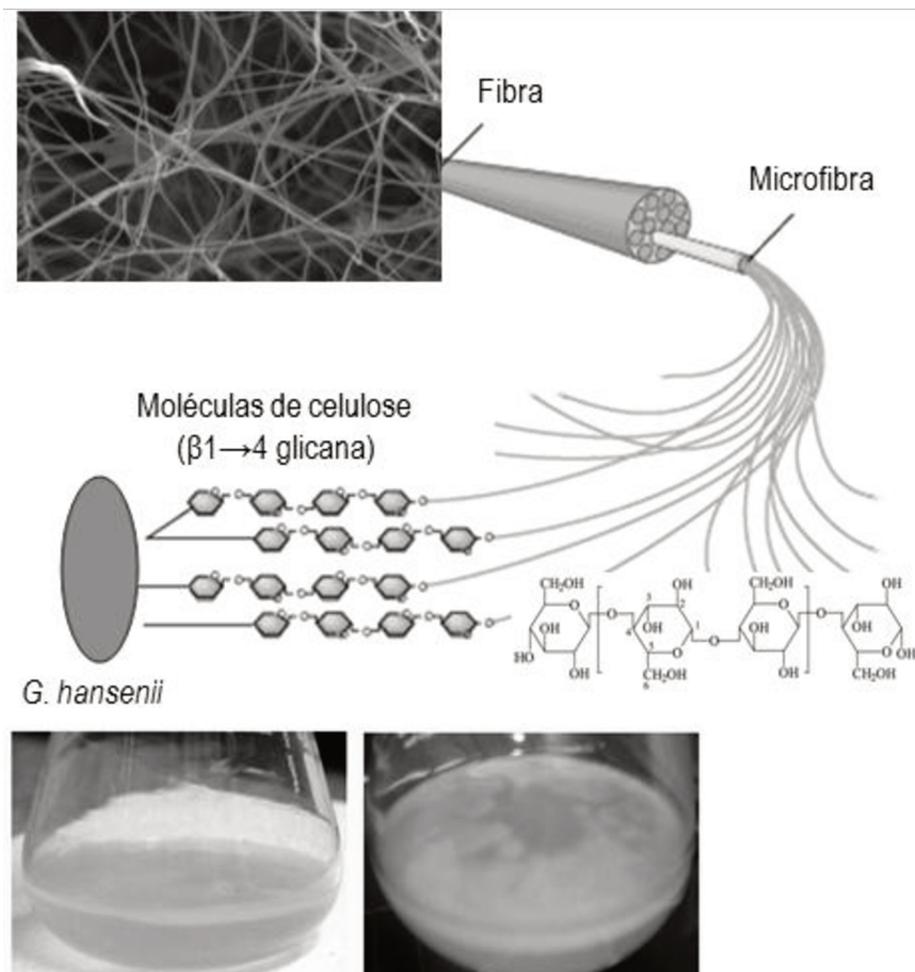
Exopolissacarídeos são polissacarídeos extracelulares por estarem localizados externamente à parede das células, isto é, eles foram sintetizados e excretados ao exterior das células. A celulose ( $C_6H_{11}O_5$ ) é o exopolissacarídeo mais abundante da Terra, com uma estrutura organizada. Ela é sintetizada por diversos organismos vivos, tais como plantas, animais marinhos (tunicados), algas e bactérias (KLEMM et al, 2005).

#### 1.1.1 Celulose bacteriana

A celulose bacteriana (CB) encontra diversas aplicações em diferentes ramos de atividades, como, por exemplo, na engenharia (acústica, ótica), e nas indústrias alimentícia, farmacêutica, têxtil e biomédica (KLEMM et al., 2009). A celulose bacteriana possui a mesma estrutura química da celulose vegetal. Embora a celulose vegetal seja um polímero amplamente utilizado industrialmente, possui a desvantagem de estar associada a compostos como lignina, hemicelulose e pectina que necessitam de tratamentos altamente poluentes para sua utilização. Já a celulose bacteriana é produzida livre destes compostos, o que demonstra o grande potencial econômico deste biopolímero (KESHK, 2014).

A CB é produzida por várias espécies de bactérias. As mais importantes são as bactérias acéticas, gram-negativas, estritamente aeróbias e não patogênicas do gênero *Gluconacetobacter*. Elas produzem celulose pura na forma de um hidrogel, depositada na superfície do meio de cultura, quando cultivadas em culturas estáticas a partir de diversas fontes de carbono (Figura 1) (KLEMM et al., 2006; RECOUVREUX, 2008).

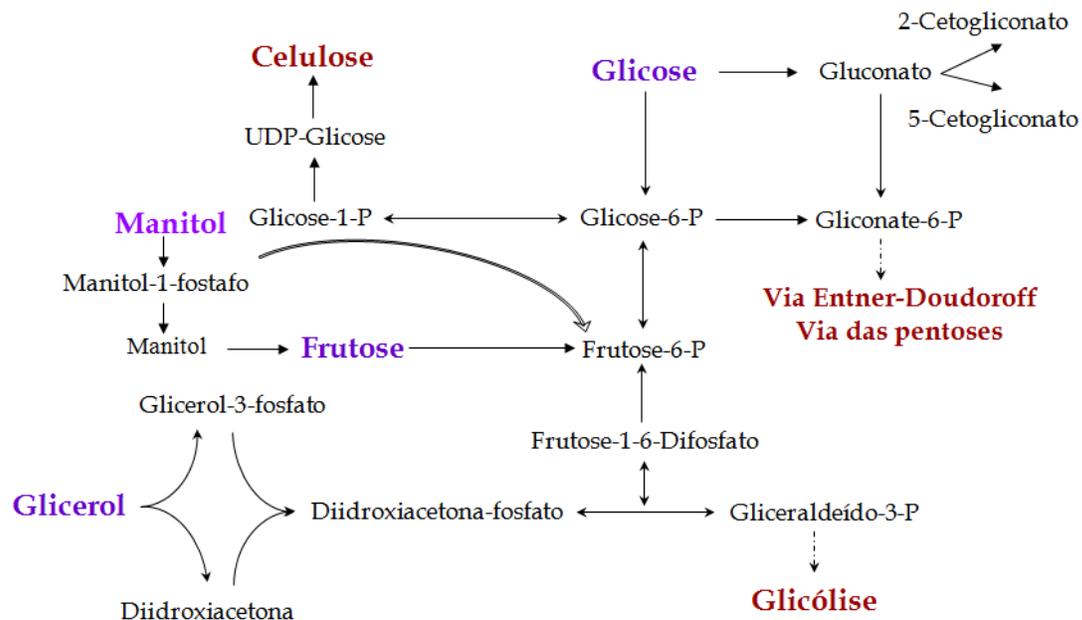
Figura 1- Representação esquemática da produção de celulose por bactérias.



Fonte: Adaptado de RECOUVREUX, 2008.

A Figura 2 mostra a via de biossíntese de celulose por *G. xylinus*, conforme proposta por ROSS et al., 1991 e adaptada por RECOUVREUX, 2004. Nesta via, a biossíntese de CB envolve a conversão da glicose à celulose. Em resumo, primeiramente a glicose é fosforilada para glicose-6-fosfato (G6P) pela enzima glicocinase com a participação de uma molécula de adenosina trifosfato (ATP) e liberação de uma molécula de adenosina difosfato (ADP); a segunda reação envolve a conversão da G6P à glicose-1-fosfato (G1P) pela enzima fosfoglicomutase; na sequência a G1P, através de uma reação de isomerização catalisada pela enzima UDP-glicose-pirofosforilase é convertida em uridina difosfato glicose (UDP-glicose), utilizando uma molécula de uridina trifosfato (UTP) e liberando uma molécula de pirofosfato (PPi). A molécula de UDP-glicose formada é a precursora da biossíntese da celulose.

Figura 2 - Via de biossíntese da celulose em *Gluconacetobacter xylinus* a partir da glicose como fonte de carbono.

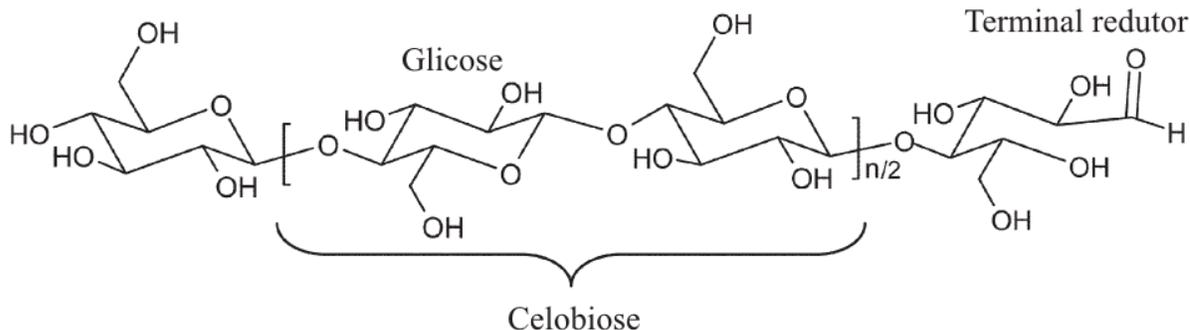


Fonte: Adaptado de RECOUVREUX, 2004.

## 1.2 Estrutura Molecular da Celulose

A celulose é um homopolissacarídeo formado por cadeias lineares não ramificadas de unidades de  $\beta$ -D-glicopiranosose unidas por ligações glicosídicas  $\beta(1\rightarrow4)$ , em que as unidades monoméricas estão dispostas de maneira que uma molécula de glicose esteja rotacionada  $180^\circ$  em relação a outra, sendo a unidade estrutural de repetição o dímero denominado de celobiose (Figura 3) (MOHITE; PATIL, 2014). Na natureza, as cadeias de celulose têm um grau de polimerização (DP) de cerca de 10.000 unidades de glicopiranosose em celulose de madeira e 15.000 em celulose de algodão nativo. A cadeia de celulose tem um formato cabeça-calda, em uma extremidade possui uma estrutura de anel fechado e em outra um terminal redutor.

Figura 3 - Estrutura molecular da celulose (cadeia  $\beta$ -D-glicopirranose).

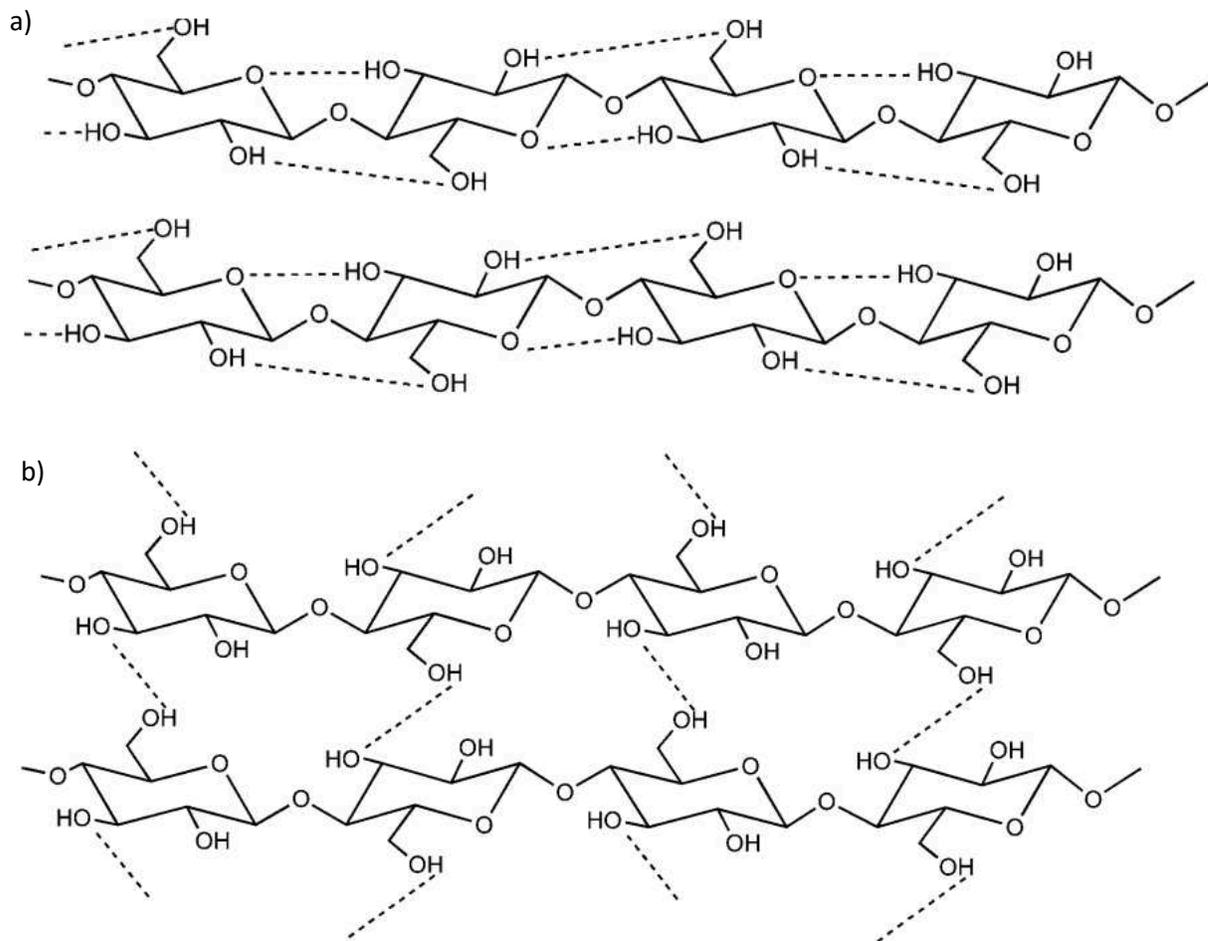


Fonte: Adaptado de KONTTURI et al., 2006.

As moléculas de celulose combinam-se para formar microfibrilas, cada uma consistindo de várias cadeias de celulose, que por sua vez se encontram orientadas paralelamente, e cuja conformação e posicionamento permite a formação de ligações de hidrogênio intermolecular (entre unidades de glicose de moléculas de celulose adjacentes) e intramolecular (entre unidades de glicose da mesma molécula de celulose) (MOHITE e PATIL, 2014). A Figura 4 apresenta a estrutura da cadeia  $\beta$ -D-glicopirranose denominada de celulose e as ligações de hidrogênio intramolecular e intermolecular.

Esta característica organizacional faz com que a fibra de celulose tenha um comportamento anisotrópico, ou seja, mais resistente na direção longitudinal do que na direção perpendicular (DIDDENS et al., 2008). A complexa rede de ligações de hidrogênio intra e intermolecular e as interações de Van der Waal, ligações de hidrogênio, estabilizam as cadeias e microfibrilas, tornando-as insolúveis em água e na maioria dos solventes orgânicos convencionais. A celulose é resistente a álcalis fortes, mas é facilmente hidrolisada por ácidos e é relativamente resistente a agentes oxidantes (KLEMM et al., 2005).

Figura 4 - Ligações inter e intramolecular nas cadeias de celulose. Em (a) ligações intramoleculares e em (b) ligações intermoleculares.



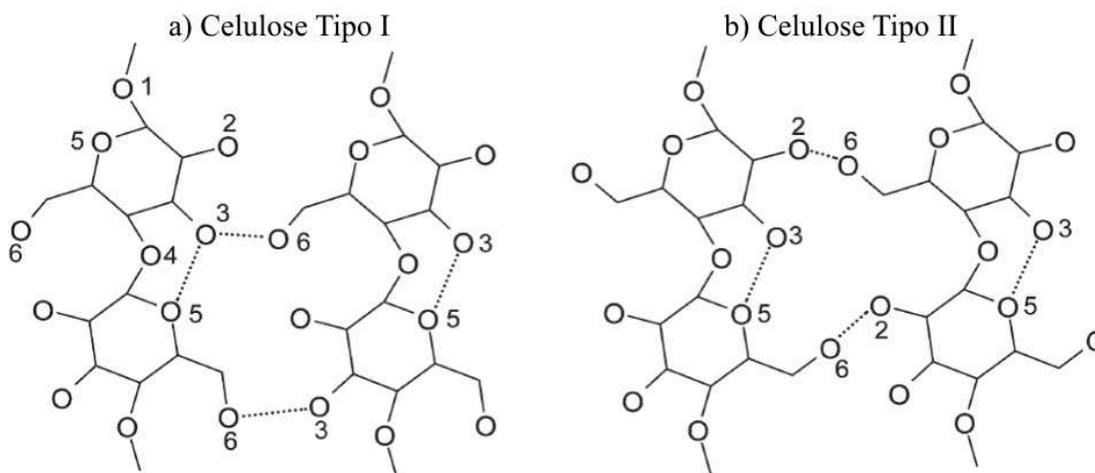
Fonte: ROY, 2009.

A celulose é composta por regiões amorfas e cristalinas e, dependendo do tratamento e da fonte da celulose, o seu grau de cristalinidade varia. As formas cristalinas mais comuns são celuloses do tipo I e do tipo II. A celulose natural é conhecida como celulose tipo I (celulose nativa). Podem ocorrer variações na estrutura cristalina, chamadas de polimorfismos, que são denominadas de celulose tipo II, celulose tipo III e celulose tipo IV (

Figura 5) (KLEMM et al., 2005). A celulose I, que é sintetizada por plantas e também por bactérias do gênero *Gluconacetobacter*, em cultura estática, possui as cadeias  $\beta$ -D-glicopirranose paralelas e dispostas uniaxialmente; já na celulose tipo II, as



Figura 6 - Esquema do polimorfismo da celulose.

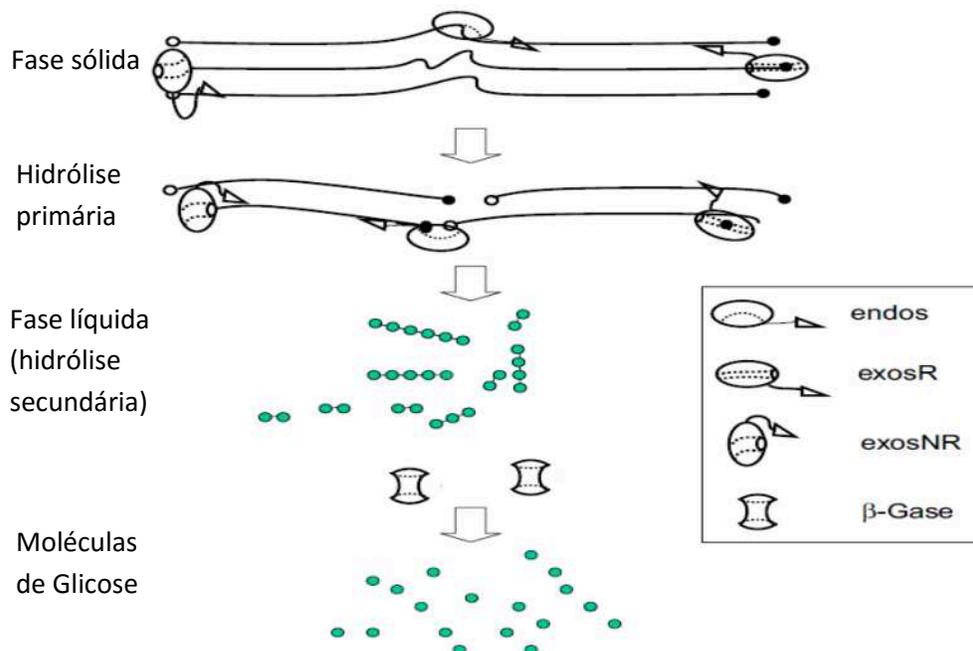


Fonte: KONTTURI et al., 2006.

### 1.3 Enzimas celulases

Enzimas são moléculas que possuem a capacidade de aumentar a velocidade de reações químicas. Celulases são enzimas responsáveis pela quebra das ligações glicosídicas da cadeia de celulose. Três enzimas fazem parte deste grupo e atuam em sinergia de acordo com o local de atuação, gerando novas moléculas. Assim, a mistura de enzimas é a composição que apresenta um melhor rendimento quanto a liberação de açúcares fermentescíveis, como a glicose (CARVALHO, 2011). As celulases são denominadas de endoglucanases, exoglucanases (divididas em celobiohidrolases tipo I e II) e  $\beta$ -glicosidases. As endoglucanases atuam na região amorfa (região interna desorganizada) da fibra de celulose, gerando novos terminais e liberando compostos menores formados por poucas unidades de glicose (oligossacarídeos). As celobiohidrolases são exoglucanases que atuam nas extremidades das fibras de celulose e liberam unidades de celobiose. A celobiohidrolase tipo I hidrolisa os terminais redutores e a tipo II hidrolisa os terminais não redutores da celulose. As  $\beta$ -glicosidases liberam glicoses (livres) a partir da celobiose (OGEDA e PETRI, 2010; CASTRO e PEREIRA, 2010; CARVALHO, 2011). A Figura 7 apresenta um esquema representativo de atuação das enzimas celulases.

Figura 7 - Representação esquemática da atuação das enzimas celulases em fibras celulósicas: endoglucanases (endos), exoglucanases (celohidrolases) de terminais redutores (exosR), exoglucanases (celohidrolases) de terminais não redutores (exosNR) e  $\beta$ -glucosidases ( $\beta$ -Gase).



Fonte: Adaptado de ZHANG et al., 2006, com permissão.

As celulases produzidas por fungos dominam atualmente as aplicações industriais com celulases (CARVALHO, 2011). Os fungos *Trichoderma reesei* e *Aspergillus niger* são os micro-organismos produtores de celulases mais estudados e comercialmente viáveis. O *T. reesei* possui a capacidade de produzir grandes quantidades de endoglucanases e exoglucanases e quantidades menores de  $\beta$ -glicosidase. O fungo *A. niger* é um eficiente produtor de  $\beta$ -glicosidase (MAEDA et al., 2011).

### 1.3 Nanocristais de celulose

Vários tipos de materiais celulósicos, em escala nano, são conhecidos, tais como nanofibras, nanocristais e nanocelulose bacteriana (KLEMM et al, 2009).

Nanopartículas de celulose, incluindo nanofibras e nanocristais, podem ser obtidas a partir da hidrólise ácida ou enzimática da celulose (KLEMM et al, 2005). Estas nanopartículas possuem uma grande área superficial, elevada razão de aspecto, baixo custo, leveza, abundância, biocompatibilidade, e biodegradabilidade na natureza, além de

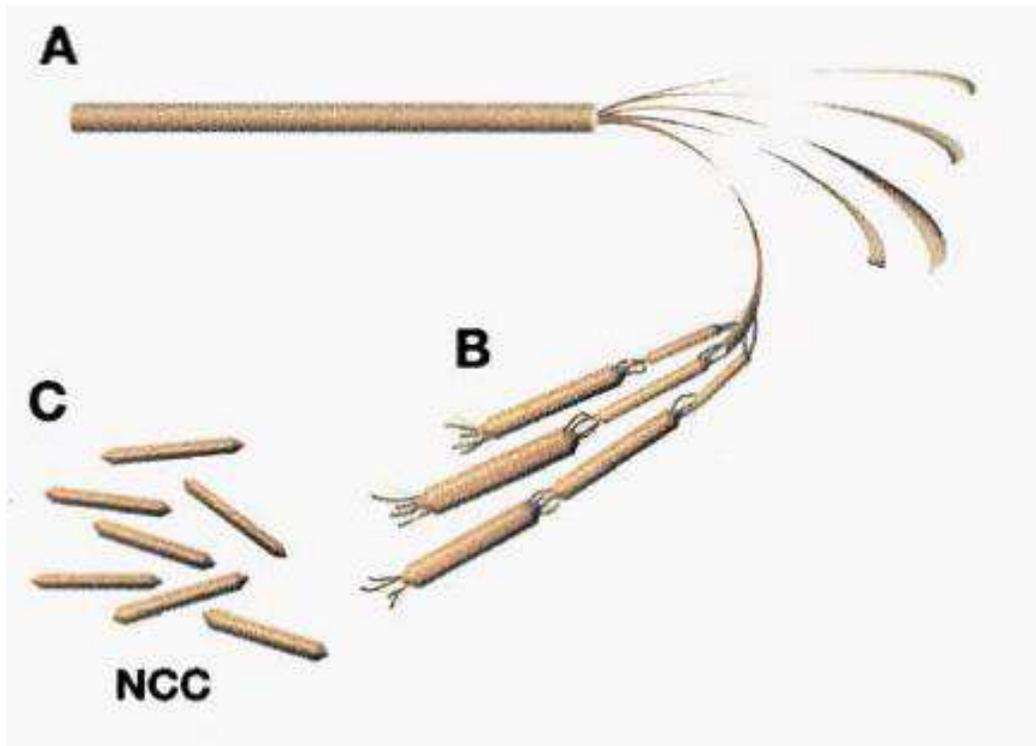
ser renovável. Por estas características e propriedades especiais, nanocristais de celulose e nanofibras de celulose recentemente receberam uma atenção considerável, devido ao promissor potencial para o preparo de vários tipos de nanomateriais multifuncionais em várias áreas de aplicação, como, por exemplo, em materiais compósitos de engenharia e biomédicos (LI et al., 2015; XU et al., 2013; YU et al. 2014).

Nanocristais de celulose, também conhecidos como whiskers, constituem-se de domínios cristalinos, isolados por meio de hidrólise de fibras de celulose. Estas nanopartículas são assim denominadas devido a suas características físicas de rigidez, de espessura e de comprimento.

Através do controle das condições da hidrólise, é possível obter nanocristais de celulose. O processo baseia-se em diferentes velocidades de ataque às frações amorfas (desorganizadas) da celulose em relação ao ataque às frações cristalinas (organizadas). Isso permite a obtenção de cristais individuais, pois somente a fração cristalina é preservada (Figura 8). As dimensões e morfologia dos nanocristais dependem do tratamento térmico, químico e enzimático que a celulose for submetida (ABITBOL, 2011).

Os métodos tradicionais de produção de nanocristais de celulose utilizam produtos químicos ou processos mecânicos, ambos energeticamente caros. O método enzimático (celulases) de produção de nanocristais de celulose é um método alternativo, menos dispendioso, sem a necessidade de produtos químicos, requerendo muito menos energia para o desfibramento mecânico e aquecimento. Além disso, as enzimas que degradam seletivamente as regiões amorfas das fibras de celulose, e não digerem significativamente as áreas cristalinas, resultam em nanocristais de celulose que preservam a superfície química de grupos hidroxilas. Desta maneira, permite a funcionalização desejada para produtos futuros (ANDERSON et al., 2014).

Figura 8 - (A) Representação esquemática de microfibrilas de celulose compostas por várias fibrilas elementares; (B) fibrilas elementares que consistem em fios individuais de celulose formando regiões cristalinas e regiões amorfas, formando celulose microfibrilada; (C) hidrólise que ocorre preferencialmente nas regiões amorfas, produzindo nanocristais de celulose (NCC).



Fonte: Adaptado de ANDERSON et al., 2014.

As características estruturais da fibra de celulose desempenham um papel predominante para realizar a clivagem enzimática. A elevada cristalinidade da celulose pode interferir no processo, por dificultar o acesso das enzimas as nanofibras, uma vez que a quebra da cadeia é realizada na região amorfa. Neste sentido, este estudo teve como objetivo principal avaliar a obtenção de nanocristais de celulose a partir da hidrólise enzimática de celulose bacteriana na forma de hidrogel natural. Foi também investigado o rendimento de nanocristais em função da massa de celulose bacteriana, mantendo-se a quantidade de enzima constante.

## 2 Objetivos

O objetivo deste trabalho foi isolar nanocristais de celulose a partir da hidrólise enzimática de celulose bacteriana produzida pela bactéria *Gluconacetobacter hansenii* ATCC 23769, utilizando glicerol como fonte de carbono. Foi também determinado o rendimento de nanocristais de celulose em função da massa de celulose hidrogel, mantendo constante a quantidade de enzimas.

### 2.1 Objetivos específicos

- a) Produzir celulose bacteriana a partir da bactéria *G. hansenii* utilizando glicerol como fonte de carbono;
- b) Obter nanocristais de celulose bacteriana realizando a hidrólise enzimática do biopolímero produzido em agitador orbital;
- c) Investigar o rendimento de nanocristais em função da massa de hidrogel de celulose mantendo constante a quantidade de enzimas;
- d) Caracterizar os nanocristais isolados utilizando microscopia eletrônica de transmissão.

## 3 Materiais e Métodos

Para a realização do experimento, primeiramente foi realizada a produção das membranas, que seriam hidrolisadas. Após o cultivo, as membranas foram tratadas e as cadeias celulósicas foram quebradas utilizando as enzimas. O material resultante da hidrólise foi analisado em relação ao rendimento e as suas características morfológicas. A seguir é apresentado com detalhes os métodos experimentais utilizados.

### 3.1 Micro-organismo e Inóculo

A bactéria *Gluconacetobacter hansenii*, ATCC 23769, utilizada neste estudo, foi obtida da Coleção de Culturas Tropicais (CCT) - Fundação André Tosello.

O inóculo foi preparado utilizando-se 5% (v/v) de inóculo obtido de uma cultura estoque, em meio de cultivo contendo  $3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de peptona,  $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de extrato de levedura e  $25 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de manitol.

### **3.2 Produção de Celulose Bacteriana**

Para a produção de celulose utilizou-se como composição do meio de cultivo  $20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de glicerol,  $3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de peptona e  $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de extrato de levedura. Todos os meios foram preparados dissolvendo os ingredientes em água destilada e autoclavados a  $121^\circ\text{C}$  por 20 minutos.

O cultivo foi realizado em frasco de Erlenmeyer de 125 ml contendo 40 ml de meio de cultivo e 10% (v/v) de inóculo. Os ensaios foram mantidos a  $30^\circ\text{C}$ , em incubadora DBO, por 10 dias.

Após este período, o material gelatinoso sobrenadantes foi coletado, lavado em água e submetido à purificação em uma solução de NaOH 0,1 M, à  $60^\circ\text{C}$  por 24 horas, para eliminar resíduos de células e contaminantes do meio de cultivo. Na sequência, as amostras foram lavadas com água até atingirem o pH neutro e armazenadas em água destilada, no refrigerador, para o estudo de hidrólise enzimática.

### **3.3 Hidrólise Enzimática**

A fim de se obter nanocristais de celulose bacteriana foi realizada a hidrólise enzimática de membranas de CB, através do método descrito por Recouvreux (2004), com algumas modificações. Para tal, as membranas foram primeiramente desfibriladas mecanicamente, sendo na sequência realizado o procedimento de hidrólise. Para a hidrólise, amostras de hidrogel de celulose bacteriana (de 1g a 10g de CB) foram adicionados em uma solução contendo  $40 \mu\text{L}$  de celulase (Celluclast 1.5 L – Novozymes) e 1 mL de tampão citrato de sódio (50 mM, pH 4,5). As amostras foram incubadas em agitador orbital a  $50^\circ\text{C}$  e 150 rpm. O experimento foi realizado em triplicata.

Assim que se observou a formação de uma suspensão coloidal (aspecto visual da hidrólise do hidrogel), as amostras foram centrifugadas (5000 rpm, 5 min). O sobrenadante foi descartado e a massa úmida do precipitado foi determinada por gravimetria, sendo o tempo de hidrólise registrado.

Para a determinação do rendimento do material hidrolisado foram utilizados os seguintes procedimentos: a massa de celulose hidrogel e a massa de celulose hidrolisada, das amostras em triplicata, foram determinadas usando balança analítica. Calculou-se a média aritmética da massa das amostras, obtendo-se então a média da massa de celulose hidrogel e a média da massa de celulose hidrolisada para cada amostra. Foi calculado também a média aritmética do tempo de hidrólise das amostras. O cálculo do rendimento das amostras foram obtidos de acordo com a equação 1.

$$\text{Rendimento da amostra} = \frac{\text{média da massa de celulose hidrogel}}{\text{média da massa de celulose hidrolisada}} \times 100 \quad [1]$$

### 3. 4 Microscopia Eletrônica de Varredura

A microestrutura das amostras foi caracterizada por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) (Philips, XL-30). Para as observações no MEV, amostras secas por liofilização (congelamento e vácuo) foram colocadas sobre um suporte de alumínio e a superfície foi recoberta com uma camada de ouro de 30 nm, utilizando um metalizador Leica EM SCD 500. As observações foram realizadas em um microscópio da marca JEOL modelo JSM-6390 LV. Os elétrons foram acelerados com uma tensão de 10kV.

### 3. 5 Microscopia Eletrônica de Transmissão

Para observações por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET), gotas de suspensões de nanocristais de celulose bacteriana com concentração de 0,05% foram colocadas em grades MET e deixadas evaporar para observação. As imagens foram obtidas usando Microscópio Eletrônico de Transmissão (JEOL JEM-2100, Japão), operado a uma voltagem de aceleração de 80 kV.

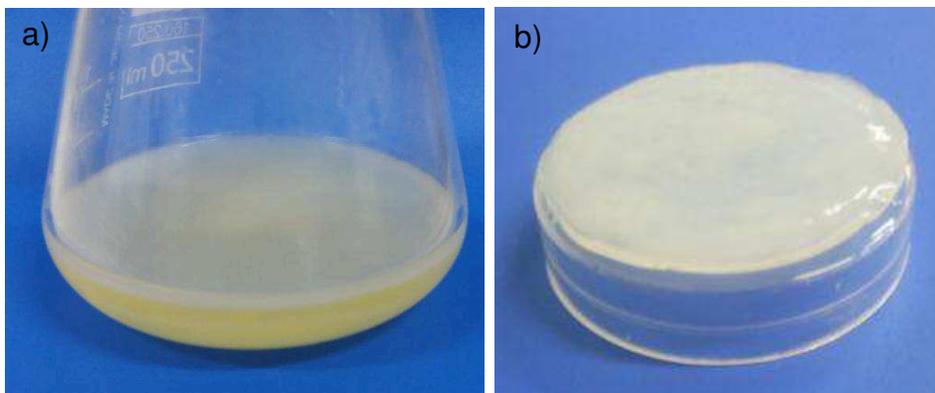
## 4 Resultados

Membranas de celulose bacteriana a partir do cultivo da bactéria *Gluconacetobacter hansenii* ATCC 23769, utilizando como fonte de carbono o glicerol foram produzidas. As membranas de CB previamente purificadas foram trituradas com o objetivo de facilitar a atividade das enzimas celulasas de *Trichoderma reesei* (endo-glucanases). A utilização de glicerol como fonte de carbono para crescimento e produção

de membranas de CB, utilizando a bactéria *G. hansenii*, mostrou um eficiente aumento no crescimento celular para as condições de temperatura de 30°C e 10 dias de cultivo.

Na Figura 9 são apresentadas imagens do cultivo de membranas de celulose bacteriana (a) e das membranas de hidrogel de celulose bacteriana obtidas após o processo de purificação (b). Como pode ser observado, as membranas de CB apresentam muita água, conforme mostra o aspecto gelatinoso que apresenta na forma de hidrogel. A celulose bacteriana possui cerca de 99% de sua massa sendo composta por água. Tal característica deve ser considerada na realização da hidrólise, já que pode ser um fator influente no tempo necessário para o processo. A presença de uma maior quantidade de água facilita a ação da enzima, uma vez que a estrutura encontra-se mais acessível.

Figura 9 - Membranas de celulose bacteriana (CB) na forma de (a) cultivo de *Gluconacetobacter hansenii* e produção de CB e (b) hidrogel de CB purificada.

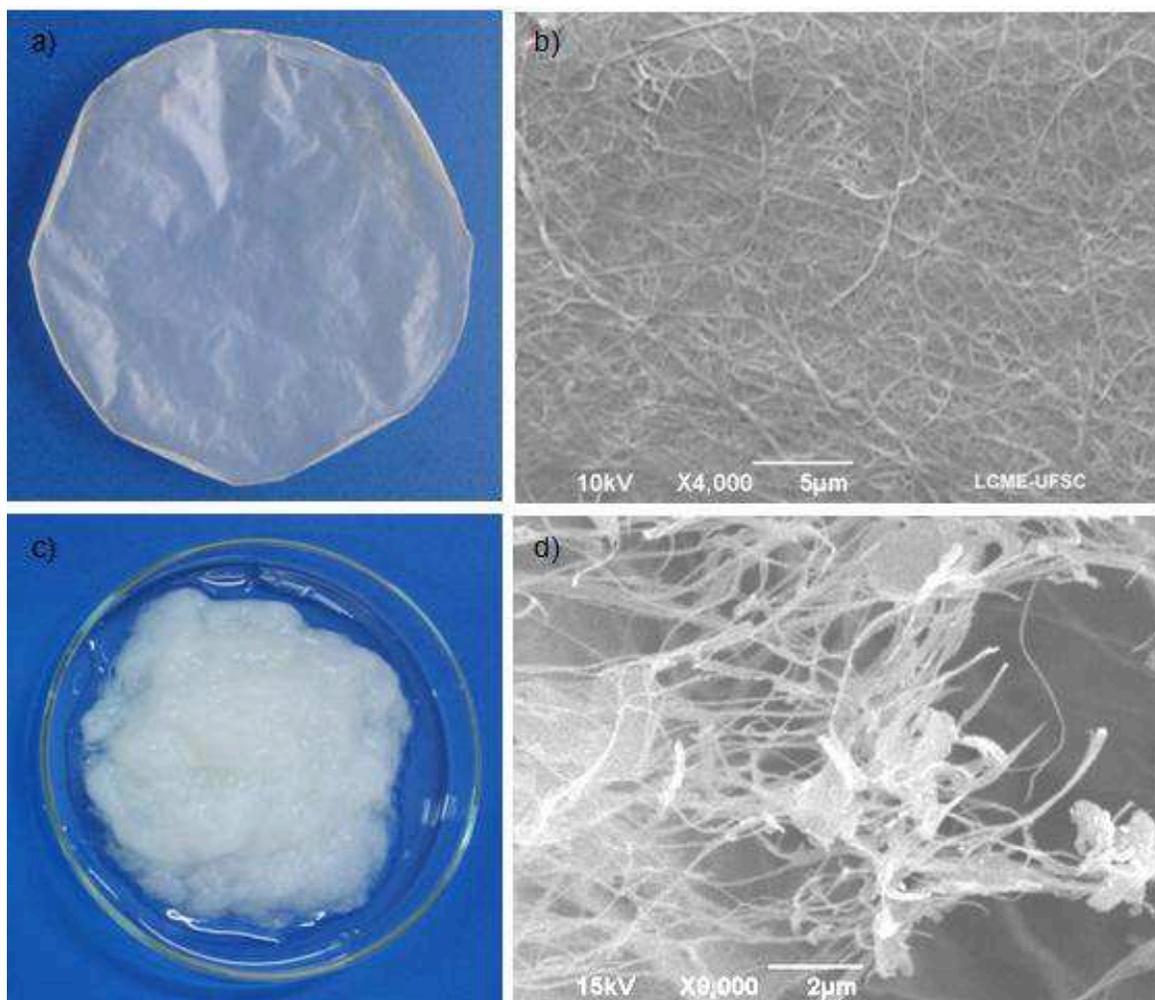


Fonte: Autoria própria.

A Figura 10(a) mostra a membrana de CB seca em estufa a 60°C até massa constante e em uma imagem obtida por MEV na Figura 10(b). Após seca, a membrana de celulose adquire um aspecto quase transparente, já que aproximadamente 99% da massa que era água evapora. A partir do MEV observa-se o crescimento e entrelaçamento das nanofibras de celulose, as quais possuem alta razão de aspecto. (comprimento/diâmetro). A razão de aspecto da celulose bacteriana é aproximadamente 50 (KLEMM et al, 2005). Tal característica torna a fibra de celulose um ótimo material para reforço.

Na Figura(c) mostra-se membranas de celulose bacteriana desfibrilada mecanicamente, como pré-tratamento para o processo de hidrólise enzimática, e na Figura(d) observa-se uma imagem do MEV da nanoestrutura de CB na forma desfibrilada obtida após o tratamento mecânico e seca por liofilização. A desfibrilização das membranas de celulose foi realizada com o intuito de diminuir o tamanho das partículas, aumentando a área de contato da enzima com a fibra, possibilitando que a hidrólise ocorra em menor tempo. Após a desfibrilização mecânica, é possível observar no MEV a segregação das nanofibras de celulose bacteriana.

Figura 10 - Celulose bacteriana (CB) na forma de (a) membrana de CB seca em estufa. (b) Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) da membrana de CB seca em estufa. (c) CB hidrogel desfibrilada. (d) Imagem de MEV de CB hidrogel desfibrilada e liofilizada.

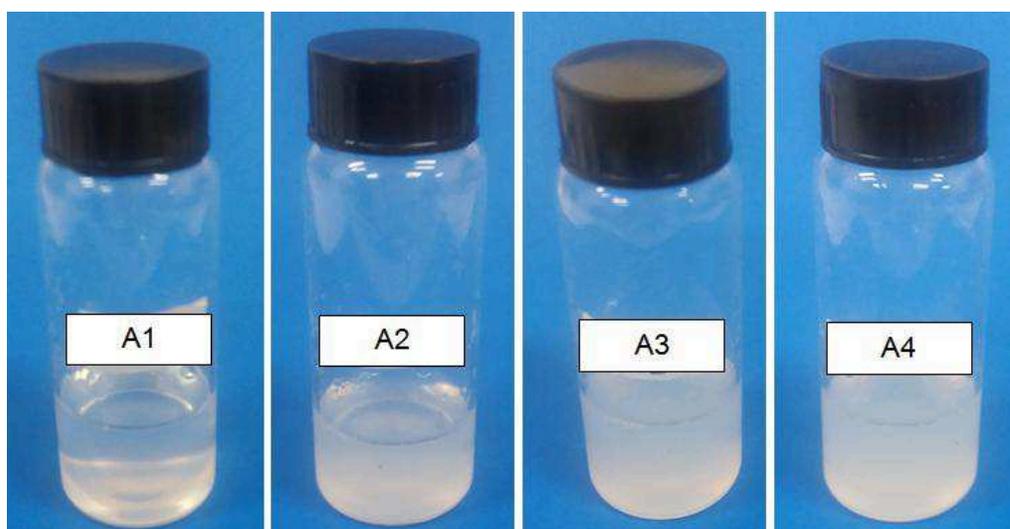


Fonte: Autoria própria.

A celulase é uma enzima que pode hidrolisar as cadeias de celulose em pequenos fragmentos, oligossacarídeos, celobiose ou glicose, dependendo de vários parâmetros e do tipo de enzima utilizada. O processo se inicia com a quebra randômica de regiões amorfas de longas microfibrilas de celulose dando origem a várias frações de produtos da hidrólise. As regiões cristalinas de celulose são mais resistentes a hidrólise enzimática devido à forte ligação de hidrogênio existente entre as cadeias, em comparação com as regiões amorfas menos compactas e com menos ligação de hidrogênio (KONTTURI et al., 2006). Esta capacidade das endoglucanases de hidrolisar as regiões amorfas pode ser utilizada para a obtenção de nanocristais de celulose com propriedades desejáveis. O processo enzimático é preferido ao invés do processo de hidrólise ácida convencional, por não gerar produtos tóxicos.

A Figura 11 mostra suspensões de hidrolisados de CB obtidas após o processo de hidrólise enzimática, o que sugere a presença de nanocristais. Em A1 utilizou-se 1 g de CB hidrogel para  $40 \mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ ; em A2 utilizou-se 2 g de CB hidrogel para  $40 \mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ ; em A3 utilizou-se 3 g de CB hidrogel para  $40 \mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$  e em A4 utilizou-se 4 g de CB hidrogel para  $40 \mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Pode-se observar que com o aumento da massa de CB hidrogel hidrolisada ocorreu um aumento na opacidade das suspensões. No entanto, se considerarmos o rendimento de hidrolisado obtido, em A4 foi menor que em A1, conforme pode-se observar na Tabela 1.

Figura 11 - Suspensões de hidrolisados de celulose bacteriana obtidos de amostras com 1 g, 2 g, 3 g e 4 g de celulose hidrogel desfibrilada.



Fonte: Autoria própria.

Na Tabela 1 é apresentado a média da massa de celulose hidrogel e o seu desvio padrão, a média da massa de celulose hidrolisada e seu desvio padrão, o rendimento por amostra, calculado de acordo com a equação 1, e o tempo médio para a realização da hidrólise.

Nos rendimentos de nanocristais de celulose bacteriana, que são mostrados na Tabela 1 e ilustrados no gráfico mostrado na Figura 12, observa-se que se mantendo constante a quantidade de enzimas e aumentando a massa de CB hidrogel não se obteve melhores rendimentos. Isto pode ser explicado pelo fato de que para hidrolisar por completo a massa de CB foi necessário maior tempo de exposição da celulose com as enzimas e que com isso pode ter ocorrido maior quantidade de compostos menores como, dissacarídeos, trissacarídeos e oligossacarídeos de menor massa molecular e solúveis.

Tabela 1- Resultados do processo de hidrólise de celulose bacteriana

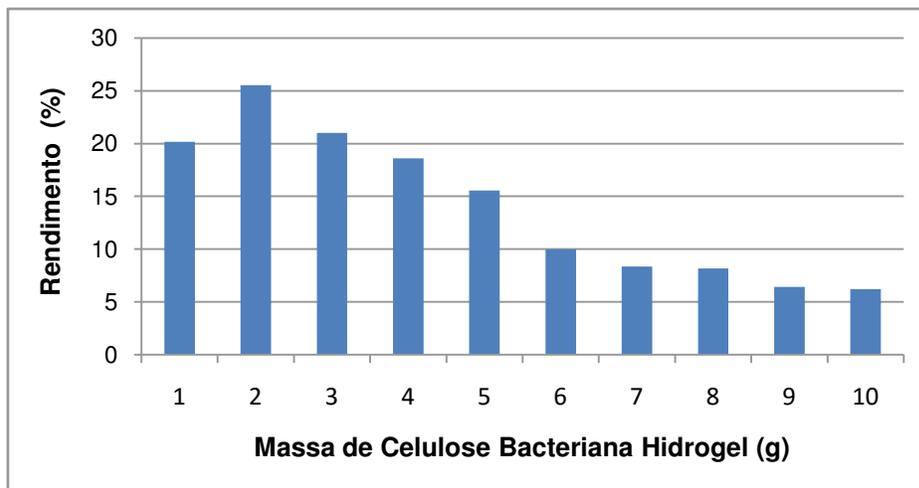
<b>Amostra (g de CB)</b>	<b>Média massa hidrogel CB (g)</b>	<b>Desvio padrão*</b>	<b>Média massa de celulose hidrolisada (g)</b>	<b>Desvio padrão*</b>	<b>Rendimento (%)</b>	<b>Média Tempo (min)</b>
<b>1</b>	1,1336	0,04	0,2288	0,05	20,1811	60
<b>2</b>	2,0921	0,03	0,5345	0,10	25,5497	120
<b>3</b>	3,0370	0,02	0,6379	0,03	21,0032	343
<b>4</b>	4,1949	0,08	0,7799	0,04	18,5907	400
<b>5</b>	5,0956	0,04	0,7920	0,07	15,5434	520
<b>6</b>	6,1449	0,01	0,6127	0,13	9,9708	1300
<b>7</b>	7,0572	0,05	0,5902	0,24	8,3626	1340
<b>8</b>	8,1747	0,12	0,6684	0,18	8,1760	1400
<b>9</b>	9,1455	0,08	0,7095	0,24	7,7576	1440
<b>10</b>	10,2032	0,11	0,5486	0,04	5,3767	1500

Fonte: Autoria própria.

Podemos observar na Tabela 1 que ocorreu um aumento de aproximadamente 5% no rendimento de hidrolisado quando se utilizou 2 g de massa de celulose hidrogel em relação a 1 g da mesma. Quando se utilizou 2 g de celulose úmida atingiu-se o rendimento de 25,55%, sendo este o maior rendimento alcançado em apenas 120 minutos de hidrólise. Com o aumento da massa de hidrogel de celulose, o rendimento

diminui e o tempo de hidrólise aumenta, atingindo menor rendimento quando utilizado 10 g de celulose hidrogel, sendo necessários 1500 minutos para realização deste processo.

Figura 12 - Rendimento de hidrolisados de celulose bacteriana.



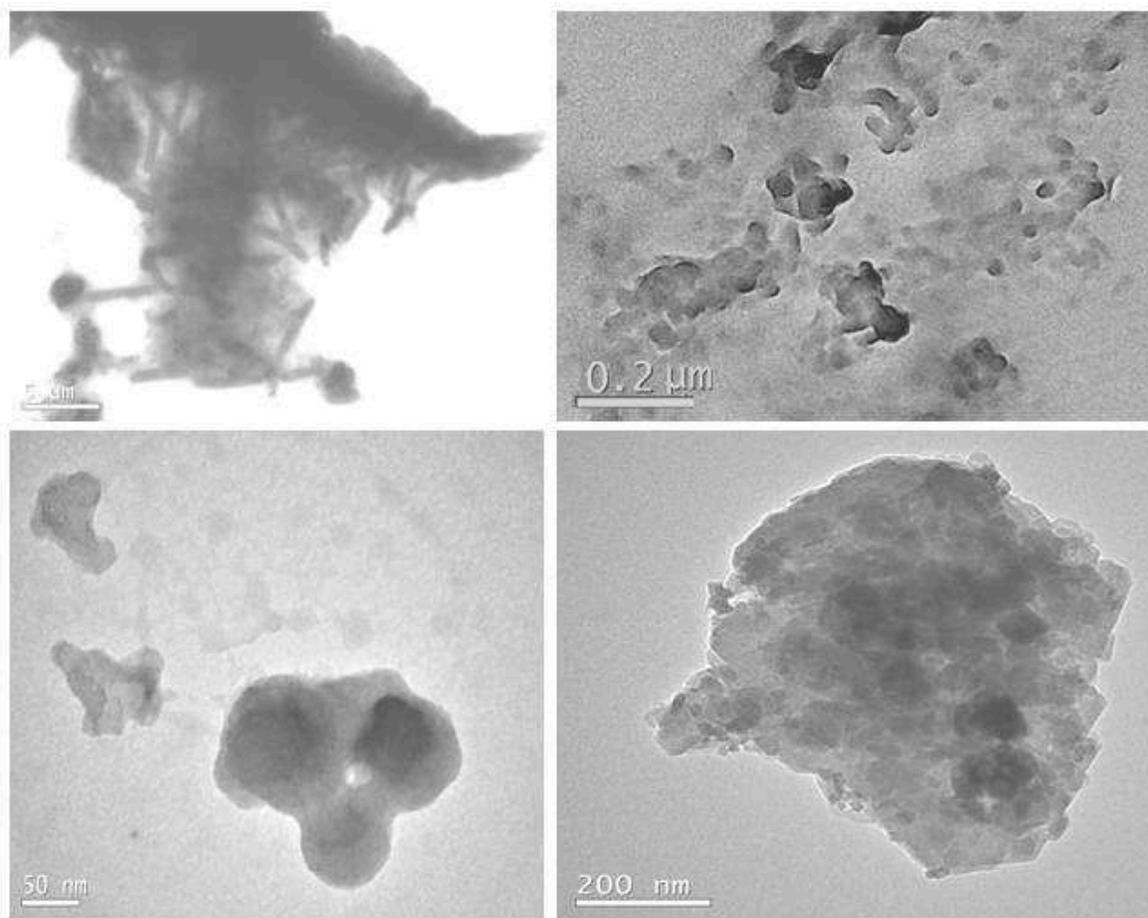
Fonte: Autoria própria.

A celulose bacteriana é constituída de uma estrutura de celulose altamente cristalina, e conseqüentemente, a presença de muitas ligações de hidrogênio entre as fibras da celulose, o que pode dificultar a hidrólise enzimática, por dificultar o acesso às enzimas, tornando o processo mais lento. Por essa razão, o rendimento de nanocristais, quando utilizou-se 1 g de hidrogel de celulose, foi inferior ao de quando utilizou-se 2 g de celulose. Para o tempo inferior a 120 minutos, houve dificuldade de realização da hidrólise.

No processo de hidrólise pode ocorrer a hidrólise primária e a hidrólise secundária (Figura 7). Após a hidrólise primária, onde ocorre a quebra das regiões amorfas da celulose bacteriana, ocorre a hidrólise secundária, a qual torna o material hidrolisado em fase líquida. Para a realização da hidrólise secundária é necessário um maior tempo no processo de hidrólise. A queda no rendimento dos hidrolisados ocorreu após 120 minutos. Tal comportamento pode ser explicado pelo aumento no tempo de hidrólise a partir da utilização de 3 g de celulose hidrogel. Podemos inferir que o aumento do tempo para a realização do processo permite que ocorra a hidrólise secundária, e que, após a centrifugação, a fase líquida resultante desta seja descartada juntamente com o material sobrenadante.

A Figura 13 apresenta imagens do MET de CB hidrogel hidrolisada, com um aumento na escala de 5  $\mu\text{m}$ , 0,2  $\mu\text{m}$ , 50 nm e 200 nm. A hidrólise da celulose promove a quebra das cadeias de celulose, em especial nas regiões amorfas, por facilitarem o acesso das enzimas. Assim, as regiões cristalinas, que se encontram mais compactadas, permanecem inalteradas, obtendo-se desta forma nanopartículas, que são os nanocristais. São consideradas nanopartículas se pelo menos uma das dimensões possuem escala entre 1 a 100 nm (MOON et al., 2011).

Figura 13 - Imagens obtida no Microscópio Eletrônico de Transmissão de hidrolisados de celulose, com um aumento na escala de 5  $\mu\text{m}$ , 0,2  $\mu\text{m}$ , 50 nm e 200 nm.



Fonte: Autoria própria.

## 5 Conclusões

A celulose bacteriana foi produzida, utilizando-se o glicerol como fonte de carbono. A celulose bacteriana obtida foi desfibrilada mecanicamente antes de ser submetida ao processo de hidrólise. A hidrólise da celulose foi realizada a partir do método enzimático. O rendimento do hidrolisados foi avaliado. Os melhores rendimentos foram obtidos quando se utilizou até 3 g de CB hidrogel para a mesma quantidade de enzima (celulase). Porém, o tempo de hidrólise aumentou praticamente proporcional a quantidade de massa de CB inicial. As condições ótimas encontradas, para o melhor rendimento foram quando se utilizou 2 g de CB úmida para 40 µL de celulase, obtendo-se 25,55% de rendimento de massa de CB hidrolisada. Os resultados mostraram que as condições de hidrólise permitiram a obtenção de uma suspensão aquosa evidenciando a presença de nanocristais de celulose.

**Agradecimentos:** Este estudo teve o apoio do Conselho Nacional de desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Agradeço também ao Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME-UFSC) pelas análises microscópicas.

## Referências:

- ABITBOL, T. **Preparation and characterization of cellulose-based nanomaterials**. 2011. Tese (Doutorado). Department of Chemistry. McGill University. Montreal, Quebec, Canada.
- ANDERSON, S. R.; ESPOSITO, D.; GILLETTE, W.; ZHU, J.Y.; BAXA, U.; MCNEIL, S. E. Enzymatic preparation of nanocrystalline and microcrystalline cellulose. **Tappi Journal**, v. 13, n. 5, p. 35-42, 2014.
- CARVALHO, M. Lucas de. **Estudo cinético da Hidrólise Enzimática de celulose de bagaço de cana-de-açúcar**. 2011. 103 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2011.
- CASTRO, A. M.; PEREIRA JR, N. Produção, propriedades e aplicação de celulasas na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 181-188, 2010.

DIDDENS, I.; MURPHY, B.; KRISCH, M.; MULLER, M. Anisotropic Elastic Properties of Cellulose Measured Using Inelastic X-ray Scattering. **Macromolecules**, v. 41, n. 24, p. 9755–9759, 2008.

KESHK, S. M. Bacterial Cellulose Production and its Industrial Applications. **Journal of Bioprocessing & Biotechniques**, v. 04, n. 02, p. 1–10, 2014.

KLEMM, D.; HEUBLEIN, B.; FINK, H-P.; BOHM, A. Cellulose: fascinating biopolymer and sustainable raw material. *Angew. Chem.*, vol. 44, pp. 2-37, 2005.

KLEMM, D.; SCHUMANN, D.; KRAMER, F.; HESLER, N.; KOTH, D.; SULTANOVA, B. Nanocellulose materials – different cellulose, different functionality. **Macromol. Symp.**, v. 280, p. 60–71, 2009.

KLEMM, D.; SCHUMANN, D.; KRAMER, F.; HESSLER, N.; HORNING, M.; SCHMAUDER, H-P.; MARSCH, S. Nanocelluloses as innovative polymers in research and application. **Adv. Polym. Sci.**, v. 205, p. 49–96, 2006.

KONTTURI, E.; TAMMELIN, T.; ÖSTERBERG, M. Cellulose models films and the fundamental approach. **Chemical Society Reviews**, v. 35, p. 1287–1304, 2006.

LI, M-C.; WU, Q.; SONG, K.; LEE, S.; QING, Y.; WU, Y. Cellulose Nanoparticles: Structure-Morphology-Rheology Relationships. **ACS Sustainable Chem. Eng.**, v. 3, p. 821–832, 2015.

MAEDA, R. N. et al. Enzymatic hydrolysis of pretreated sugar cane bagasse using *Penicillium funiculosum* and *Trichoderma harzianum* cellulases. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 5, p.1196-1201, maio 2011.

MOHITE, B. V.; PATIL, S. V. A novel biomaterial: Bacterial cellulose and its new era applications. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 61, n. 2, p. 101–110, 2014.

MOON, R. J.; MARTINI, A.; NAIRN, J.; SIMONSEN, J.; YOUNGBLOOD, J. Cellulose nanomaterials review: Structure, properties and nanocomposites. **Chem Soc Rev.**, v.40, p. 3941–3994, 2011.

OGEDA, T. L. E.; PETRI, D. F. S. Hidrólise Enzimática de Biomassa. **Química Nova**, v. 33, n 7, p. 1549-1558, 2010.

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

RECOUVREUX, D. O. S. **Desenvolvimento de novos biomateriais baseados em celulose bacteriana para aplicações biomédicas e de engenharia de tecidos**. 2008. Tese (Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico, Florianópolis, SC.

RECOUVREUX, D. O. S. **Produção de Celulose Bacteriana**: Identificação do Operon bcs e Produção de Biofilme Celulósico por *Chromobacterium violaceum*. 2004. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico, Florianópolis, SC.

ROSS, P.; MAYER, R.; BENZIMAN, M. Cellulose biosynthesis and function in bacteria. **Microbiological Reviews.**, v.55, n.1, p.35-58. 1991.

ROY, D.; SEMSARILAR, M.; GUTHRIE, J. T.; PERRIER, S. Cellulose modification by polymer grafting: a review. **Chem. Soc. Rev.**, v. 38, p. 2046-2064, 2009.

SCHENZEL, K.; FISCHER, S.; BRENDLER, E. New method for determining the degree of cellulose I crystallinity by means of FT Raman spectroscopy. **Cellulose**, v. 12, n. 3, p. 223–231, 2005.

TOKOH, C.; TAKABE, K.; FUJITA, M.; SAIKI, H. Cellulose synthesized by *Acetobacter xylinum* in the presence of acetyl glucomannan. **Cellulose**, v. 5, p. 249–261, 1998.

XU, X.; LIU, F.; JIANG, L.; ZHU, J. Y.; HAAGENSON, D.; WIESENBORN, D. P. Cellulose Nanocrystals vs. Cellulose Nanofibrils: A Comparative Study on Their Microstructures and Effects as Polymer Reinforcing Agents. **ACS Appl. Mater. Interfaces**, v.5, p. 2999–3009, 2013.

ZHANG, Y. H. P.; HIMMEL, M. L. E.; MIELENZ, J. R. Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies. **Biotechnology Advances**, v. 24, p. 452-481, 2006.

YU, H-Y.; QIN, Z-Y.; YAN, C-F.; YAO, J-M. Green Nanocomposites Based on Functionalized Cellulose Nanocrystals: A Study on the Relationship between Interfacial Interaction and Property Enhancement. **ACS Sustainable Chem. Eng.**, v. 2, p. 875–886, 2014.