

Ricardo Brandes

**NANOCOMPÓSITO ESFÉRICO DE CELULOSE BACTERIANA/
DIÓXIDO DE TITÂNIO PARA APLICAÇÕES EM
FOTOCATÁLISE**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia e Ciências Mecânicas da Universidade Federal de Santa Catarina como parte integrante para a obtenção do grau de mestre em Engenharia e Ciências Mecânicas.

Orientadora: Profa. Dra. Derce de Oliveira Souza Recouvreux
Coorientador: Prof. Hazim Ali Al-Qureshi, Ph.D, F.I.Mech.Eng., C.Eng.

Joinville
2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária
da UFSC.

Brandes, Ricardo

Nanocompósito esférico de celulose bacteriana/dióxido de titânio para aplicações em fotocatalise / Ricardo Brandes; orientadora, Derce de Oliveira Souza Recouvreux; coorientador, Hazim Ali Al-Qureshi. - Joinville, SC, 2017. 83 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Joinville. Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciências Mecânicas.

Inclui referências

1. Engenharia e Ciências Mecânicas. 2. Celulose Bacteriana. 3. Dióxido de Titânio. 4. Nanocompósito. 5. Fotocatalise. I. Recouvreux, Derce de Oliveira Souza. II. Al-Qureshi, Hazim Ali. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciências Mecânicas. IV. Título.

Ricardo Brandes

**NANOCOMPÓSITO ESFÉRICO DE CELULOSE BACTERIANA/
DIÓXIDO DE TITÂNIO PARA APLICAÇÕES EM
FOTOCATÁLISE**

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de Mestre em Engenharia e Ciências Mecânica, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciências Mecânicas da Universidade Federal de Santa Catarina.

Joinville, 10 de Abril de 2017.



Prof. Breno Salgado Barra, Dr.
Coordenador do Programa de Pós-graduação
em Engenharia e Ciências Mecânicas

Banca Examinadora



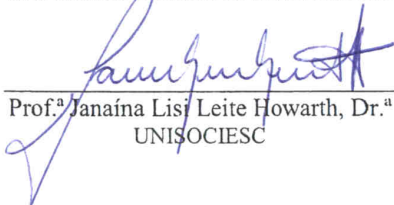
Prof.^a Derce de Oliveira Souza Recouvreux, Dr.^a
Orientadora
Universidade Federal de Santa Catarina



Prof. Claudimir Antonio Carminatti, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina



Prof. Alexandre Mikowski, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina



Prof.^a Janaína Lis Leite Howarth, Dr.^a
UNISOCIESC

Este trabalho é dedicado à minha esposa, mãe, pai, irmãs e aos amigos e colaboradores que estiveram ao meu lado durante esta etapa da minha vida.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Santa Catarina, por disponibilizar a sua estrutura para a realização deste trabalho, assim como, ao programa de pós-graduação em Engenharia e Ciências Mecânicas.

À minha família, especialmente minha esposa Débora Caroline Packer, minha mãe Ana Cristina Brandes e minhas irmãs Júlia Brandes e Vitória Brandes, pelo amor incondicional, todo o apoio e incentivo em todos os momentos.

À minha orientadora, Professora Derce de Oliveira Souza Recouvreux, pela oportunidade, orientação, aprendizado e paciência.

Ao meu coorientador, Professor Hazim Ali Al-Qureshi, por todo apoio, suporte e orientação.

Aos professores Claudimir Carminatti, Alexandre Mikowski e Janaína Lisi Leite Howarth por aceitarem serem membros da banca examinadora.

Às minhas colegas do laboratório Letícia de Souza e Vanessa Mendonça Mendes Vargas pelo incentivo, paciência e contribuição.

Aos técnicos do Laboratório Central de Microscopia Eletrônica - LCME-UFSC, em especial à Eliana de Medeiros Oliveira que sempre me ajudou prontamente e com empenho e dedicação.

À FAPESC, CAPES, CNPq e à UFSC pelo apoio financeiro.

Enfim, a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

“Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos”.
(Isaac Newton)

RESUMO

A celulose bacteriana (CB) é um biopolímero com propriedades interessantes, tais como, biocompatibilidade, alta resistência à tração, alta capacidade de absorção, retenção de água e alta cristalinidade. A celulose é o polímero mais abundante da terra, podendo ser produzida por plantas e por vários microrganismos. Bactérias do gênero *Komagataeibacter*, que foram usadas neste estudo, têm carácter não patogênico e mantêm a capacidade de sintetizar nanofibras de celulose em meio estático e em condições dinâmicas, na qual há uma tendência para a formação de geometrias membranosas e corpos tridimensionais de formas esféricas, respectivamente. Na primeira etapa deste trabalho, o objetivo principal foi avaliar e caracterizar a produção de esferas de CB produzidas com a bactéria *Komagataeibacter hansenii* ATCC 23769, sob cultivo agitado e diferentes condições de operação. Para isto, utilizou-se um planejamento experimental envolvendo as variáveis correspondentes a fonte de carbono, concentração de inóculo, volume do meio de cultura, volume do frasco Erlenmeyer e a velocidade de agitação. Os resultados experimentais mostraram que o rendimento mais elevado de celulose bacteriana na forma de hidrogel foi obtido sob condições em que a fonte de carbono utilizada foi o glicerol, na temperatura controlada de 25 °C e com a velocidade de agitação de 125 rpm. Nanopartículas de dióxido de titânio (TiO₂) são extremamente importantes em aplicações elétricas, fotocatalíticas e biomédicas. Materiais multifuncionais com propriedades diferenciadas, baseados em celulose bacteriana, podem ser concebidos a partir de nanocompósitos de CB/TiO₂ pelo método *ex-situ* de imersão sol-gel. Deste modo, a segunda etapa do trabalho foi composta pela fabricação de nanocompósito constituído de hidrogel CB/TiO₂. As caracterizações foram realizadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV), espectroscopia de energia dispersiva (EDS) e espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR). A análise morfológica do nanocompósito revelou a existência de interação molecular e adesão entre as nanopartículas de TiO₂ e a matriz de nanofibras de celulose, onde a presença de picos de Ti no espectro EDS foram encontrados, provando a incorporação bem sucedida das nanopartículas. O FTIR revelou a modificação dos grupos funcionais, o que sugeriu a interação entre os componentes. Devido ao grande potencial fotocatalítico das nanopartículas de TiO₂ e pela possibilidade de confecção de hidrogéis esféricos de CB, contendo elevada área superficial, a terceira etapa do projeto foi composta pelo

desenvolvimento de nanocompósitos esféricos de CB/TiO₂ confeccionados via imersão sol-gel e via síntese direta de nanopartículas de TiO₂. O objetivo da confecção dos nanocompósitos em duas vias é a comparação de eficiência do efeito fotocatalítico. As caracterizações morfológicas foram realizadas via MEV e a avaliação da atividade fotocatalítica foi conduzida em um reator fotocatalítico de baixa potência (UV-C 15W), por fim, a análise quantitativa foi via a degradação de um corante medida por espectroscopia visível. Como resultado final os materiais alcançaram uma capacidade de remoção do corante de 89,58 e 70,83% através da fotocatalise dos nanocompósitos de CB/TiO₂ confeccionados via a adição das nanopartículas pelos métodos *ex-situ* e *in-situ*, respectivamente. Estes bons resultados possibilitarão a utilização deste material no tratamento de efluentes industriais.

Palavras-chave: Celulose Bacteriana. Dióxido de Titânio. Nanocompósito. Fotocatalise.

ABSTRACT

Bacterial cellulose (BC) is a biopolymer with interesting properties, such as biocompatibility, high tensile strength, high absorption capacity, water retention and high crystallinity. Cellulose is the most abundant polymer of the earth, it can be produced by plants and by various microorganisms. Bacteria of the *Komagataeibacter* genus, which were used in the experiments have non-pathogenic character and hold the ability to synthesize cellulose nanofibers in static medium and in dynamic conditions, where there is a tendency in the formation of membranous geometries and three-dimensional bodies of spherical shapes, respectively. The first step of this work was to evaluate and characterize the production of spherical BC produced with *Komagataeibacter hansenii* ATCC 23769 bacteria under agitated culture and different operating conditions. A design of experiments was used to evaluate the parameters corresponding to a carbon source, inoculum concentration, the volume of the culture medium, the volume of the Erlenmeyer flask and stirring speed. The experimental results showed that the highest yield of bacterial cellulose as hydrogel was obtained with the utilization of glycerol, temperature controlled at 25 °C and agitation speed of 125 rpm. Nanoparticles of titanium dioxide (TiO₂) are extremely important in electrical applications, photocatalysis, sensors and biomedical areas. Multifunctional materials, based on bacterial cellulose, with differentiated properties can be designed from the CB/TiO₂ nanocomposite by ex situ method of sol-gel immersion. It was manufactured as a nanocomposite consisting of CB/TiO₂ hydrogel. The characterizations were carried out by scanning electron microscope (SEM), energy dispersive spectroscopy (EDS) and Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR). The morphological analysis of nanocomposite revealed the existence of molecular interaction and adhesion between TiO₂ nanoparticles and cellulosic nanofibers matrix, where the presence of Ti peaks in EDS spectra was discovered, proving the successful incorporation of nanoparticles. The FTIR showed modification on the functional groups, suggesting an interaction between the components. Due to the large photocatalytic activity of TiO₂ nanoparticles and the possibility to produce spherical hydrogels of BC with high surface area, the third step of the project will consist of the development of spherical nanocomposites BC/TiO₂ prepared by immersion sol-gel and by direct synthesis of TiO₂ nanoparticles. Both nanocomposites will be compared for the photocatalytic effect. Morphological characterizations will be performed through SEM and

the evaluation of the photocatalytic activity will be conducted at a low power photocatalytic reactor (15W UV-C). Finally, the quantitative analysis will be measured by degradation of a dye at visible spectroscopy. As final results materials achieved a dye removal capacity of 89.58 and 70.83% by photocatalysis of the CB/TiO₂ nanocomposites produced by addition of the nanoparticles via *ex-situ* and *in-situ* methods, respectively. These good results will enable the use of this material in the treatment of industrial effluents.

Keywords: Bacterial Cellulose. Titanium Dioxide. Nanocomposite. Photocatalysis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura molecular da celulose bacteriana.	29
Figura 2 – Representação de celulose bacteriana esférica e sua rede de fibras produzida em cultura agitada. Fibra (a), nanofibras (b) e cadeias de moléculas de celulose (c).....	30
Figura 3 – (a) e (b) membranas de CB para a substituição de pele e (c) e (d) celulose esférica formada em cultura agitada.	32
Figura 4 – Estruturas cristalinas do dióxido de titânio: rutilo, anatase e bruquita.	34
Figura 5 – Micrografias de MEV da superfície de nanopartículas de TiO_2 . a) Nano partículas sintetizadas na temperatura de $10\text{ }^\circ\text{C}$ e b) sintetizadas na temperatura de $20\text{ }^\circ\text{C}$	35
Figura 6 – Ilustração de nanocompósito de Celulose e TiO_2	36
Figura 7 – Micrografias de nanopartículas de TiO_2	38
Figura 8 – Ilustração esquemática da reação de fotocatalise de TiO_2	40
Figura 9 – Absorção de água de CB de acordo com parâmetros específicos do processo de produção de CB com formato esférico.	48
Figura 10 – Rendimento de produção das massas secas de CB esférica de acordo com cada variação particular do parâmetro.	49
Figura 11 – Fotografias das amostras de CB produzidas em cultura de agitada de acordo com a Tabela 1.	50
Figura 12 – Micrografias de MEV da amostra 08 de CB esférica produzidas em cultura agitada. (A) corte transversal da amostra onde se visualiza a camada de revestimento exterior e a região interior dos corpos esferoidais. (B) superfície de uma esfera de CB contendo bactérias inseridas na rede de nanocelulose (c) região interna do corpo esférico consistindo de rede porosa de nanofibras de CB. (D) região externa do corpo esférico consistindo de densas redes de nanofibras de CB.	52
Figura 13 – Ilustração esquemática da formação de celulose bacteriana esférica. As fotografias correspondem a diferentes tempos de cultura. Uma variação específica de parâmetros pode ser usada, e produz formas diferentes.	53
Figura 14 – Esquema da formação de nanocompósitos de CB/ TiO_2	58
Figura 15 – Fotografias de hidrogéis de CB. (a) Hidrogéis de CB. (b) Hidrogéis nanocompósitos de CB/ TiO_2	58
Figura 16 – Micrografias de MEV. Em (a) superfície da esfera constituída por uma rede de nanofibras de CB. Em (c) estrutura da região interior da esfera de CB. Em (b) superfície externa da esfera de CB com as nanofibras recobertas com nanopartículas de TiO_2 . Em (d) região interior da esfera de CB recobertas com nanopartículas de TiO_2	60
Figura 17 – Em (a) espectro EDS da estrutura de CB e em (b) do nanocompósito de CB/ TiO_2	61
Figura 18 – Espectro ATR-FTIR da estrutura pura de CB e do nanocompósito CB/ TiO_2	62
Figura 19 – Sistema para a realização dos ensaios de fotocatalise.....	67

Figura 20 – Micrografias de MEV de amostras nanocompósitas de CB/TiO ₂ . As imagens 20 (a e c) representam o nanocompósito confeccionado via o método <i>in-situ</i> e as imagens 20 (b e d) representam o nanocompósito confeccionado via o método <i>ex-situ</i>	68
Figura 21 – Espectros EDS dos nanocompósito de CB/TiO ₂ confeccionados via método <i>in-situ</i> e <i>ex-situ</i>	69
Figura 22 – Fotografias das amostras de CB/TiO ₂ antes e após o teste de adsorção por 35 min.	71
Figura 23 – Gráfico do ensaio de adsorção de azul de metileno pelos nanocompósitos de CB/TiO ₂ <i>in-situ</i> e <i>ex-situ</i>	72
Figura 24 – Gráfico da atividade fotocatalítica dos nanocompósitos de CB/TiO ₂ <i>in-situ</i> e <i>ex-situ</i> relacionados ao percentual de remoção de azul de metileno pelo tempo de ensaio.	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Planejamento experimental para a produção de CB em cultura agitada.....	42
Tabela 2 – Efeito da fonte de carbono na massa seca e absorção de água de CB.	44
Tabela 3 – Efeito da concentração de inóculo sobre a massa seca e absorção de água da CB.....	45
Tabela 4 – Efeito do volume do meio sobre a massa seca e absorção de água da CB.....	46
Tabela 5 – Efeito da agitação sobre a massa seca e absorção de água da CB....	46
Tabela 6 – Efeito da temperatura sobre a massa seca e absorção de água da CB.	47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CB – Celulose bacteriana
EDS – Espectroscopia de energia dispersiva
 $\text{Fe}_2\text{O}_3 \cdot \text{TiO}_2$ – Leucoxeno
 FeTiO_3 – Ilmenita
FTIR – Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier
 HO^\cdot – Radicais hidroxílicos
MEV – Microscopia eletrônica de varredura
TEOT – Tetraetóxido de titânio
 TiO_2 – Dióxido de titânio (Rutilo)
u.a. – Unidade arbitrária

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	23
1 INTRODUÇÃO	23
1.1 OBJETIVOS	24
1.1.1 Objetivo Geral	24
1.1.2 Objetivos Específicos	25
CAPÍTULO 2	27
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	27
2.1 CELULOSE BACTERIANA	27
2.1.1 Estrutura da celulose bacteriana	28
2.1.2 Produção de celulose bacteriana em cultura estática e agitada	30
2.2 DIÓXIDO DE TITÂNIO	33
2.2.1 Síntese de nanopartículas de dióxido de titânio	34
2.3 NANOCOMPÓSITOS	36
2.3.1 Nanocompósito baseado em celulose/dióxido de titânio	37
2.4 FOTOCATÁLISE	38
2.4.1 Fotocatálise heterogênea do dióxido de titânio	39
CAPÍTULO 3	41
3 INFLUÊNCIA DOS PARÂMETROS DE PROCESSO NA FORMAÇÃO DE CELULOSE BACTERIANA ESFÉRICA	41
3.1 INTRODUÇÃO	41
3.2 MATERIAIS E MÉTODOS	41
3.2.1 Microrganismo	41
3.2.2 Produção de esferas de celulose bacteriana	41
3.2.3 Purificação das esferas de celulose bacteriana	43
3.2.4 Determinação da absorção de água	43
3.2.5 Caracterização morfológica e microestrutural	43
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES	44
3.3.1 Parâmetros de processo na formação de celulose bacteriana	44
3.3.2 Capacidade de absorção de água das amostras	47

3.3.3	Efeito dos parâmetros de processo na formação de celulose bacteriana esférica -----	48
3.4	CONCLUSÕES -----	53
CAPÍTULO 4	-----	55
4	PREPARAÇÃO DE NANOCOMPÓSITO HIDROGEL DE CELULOSE BACTERIANA/DIÓXIDO DE TITÂNIO -----	55
4.1	INTRODUÇÃO -----	55
4.2	MATERIAIS E MÉTODOS -----	55
4.2.1	Preparação das esferas de celulose bacteriana -----	55
4.2.2	Preparação do nanocompósito celulose bacteriana/dióxido de titânio pelo método <i>ex-situ</i> -----	56
4.2.3	Caracterização por MEV, EDS e FTIR -----	56
4.3	RESULTADOS E DISCUSSÕES -----	56
4.4	CONCLUSÕES -----	63
CAPÍTULO 5	-----	65
5	PREPARAÇÃO DE NANOCOMPÓSITOS DE CELULOSE BACTERIANA/DIÓXIDO DE TITÂNIO VIA MÉTODOS <i>IN-SITU</i> E <i>EX-SITU</i> PARA APLICAÇÕES FOTOCATALÍTICAS -----	65
5.1	INTRODUÇÃO -----	65
5.2	MATERIAIS E MÉTODOS -----	65
5.2.1	Preparação dos corpos esféricos de celulose bacteriana -----	65
5.2.2	Obtenção via os métodos <i>in-situ</i> e <i>ex-situ</i> dos nanocompósitos de celulose bacteriana/dióxido de titânio -----	66
5.2.3	Caracterização via MEV e EDS -----	66
5.2.4	Ensaio de fotocatalise -----	66
5.3	RESULTADOS E DISCUSSÕES -----	67
5.4	CONCLUSÕES -----	73
6	CONCLUSÕES E SUGESTÕES FUTURAS -----	75
6.1	CONCLUSÕES -----	75
6.2	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS -----	76
REFERÊNCIAS	-----	77
APÊNDICE A	-----	83

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO

A celulose é um polissacarídeo e apresenta características que se enquadram ao grupo dos polímeros naturais. É o biopolímero mais abundante na terra e o material básico de toda substância vegetal. Além de ser produzida por plantas, pode também ser sintetizada por diversos microrganismos. A celulose bacteriana (CB) possui características que a tornam interessante para uma ampla faixa de aplicações, tais como, a alimentícia e biomédica. Características como a biocompatibilidade, alta porosidade, alta resistência mecânica, alta cristalinidade, baixa densidade, alta capacidade de absorção e retenção de água tornam a CB um material vantajoso na área médica (CHAWLA et al., 2009). Bactérias do gênero *Komagataeibacter* (anteriormente conhecida como *Acetobacter*, *Gluconacetobacter*) (YAMADA et al., 2012), tem caráter não patogênico, podendo ser encontradas em frutas e vegetais, e ainda possuem a habilidade de produzir nanofibras de celulose pura (CZAJA et al., 2004). Há duas formas de produzir celulose bacteriana: em meio estático ou em meio agitado. Em meio estático, uma membrana gelatinosa é acumulada na superfície do meio, adquirindo o formato do frasco em que o inóculo é cultivado. Já em meio agitado, massas fibrosas em suspensão são obtidas, podendo variar o seu formato e o rendimento dependendo das condições dinâmicas (CHAWLA et al., 2009; CZAJA et al., 2004). Em condições dinâmicas de produção há a tendência de formação de partículas esféricas de celulose, com forma irregular, seja em suspensão fibrosa, esferas, pelotas ou massas irregulares (CZAJA et al., 2004).

Estudos envolvendo a criação de nanocompósitos, que possuem como matriz a celulose bacteriana com formato esférico, estão sendo conduzidos para aplicações fotocatalíticas. O dióxido de titânio (TiO_2) é um semicondutor que contém propriedades e características muito interessantes, tais como, elevada atividade fotocatalítica (DAOUD; XIN; ZHANG, 2005). A produção de nanocompósitos baseados em matriz de esferas de celulose bacteriana, carregadas com nanopartículas de dióxido de titânio, torna-se interessante devido a estrutura da CB hidrogel que contém grupos hidroxílicos livres, possibilitando a interação com o TiO_2 e formando estruturas com alta razão de aspecto.

Entre as técnicas para a inserção da carga na matriz polimérica, existem os métodos *ex-situ* e *in-situ*, sendo que os mais difundidos são a

inserção por imersão sol-gel e a síntese por solução, respectivamente (GALKINA et al., 2014).

Portanto, este trabalho teve como principal objetivo produzir e caracterizar um nanocompósito baseado em CB esférica/TiO₂ para avaliação da atividade fotocatalítica. Para isso, primeiramente foi elaborado um planejamento de experimentos, para produzir e caracterizar esferas de celulose bacteriana, sintetizadas pela bactéria *Komagataeibacter hansenii* ATCC 23769 em meio dinâmico, sob diferentes condições operacionais, objetivando investigar variáveis influentes na biossíntese de esferas de CB, tais como, a fonte de carbono, concentração de inóculo, volume do meio de cultivo, volume do frasco Erlenmeyer e velocidade de agitação, bem como estabelecer parâmetros para reprodutibilidade da produção de esferas por *K. hansenii*. As melhores amostras de esferas de CB, produzidas anteriormente, foram utilizadas na confecção de nanocompósitos de CB/TiO₂. Os nanocompósitos foram produzidos via *in-situ* e *ex-situ*. As amostras foram caracterizadas e avaliadas morfológicamente via MEV, quimicamente via EDS e FTIR e a atividade fotocatalítica foi realizada em reator fotocatalítico e mensurada via espectroscopia UV/visível.

1.1 OBJETIVOS

A inserção de nanopartículas de TiO₂ nas esferas de celulose bacteriana, via os métodos *ex-situ* e *in-situ*, foram exploradas neste estudo. Avaliação e comparação da eficiência de fotocatalise dos nanocompósitos de CB/TiO₂, confeccionados via os dois métodos, foram realizadas. Para isso, primeiramente foi realizada a produção de esferas de celulose bacteriana e a otimização dos parâmetros inerentes ao processo de fabricação, buscando estabelecer parâmetros para a reprodutibilidade da produção de esferas de celulose pela bactéria *K. hansenii*, ATCC 23769.

1.1.1 Objetivo Geral

Este trabalho teve como objetivo geral produzir e caracterizar um nanocompósito baseado em CB esférica/TiO₂, via o método de imersão sol-gel e via síntese direta, para avaliação da atividade fotocatalítica.

1.1.2 Objetivos Específicos

- a) Desenvolver os parâmetros de produção de esferas de CB em cultura agitada;
- b) Incorporar nanopartículas de TiO_2 via métodos sol-gel *ex-situ* e *in-situ*;
- c) Avaliar a atividade fotocatalítica dos nanocompósitos.

CAPÍTULO 2

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 CELULOSE BACTERIANA

A celulose é o polissacarídeo mais abundante, barato e facilmente disponível da terra, podendo ser tradicionalmente extraído a partir de plantas ou sintetizado por diversos microrganismos, tais como, fungos, algas e bactérias (MOON et al, 2011). A biossíntese de CB pode ser realizada por diferentes tipos de organismos, tais como, algas (*Vallonia*), fungos (*Saprolegnia*, *discoideum Dictystelium*) ou bactérias do gênero (*Glucoacetobacter*, *Achromobacter*, *Aerobacter*, *Agrobacterium*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Sarcina*, *Alcaligenes*, *Zoogloea*) (KLEMM et al., 2001). Microrganismos do gênero *Komagataeibacter* são geralmente as bactérias mais adequadas para a produção de CB. Estas bactérias estritamente aeróbicas são gram-negativas, utilizam hidratos de carbono existentes no seu meio de nutrição para o seu desenvolvimento. Também possuem a capacidade de produzir extracelularmente grandes quantidades de celulose de um modo organizado, não apresentam características patogênicas e formam uma membrana gelatinosa na interface entre o ar e líquido quando cultivadas estaticamente, sendo facilmente isoláveis (CZAJA et al., 2006).

O primeiro estudo documentado relacionado com a produção de celulose por bactérias foi relatado em 1886 por Adrian Brown. Ele observou um material gelatinoso que se formou na superfície da fermentação de um vinagre. A análise deste material revelou que era celulose. A bactéria gram-negativa produtora de celulose foi nomeada *Acetobacter xylinum* (BROWN, 1886). Um estudo filogenético reclassificou a bactéria *Acetobacter xylinum* incluindo-a no gênero *Gluconacetobacter* e recentemente no novo gênero *Komagataeibacter*. Outras espécies, como *K. hansenii*, *K. europaeus*, *K. oboediens* e *K. intermedius* também foram incluídas neste gênero (YAMADA et al., 2012).

A membrana formada sob certas condições de cultura é caracterizada por uma estrutura tridimensional que compreende uma rede de nanofibras de celulose, sendo que o tamanho das nanofibras são consideravelmente menores do que das fibras vegetais. Embora a estrutura molecular da CB seja idêntica à existente nas plantas, apresenta algumas diferenças. A sua nanoestrutura única é caracterizada por uma elevada pureza, devido à ausência de lignina, hemicelulose,

pectina e outros compostos relacionados a celulose vegetal, elevada cristalinidade (60-90%), elevada resistência mecânica e estrutura em rede tridimensional (3D) constituída de nanofibras (KLEMM et al., 2001).

A celulose bacteriana tem uma elevada capacidade de absorver e reter uma quantidade de água superior a 90% do seu volume. A água absorvida e retida pode ser removida por meio de um processo de secagem. No entanto, após a secagem, a reabsorção é limitada a cerca de 6% em volume. O processo de congelamento-secagem por condensação (liofilização) pode aumentar e melhorar a reabsorção em até 70% do teor inicial da quantidade de água (MOON et al., 2011). Devido à possibilidade de mudança gradual de água por outros solventes em CB, metanol, acetona ou n-hexano pode ser introduzido mantendo a estrutura intacta (CZAJA et al., 2006).

Através da seleção de condições de cultura, aditivos desejados e espécies bacterianas, é possível controlar importantes propriedades de biopolímeros, tais como, massa molecular e estrutura, bem como a evolução da biossíntese (KLEMM et al., 2005). Existem dois métodos conhecidos que podem sintetizar celulose extracelular por bactérias. Um deles é a cultura estática, que é utilizada para a obtenção de películas de celulose ou membranas na interface entre o ar e o meio líquido. A outra é a cultura agitada, em que a celulose sintetizada é distribuída por todo o meio de cultura na forma de estruturas fibrosas (CHAO et al., 2000). A formação de corpos 3D de CB é geralmente obtida por cultura agitada, podendo ser realizada num agitador orbital, agitador eletromagnético ou em biorreatores (CZAJA et al., 2006).

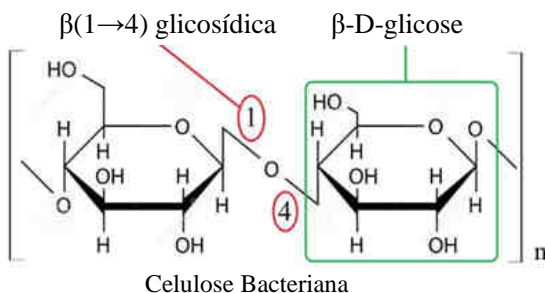
Parâmetros tais como o meio de cultura, velocidade de agitação, volume do frasco, volume de meio inoculado e bactéria utilizada, ainda não foram profundamente estudados e compreendidos. A produção em meio agitado forma esferas de CB com menores propriedades em relação as membranas produzidas em ambiente estático, tais como, uma menor resistência. A produção efetiva de compósitos com base em uma matriz de CB em meio agitado, pode fornecer uma melhoria significativa em algumas propriedades específicas da CB pura. A introdução de aditivos, tais como, as nanopartículas e as nanofibras também podem permitir um aumento nas propriedades da celulose.

2.1.1 Estrutura da celulose bacteriana

A celulose bacteriana é um biopolímero e polissacarídeo com fórmula molecular $(C_6H_{10}O_5)_n$, formada por cadeias lineares não

ramificadas de moléculas β -D-glicose, ligadas por ligações glicosídicas $\beta(1\rightarrow4)$. Duas moléculas de β -D-glicose ligadas por ligações glicosídicas formam uma estrutura molecular chamada celobiose. Cada molécula de glicose está ligada e girada aproximadamente 180° relativamente ao seu vizinho. A Figura 1 ilustra a estrutura molecular da CB.

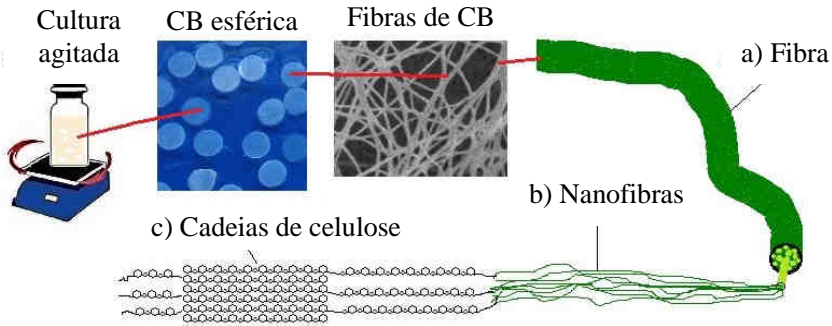
Figura 1 – Estrutura molecular da celulose bacteriana.



Fonte: Autor (2017).

O grau de polimerização é relativo à quantidade de monômeros, ou seja, quanto maior for o número de monômeros nas cadeias, maior será a massa molecular e grau de polimerização da CB (ROSS; MAYER; BENZIMAN, 1991). As cadeias formadas por moléculas de CB são orientadas paralelamente e formam ligações intermoleculares de hidrogênio (moléculas adjacentes) e intramoleculares (moléculas com a mesma cadeia). A celulose bacteriana produzida em cultura agitada e estática é formada por uma rede de fibras interligadas aleatoriamente. As cadeias de celulose, conforme mostrados na Figura 2c são capazes de agregar e formar estruturas chamadas de nanofibras (Figura 2b). A união de quantidades de nanofibras é alinhada para formar uma fibra de celulose (Figura 2a).

Figura 2 – Representação de celulose bacteriana esférica e sua rede de fibras produzida em cultura agitada. Fibra (a), nanofibras (b) e cadeias de moléculas de celulose (c).



Fonte: Autor (2016).

Existem seis diferentes formas conhecidas de estruturas cristalinas de celulose (I, II, III_I, III_{II}, IV_I e IV_{II}) e apenas duas delas são relevantes, as de números I e II. A celulose do tipo I pode ser sintetizada por plantas e bactérias do gênero *Komagataeibacter* em cultura estática, as suas cadeias paralelas de celulose são dispostas uniaxialmente, no entanto, na celulose tipo II, as suas cadeias estão dispostas aleatoriamente. O tipo I de celulose pode ter dois formatos, tipo Ia e Ib onde as suas estruturas são triclinicas e monoclinicas, respectivamente. A biossíntese de CB em cultura estática geralmente produz estruturas do tipo Ia (KLEMM et al., 2005).

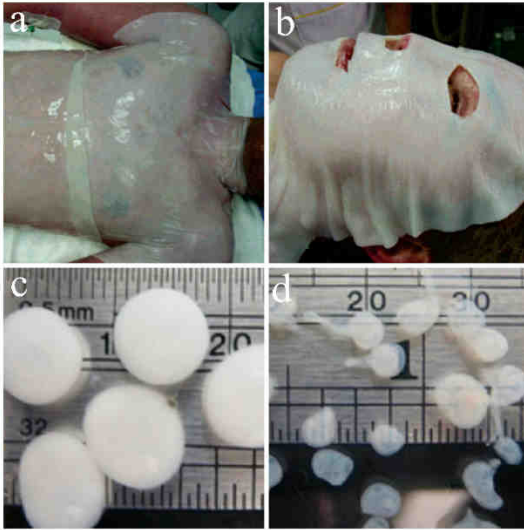
2.1.2 Produção de celulose bacteriana em cultura estática e agitada

Os processos de biossíntese de CB são realizados principalmente em condições estáticas ou agitadas. A cultura agitada pode ser conduzida em agitador orbital, agitador eletromagnético ou em biorreator. Cada uma destas condições de síntese resulta em celulose com características diferentes. A biossíntese realizada em condição estática produz uma camada ou estrutura tridimensional denominada de filme ou membrana, enquanto que no cultivo usando condições de agitação, estruturas tridimensionais com formatos esféricos irregulares são produzidas (ESA; TASIRIN; RAHMAN, 2014). A formação de celulose em cultura estática é regulada pela alimentação de ar sobre a

superfície do meio e o seu rendimento é dependente do tempo de cultivo, da fonte e concentração de carbono. O cultivo em um meio estático não fornece um elevado rendimento de celulose em relação ao cultivo em cultura agitada. Existem alguns inconvenientes na produção de CB em culturas estáticas que dificultam o controle dos parâmetros, tornando difícil um melhor rendimento. Como a membrana é formada sobre a superfície do meio de cultura, qualquer movimento e interferência influenciam o crescimento da membrana. Assim, é difícil controlar o pH, o crescimento de células e a adição de reagentes durante a cultura, e sabe-se que estes parâmetros são importantes para determinar as ótimas condições de rendimento. Portanto, a produção de celulose em cultura estática não é adequada para uma escala comercial (CZAJA; ROMANOVICZ; BROWN, 2004; LI et al., 2013).

As condições de cultura agitada tendem a formar celulose em formato esférico, de forma irregular, seja em pasta fibrosa, esferas, pellets ou massa irregular. Estes corpos de CB apresentam uma menor cristalinidade, menor resistência mecânica e menor grau de polimerização em comparação as membranas formadas em cultura estática. A mudança de organização das microfibras está relacionada com os efeitos da ruptura da aeração sobre a formação de ligações de hidrogênio entre celulose (BOOTTEN et al., 2008). A Figura 3 ilustra alguns exemplos de formação de celulose em cultura estática e agitada. A Figura 3 (a, b) mostra uma aplicação da membrana na área médica, pele artificial. e é um exemplo de membranas crescidas em cultura estática. Na Figura 3 (c, d) mostra a formação de celulose em formato esférico produzida em cultura agitada, que tem aplicações em diversas áreas, tais como, imobilização de enzimas, tratamento de efluentes, embolização, entre outras (CZAJA et al., 2006; KLEMM et al., 2005).

Figura 3 – (a) e (b) membranas de CB para a substituição de pele e (c) e (d) celulose esférica formada em cultura agitada.



Fonte: Adaptado com permissão de Bootten et al. (2008); Czaja et al. (2007).

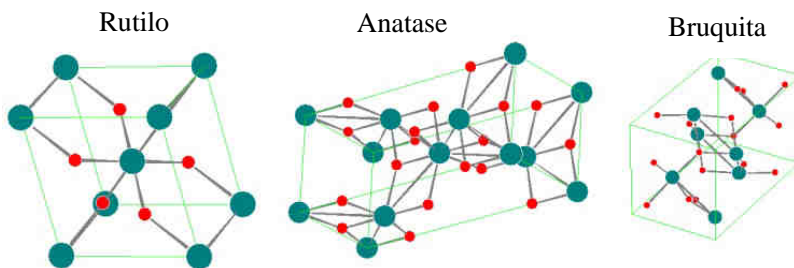
A produção de celulose em cultura estática é um método simples e barato e que pode ser cultivada em frascos e recipientes. No entanto, devido ao seu tempo de biossíntese, entre 7 a 20 dias, não é adequado para a produção em escala comercial. Portanto, o crescimento de CB em cultura agitada tem um rendimento de produção elevado e apresenta um grande potencial para ser produzida em escala comercial. A possibilidade de produzir celulose esférica abre uma variedade de aplicações, como por exemplo, a utilização de esferas para a liberação de fármacos e para a adsorção de íons metálicos em soluções aquosas. Muitos estudos referentes à produção de celulose por culturas agitadas estão sendo realizados, no entanto, ainda não foram precisamente estabelecidos os parâmetros e as melhores condições para a produção e modelagem de celulose em forma esférica (RECOUVREUX et al., 2011).

2.2 DIÓXIDO DE TITÂNIO

O titânio é o nono mineral mais abundante da crosta terrestre, onde ocorre normalmente combinado com o oxigênio. Os mais conhecidos e importantes minerais de titânio são o ilmenita (FeTiO_3), leucoxeno ($\text{Fe}_2\text{O}_3 \cdot \text{TiO}_2$) e o rutilo (TiO_2). Contudo, a maior reserva mundial de titânio se encontra na forma de titanomagnetita, porém, não é economicamente viável. A ocorrência do dióxido de titânio na natureza normalmente é acompanhada de contaminantes metálicos, tais como, o ferro. Estes óxidos são fontes que podem ser facilmente acessadas tornando a produção comercial de dióxido de titânio comercial (BUXBAUM, 1997). O dióxido de titânio (TiO_2), ou titânia, é um material muito versátil que possui características interessantes, tais como, elevada dureza, baixa reatividade química, alto índice de refração à luz, fotossensibilidade, resistência à corrosão, baixo custo, fotoestabilidade e grande abundância. A titânia pode ser obtida através de diversas técnicas experimentais, onde é possível a produção desde monocristais até nanopartículas com elevada razão de aspecto (DIEBOLD, 2003). Devido a sua versatilidade e características únicas o TiO_2 pode ser utilizado como pigmento branco, catalisador, fotocatalisador, em células solares para a produção de hidrogênio e energia elétrica, em sensores de gás, proteção corrosiva, cerâmicas, dispositivos elétricos e em implantes de ossos (BUXBAUM, 1997).

O TiO_2 é polimorfo e pode ser encontrado na natureza em oito diferentes formas cristalinas conhecidas, sendo estas, TiO_2 -B, TiO_2 -R, TiO_2 -H, TiO_2 -II, TiO_2 -III, rutilo (tetragonal), bruquita (ortorrômbica) e anatase (ortorrômbica). As três últimas são os polimorfos de maior interesse comercial e assim os mais estudados. A estrutura rutilo é a mais estável termodinamicamente para partículas acima de 35 nm, a anatase para partículas inferiores a 11 nm e a bruquita a mais estável na faixa entre 11-35 nm, onde as duas últimas são metaestáveis (CHEN; MAO, 2007). Estas três estruturas do TiO_2 são compostas por octaedros contendo um átomo central de titânio rodeado por seis átomos de oxigênio, os quais os polimorfos se diferem pela distorção dos seus octaedros e a organização de suas cadeias, conforme pode ser observado na Figura 4.

Figura 4 – Estruturas cristalinas do dióxido de titânio: rutilo, anatase e bruquita.



Fonte: Adaptado de Viana (2011).

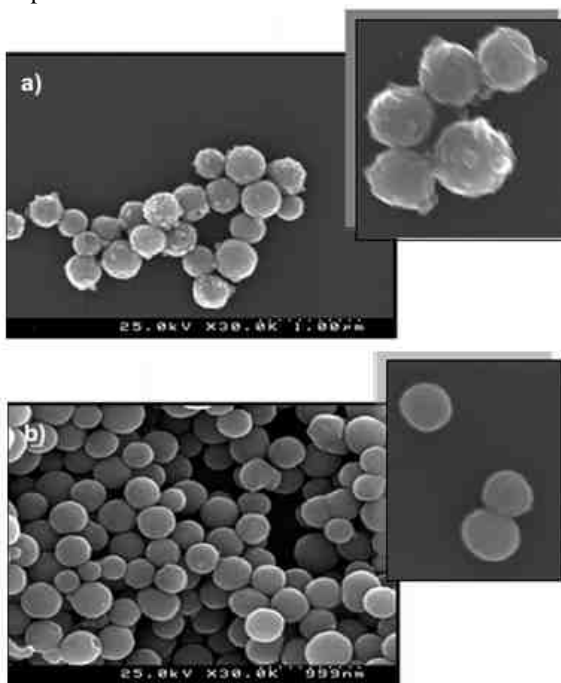
Em temperatura ambiente o TiO₂ cristaliza-se na fase anatase que é termicamente estável até 800 °C, após esta temperatura ocorre uma transição para a fase rutilo estável até a sua temperatura de fusão de 1855 °C. A fase metaestável bruquita tem uma síntese muito difícil e raramente é encontrada na natureza. A célula unitária do rutilo possui dois átomos de titânio e quatro de oxigênio, onde cada átomo de titânio é rodeado por seis de oxigênio formando um octaedro com distância entre Ti-O de 1,98-1,95 Å. A fase anatase contém quatro átomos de titânio e oito de oxigênio para cada célula unitária contendo octaedros distorcidos com distância entre Ti-O de 1,98-1,93 Å, sendo que, a fase bruquita possui oito moléculas por célula unitária e os octaedros também são distorcidos e mantém distâncias interatômicas entre Ti-O de 1,87-2,04 Å. Deste modo, apresenta elevada transparência, alta absorção nesta região e alto índice de refração, ocasionando a reflexão de aproximadamente 95% da luz visível incidente (FUJISHIMA; ZHANG; TRYK, 2008; LINSEBIGLER; LU; YATES, 1995).

2.2.1 Síntese de nanopartículas de dióxido de titânio

Um dos métodos mais utilizados para a síntese de partículas de dióxido de titânio é a hidrólise de alcóxidos em solução aquosa/álcool. Este método se evidencia devido as propriedades eletroquímicas interfaciais e a estabilidade de dispersão das partículas é influenciada pela estrutura superficial (DIEBOLD, 2003). Nanopartículas esféricas de TiO₂ são preparadas com hidrólise controlada e condensação do tetraetóxido de titânio (TEOT) em uma solução aquosa/álcool. Os parâmetros críticos referentes a precipitação são: a concentração do reagente, a relação de concentração de água e TEOT, temperatura

reacional e condições de envelhecimento. Estes parâmetros exercem um efeito sobre o tamanho de partículas, distribuição de tamanhos, morfologia e grau de aglomeração. O tempo requerido para observar uma turvação inicial deve ser assumido como uma indicação do tempo de indução para a nucleação das partículas. Outro parâmetro importante é a temperatura de síntese, onde este exerce efeito significativo no arranjo e morfologia interna de nanocristais em agregados de TiO_2 (LINSEBIGLER; LU; YATES, 1995). A síntese realizada na temperatura de $10\text{ }^\circ\text{C}$ gera partículas rugosas e com pequenos núcleos sobre a superfície (Figura 5a). Contudo, a síntese realizada na temperatura de $20\text{ }^\circ\text{C}$ as partículas formadas são esféricas e lisas (Figura 5b).

Figura 5 – Micrografias de MEV da superfície de nanopartículas de TiO_2 . a) Nano partículas sintetizadas na temperatura de $10\text{ }^\circ\text{C}$ e b) sintetizadas na temperatura de $20\text{ }^\circ\text{C}$.

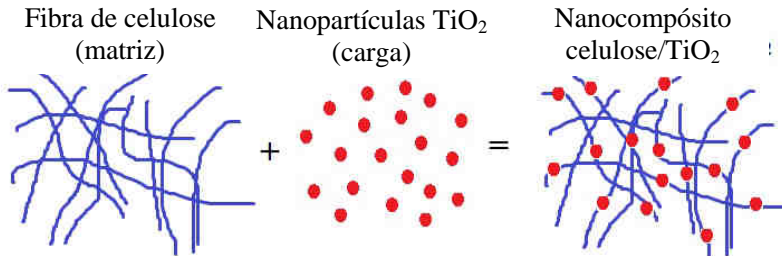


Fonte: Adaptado de Gonçalves (2007).

2.3 NANOCOMPÓSITOS

Materiais compósitos possuem pelo menos dois componentes ou duas fases, com propriedades físicas e químicas distintas em sua composição. Separadamente, os constituintes mantêm suas características, contudo, a união destes componentes possibilita a criação de um componente com novas propriedades. Os compósitos são compostos por uma fase contínua (matriz), sendo a maior fração volumétrica (polímero, metal ou cerâmica) e da fase contínua (carga), sendo a menor fração volumétrica (granular, fibrosa ou lamelar). Os nanocompósitos são uma nova classe de materiais que englobam quantidades de até 5% de nanoestruturas como a fase dispersa (GONÇALVES, 2007; CAO; YANG, 2004). Um exemplo de material compósito e também nanocompósito pode ser observado na Figura 6.

Figura 6 – Ilustração de nanocompósito de Celulose e TiO_2 .



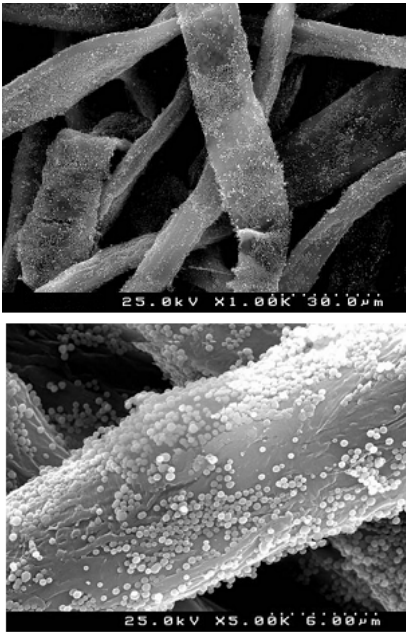
Fonte: Autor (2016).

As nanoestruturas são componentes com dimensões nanométricas, como por exemplo, nanopartículas de TiO_2 . Os nanocompósitos de polímeros apresentam pelo menos um dos constituintes em nanoescala, onde estes alcançam melhorias significativas nas suas propriedades em geral. A presença de grande área superficial das nanoestruturas aumenta a área interfacial, gerando modificações nas propriedades. A incorporação de nanopartículas em uma matriz polimérica apresenta algumas limitações, tais como, o aumento da viscosidade, a dificuldade de dispersão das nanopartículas na matriz polimérica, sedimentação e alteração das propriedades ópticas. As nanopartículas existem em diferentes formatos e tamanhos, sendo classificadas como, fibras ou tubulares, placas ou lamelas e tridimensionais ou isodimensionais (CAO; YANG, 2004; FRIEDRICH; SCHLARB, 2013).

2.3.1 Nanocompósito baseado em celulose/dióxido de titânio

Materiais híbridos funcionais contêm ambos os componentes orgânicos e inorgânicos, cujo não usuais propriedades permitem o desenvolvimento de novas aplicações. Na confecção destes materiais, o objetivo é unir as propriedades interessantes dos componentes individuais e também melhorar as propriedades resultantes de efeitos sinérgicos devido às interações entre os componentes inorgânicos e orgânicos. Nos últimos anos, o desenvolvimento de nanocompósitos tem aumentado, onde, ao menos um dos componentes está em nível nanométrico e interage quimicamente com o outro material. Um progresso considerável vem sendo feito em nanocompósitos baseados em polímeros sintéticos comparativamente ao uso de biopolímeros. No entanto, existem aplicações que envolvem biopolímeros importantes para a fabricação de materiais compósitos, tais como o uso de celulose na indústria do papel. Isto motivou a investigação de métodos hidrolíticos para a síntese *in situ* de nanopartículas inorgânicas na presença de fibras celulósicas de madeira (GONÇALVES, 2007).

A síntese de nanocompósitos de celulose/TiO₂ usando a hidrólise controlada do sulfato de titânio é uma técnica interessante para melhorar o rendimento de TiO₂ em materiais celulósicos. Existem distintos métodos para sintetizar partículas de TiO₂, contudo, a técnica sol-gel apresenta a habilidade de controlar a distribuição do tamanho de partícula. Geralmente esses métodos envolvem a hidrólise controlada de alcóxidos de titânio (IV), seguido por uma subsequente etapa de calcinação para promover a cristalinidade e a remoção de resíduos orgânicos, conforme mostra a Figura 7. No entanto, a calcinação acima de 280-300 °C exclui a utilização de procedimentos na preparação de nanocompósitos celulósicos contendo TiO₂ (GONÇALVES, 2007; CAO; YANG, 2004; FRIEDRICH; SCHLARN, 2013).

Figura 7 – Micrografias de nanopartículas de TiO₂.

Fonte: Adaptado de Gonçalves (2007).

A hidrólise da variedade Ti (IV) tendo TiCl₄ ou TiOSO₄·xH₂O, sob condições específicas controladas pode produzir nanopartículas de TiO₂ bem definidas morfologicamente em temperatura ambiente. Aditivos químicos, tais como, uréia, acetilacetona ou ácido acético podem ser usados no meio de reação para controlar a fase cristalina final. A síntese de TiO₂ na presença de uréia toma atenção devido as condições de reatividade parecerem compatíveis com as fibras celulósicas utilizadas com as matrizes compósitas. Deste modo, a hidrólise TiCl₄ e uréia pode cobrir as fibras celulósicas com um polimorfo específico de TiO₂ (síntese *in-situ*).

2.4 FOTOCATÁLISE

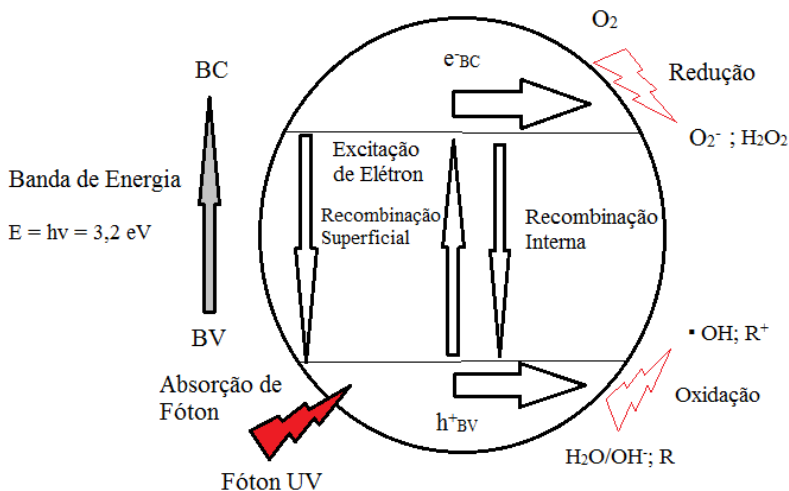
O termo fotocatalise (fotoquímica + catalise) pode ser definido como a aceleração de uma fotorreação pela presença de um catalisador. O princípio da fotocatalise heterogênea é baseada na ativação de um

semicondutor através de luz solar ou artificial. O semicondutor é caracterizado por apresentar uma lacuna intermediária entre condutor e isolantes entre as suas bandas de valência e de condução. Quando este semicondutor é irradiado por um fóton com energia igual ou maior a sua lacuna, um elétron é promovido e a consequência é a formação de um par denominado de lacuna (FUJISHIMA; ZHANG; TRYK, 2008; LINSEBIGLER; LU; YATES, 1995).

2.4.1 Fotocatálise heterogênea do dióxido de titânio

A banda de valência de dióxido de titânio é composta do orbital 2p de oxigênio, enquanto a banda de condução é composta pelo orbital 3d de titânio, resultando em uma lacuna de energia na região do ultravioleta, com tamanhos de 3,05 eV para o rutilo e 3,4 eV para anatase (FUJISHIMA; ZHANG; TRYK, 2008; LINSEBIGLER; LU; YATES, 1995). Como consequência, a luz visível (400-700 nm) não tem energia suficiente para suprimir a lacuna de energia e promover elétrons da banda de valência para a banda de condução (nenhuma absorção de luz visível). Porém, o TiO_2 é um material semicondutor que pode ser quimicamente ativado por luz ultravioleta (FUJISHIMA; ZHANG; TRYK, 2008; LINSEBIGLER; LU; YATES, 1995). De uma forma geral, este processo é baseado na irradiação de um fotocatalisador (TiO_2), que absorve energia do fóton maior ou igual à energia da sua lacuna do semicondutor para gerar a promoção eletrônica. O elétron quando irradiado é promovido da banda de valência para a banda de condução gerando sítios oxidantes e redutores que catalisam reações químicas, oxidando componentes orgânicos como o O_2 e H_2O e reduzindo metais dissolvidos (FUJISHIMA; ZHANG; TRYK, 2008). Este fenômeno gera uma lacuna na banda de valência com potenciais positivos na faixa de 2,0 a 3,5 eV, tendo potencial suficiente para gerar radicais HO^\cdot a partir de moléculas de água adsorvidas na superfície do TiO_2 , podendo posteriormente oxidar o contaminante orgânico, conforme pode ser observado na Figura 8 (FUJISHIMA; ZHANG; TRYK, 2008).

Figura 8 – Ilustração esquemática da reação de fotocatalise de TiO_2 .



e^-_{BC} : Elétron gerado na banda de condução

R : Substrato

h^+_{BV} : Lacuna gerada na banda de valência

R^+ : Substrato oxidado

Fonte: Autor (2017).

O TiO_2 permanece estável mesmo após ser fotoexcitado, tornando-se um excelente fotocatalisador, principalmente o anatase (LINSEBIGLER; LU; YATES, 1995). Uma lacuna gerada na banda de valência poderá reagir com H_2O ou íons de hidróxido adsorvidos na superfície para formar radicais hidroxílicos (HO^\cdot) e o elétron na banda de condução poderá reduzir o O_2 para produzir íons superóxidos (O_2^-). As lacunas e os radicais hidroxílicos são extremamente reativos devido a sua instabilidade química quando em contato com componentes orgânicos. Os radicais hidroxílicos estão entre os mais reativos radicais conhecidos e podem ser utilizados como um eficiente agente de morte celular e na degradação de moléculas orgânicas (LINSEBIGLER; LU; YATES, 1995).

CAPÍTULO 3

3 INFLUÊNCIA DOS PARÂMETROS DE PROCESSO NA FORMAÇÃO DE CELULOSE BACTERIANA ESFÉRICA

3.1 INTRODUÇÃO

A celulose bacteriana tem características únicas que a tornam atraente em várias aplicações devido as suas características particulares, tais como a biocompatibilidade, alta resistência à tração, capacidade de absorção elevada e retenção de água e alta cristalinidade. O objetivo principal do estudo apresentado neste capítulo foi avaliar a influência dos parâmetros de produção da celulose bacteriana em cultivo agitado caracterizando e avaliando os resultados com relação à produtividade e geometria. Os parâmetros de produção e de funcionamento analisado foram a fonte de carbono, a concentração de inóculo, o volume do meio de cultura, a velocidade de agitação e a temperatura de incubação. Os resultados experimentais mostraram que a fonte de carbono, a velocidade de agitação e a temperatura influenciam positivamente a formação de esferas de celulose bacteriana. A microscopia eletrônica de varredura revelou uma morfologia do material composta por uma rede aleatória de nanofibras de celulose. Assim, a possibilidade de produzir CB esférica controlando parâmetros de operação abre novas oportunidades para a utilização deste material, tais como em aplicações biomédicas e no tratamento de águas residuais.

3.2 MATERIAIS E MÉTODOS

3.2.1 Microrganismo

A bactéria *Komagataeibacter hansenii*, ATCC 23769, foi utilizada para a produção de esferas de celulose bacteriana em condições dinâmicas. 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.

3.2.2 Produção de esferas de celulose bacteriana

Para o estudo de diferentes condições de produção de esferas de CB foi elaborado um planejamento experimental envolvendo as variáveis fontes de carbono, concentração de inóculo, volume do meio de cultivo e velocidade de agitação. Todos os experimentos foram

realizados em triplicata, durante quatro dias de cultivo. A Tabela 1 apresenta o planejamento para os experimentos de produção de esferas de CB.

Tabela 1 – Planejamento experimental para a produção de CB em cultura agitada.

Variáveis	Parâmetros de Processo					
	Amostra	Fonte de Carbono	Conc. do inóculo (% v/v)	Volume do meio (ml)	Agitação (rpm)	Temp. de incubação (°C)
Efeito da fonte de carbono	01	Manitol	20	50	125	25
	02	Glicose	20	50	125	25
	03	Glicerol	20	50	125	25
Efeito do volume do inóculo	04	Glicose	10	50	125	25
	02	Glicose	20	50	125	25
	05	Glicose	30	50	125	25
Efeito do volume do meio	06	Glicose	20	30	125	25
	07	Glicose	20	40	125	25
	02	Glicose	20	50	125	25
Efeito da velocidade de agitação	08	Glicose	20	50	100	25
	02	Glicose	20	50	125	25
	09	Glicose	20	50	150	25
Efeito da temperatura de incubação	10	Glicose	20	50	125	20
	02	Glicose	20	50	125	25
	11	Glicose	20	50	125	30

Fonte: Autor (2016).

Pode-se observar na Tabela 1, que em cada experimento variou-se um parâmetro do processo de produção de CB em cultura agitada. Portanto, pode-se observar que no experimento 01 avaliou-se a fonte de carbono, assim como, no experimento 05 onde foi avaliada a influência da velocidade de agitação. Cada parâmetro foi variado em três valores e cada teste foi realizado em triplicata. Em todos os experimentos a composição do meio de cultivo utilizada foi de 25 g·L⁻¹ de fonte de carbono, 3 g·L⁻¹ de peptona e 5 g·L⁻¹ de extrato de levedura. Todos os meios foram preparados através da dissolução dos ingredientes em água

destilada e, posteriormente, autoclavados à temperatura de 121°C durante 20 minutos.

3.2.3 Purificação das esferas de celulose bacteriana

Após o período de cultivo da CB, o material sobrenadante será coletado, lavado em água filtrada e submetido à purificação em uma solução de NaOH 0,1 M, à 60°C por 24 horas, com o objetivo de 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 sob refrigeração para as análises futuras. Para determinação da massa seca as amostras na forma de hidrogel foram secas por liofilização e a massa seca foi determinada em balança analítica.

3.2.4 Determinação da absorção de água

Para a determinação da absorção de água, as amostras de CB esféricas secas por liofilização (M_s) foram pesadas em balança analítica e depois imersas em água deionizada sob agitação a 30 °C durante 24 horas para se a hidratação. Em seguida, removeu-se o excesso de água e obteve-se a massa úmida (M_u). As medidas foram realizadas em triplicata. A capacidade de absorção de água de CB esférica foi determinada de acordo com a seguinte fórmula Equação 1.

$$\text{Absorção de água} = \frac{M_u (g) - M_s (g)}{M_s (g)} \quad (1)$$

3.2.5 Caracterização morfológica e microestrutural

A microestrutura e morfologia das amostras liofilizadas foram caracterizadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) da UFSC. As análises de MEV foram realizadas em um microscópio JEOL JSM-6390 LV. Os elétrons foram acelerados com uma tensão de 10 kV com um aumento de até 15000 vezes. Para isso, as amostras purificadas foram congeladas e secas sob vácuo (liofilizada a -55 °C) durante 24 horas. Para as observações por MEV, as amostras foram colocadas sobre um suporte de alumínio e revestidas com ouro. A superfície das amostras foi recoberta com uma camada de 30 nm de ouro utilizando um Leica EM SCD 500.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.3.1 Parâmetros de processo na formação de celulose bacteriana

3.3.1.1 Efeito da fonte de carbono sobre a massa seca e absorção de água da CB

Na Tabela 2 é apresentada a condição experimental em que manitol, glicose e glicerol foram utilizados como fonte única de carbono, todos com concentração de $25 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$. Pode-se observar que a massa seca de CB obtida do cultivo em presença de glicerol foi aproximadamente duas a três vezes superiores à obtida quando manitol e glicose foram utilizados, respectivamente. Estes resultados estão de acordo com (KESHK e SAMESHIMA, 2005) que tinham relatado anteriormente que o glicerol usado como fonte de carbono gerava um maior rendimento na produção de CB. Como mostrado, a amostra 03, contendo glicerol como fonte de carbono, atingiu a maior capacidade de absorção de água entre todas as amostras, obtendo-se 65 g de água por grama de CB esférica seca.

Tabela 2 – Efeito da fonte de carbono na massa seca e absorção de água de CB.

Experimento	Fonte de Carbono	Massa Seca de CB ($\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$)	Absorção de Água ($\text{g H}_2\text{O}\cdot\text{g CBSeca}^{-1}$)
01	Manitol	$0,13 \pm 0,01$	40,00
02	Glicose	$0,16 \pm 0,02$	43,00
03	Glicerol	$0,36 \pm 0,05$	64,71

Fonte: Autor (2016).

3.3.1.2 Efeito da concentração de inóculo sobre a massa seca e absorção de água da CB

O efeito da concentração de inóculo (10, 20 e 30% v/v) nas condições experimentais 04, 02 e 05, respectivamente, é apresentado na Tabela 3. A concentração de inóculo apresentou um pequeno efeito positivo na massa seca de CB no inóculo com a concentração de 20%

(v/v). Embora um aumento na concentração de inóculo geralmente conduza a um encurtamento da fase de latência do crescimento celular, isto também pode ter contribuído para um consumo de substrato a ser direcionado para a biossíntese de celulose.

Tabela 3 – Efeito da concentração de inóculo sobre a massa seca e absorção de água da CB.

Experimento	Concentração de Inóculo (%)	Massa Seca de CB ($\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$)	Absorção de Água ($\text{g H}_2\text{O}\cdot\text{g CBSeCa}^{-1}$)
04	10	$0,13 \pm 0,00$	47,06
02	20	$0,16 \pm 0,02$	49,28
05	30	$0,12 \pm 0,01$	44,67

Fonte: Autor (2016).

A porcentagem de concentração de inóculo corresponde a mililitros de inoculante/100 ml de volume do meio. A composição do meio neste ensaio foi de $25 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ de glicose, $3 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ de peptona e $5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ de extrato de levedura.

3.3.1.3 Efeito do volume do meio sobre a massa seca e absorção de água da CB

A Tabela 4 demonstra que o volume do meio não teve efeito significativo sobre o rendimento de CB. O volume do meio teve um efeito positivo em relação a absorção de água da CB seca. A água absorvida aumentou de $20 \text{ g H}_2\text{O}\cdot\text{g CBSeCa}^{-1}$ para $40 \text{ g H}_2\text{O/g CB}$ seca quando o volume do meio aumentou de 30 para 50 ml.

Tabela 4 – Efeito do volume do meio sobre a massa seca e absorção de água da CB.

Experimento	Volume do meio (ml)	Massa Seca de CB ($\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$)	Absorção de Água ($\text{g H}_2\text{O}\cdot\text{g CBSeca}^{-1}$)
06	30	$0,13 \pm 0,02$	24,69
07	40	$0,15 \pm 0,03$	29,74
02	50	$0,16 \pm 0,02$	42,57

Fonte: Autor (2016).

3.3.1.4 Efeito da agitação sobre a massa seca e absorção de água da CB

Na Tabela 5 é apresentado o efeito da taxa de agitação sobre a massa seca de CB assim como na absorção de água. Não foi observado diferença entre a velocidade testada de 100, 125 e 150 rpm. O aumento da taxa de agitação teve um efeito negativo na absorção de água. Pode-se visualizar que quando a taxa de agitação foi aumentada de 100 rpm para 150 rpm a absorção de água pela CB produzido sob esta condição diminuiu de 42,57 para 30,22 $\text{g H}_2\text{O}\cdot\text{g CBSeca}^{-1}$.

Tabela 5 – Efeito da agitação sobre a massa seca e absorção de água da CB.

Experimento	Velocidade de Agitação (rpm)	Massa Seca de CB ($\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$)	Absorção de Água ($\text{g H}_2\text{O}\cdot\text{g CBSeca}^{-1}$)
08	100	$0,19 \pm 0,02$	42,57
02	125	$0,16 \pm 0,02$	37,69
09	150	$0,17 \pm 0,03$	30,22

Fonte: Autor (2016).

3.3.1.5 Efeito da temperatura sobre a massa seca e absorção de água da CB

Quanto ao efeito da temperatura sobre a massa seca de CB, observou-se que a maior massa obtida foi com a temperatura de 25 °C. Como pode ser observado na Tabela 6, em 25 °C observou-se uma produção de CB quase duas vezes superior à observada em 20 °C e pelo menos 50% superior à observada em 30 °C. Entre as temperaturas testadas, em 25 °C obteve-se a CB com a maior capacidade de absorção de água.

Tabela 6 – Efeito da temperatura sobre a massa seca e absorção de água da CB.

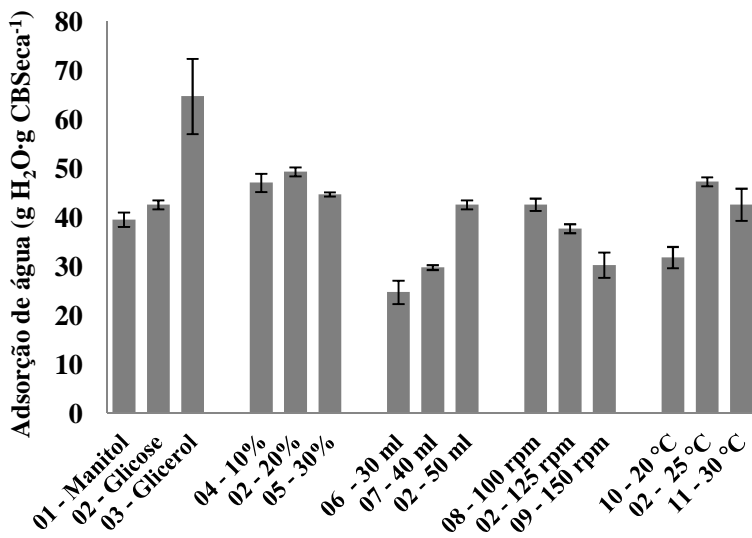
Experimento	Efeito da Temperatura (°C)	Massa Seca de CB (g·l ⁻¹)	Absorção de Água (g H ₂ O·g CBSeca ⁻¹)
10	20	0.08 ± 0.013	31.776
02	25	0.16 ± 0.019	47.270
11	30	0.12 ± 0.004	42.573

Fonte: Autor (2016).

3.3.2 Capacidade de absorção de água das amostras

A capacidade de absorção de água da celulose bacteriana é uma propriedade importante para várias aplicações, como a interação com íons para medir a absorção de metais pesados (SEIFERT et al., 2004). O controle do teor de água oferece a possibilidade do desenvolvimento de materiais com a capacidade específica de absorção de água. A Figura 9 apresenta a absorção de água de amostras de CB esférica de acordo com uma variação particular de parâmetros. Como mostrado, a amostra 03, contendo glicerol como fonte de carbono, atingiu a maior capacidade de absorção de água entre todas as amostras de CB, sendo capaz de absorver 65 g de água por grama de CB seca esférica. O comportamento de absorção da água está associado à microestrutura do material, em particular, à porosidade.

Figura 9 – Absorção de água de CB de acordo com parâmetros específicos do processo de produção de CB com formato esférico.

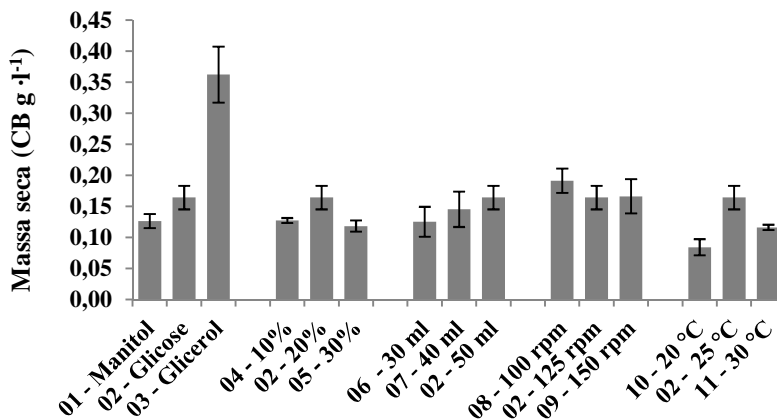


Fonte: Autor (2016).

3.3.3 Efeito dos parâmetros de processo na formação de celulose bacteriana esférica

Para a análise do rendimento de massa de CB produzido, todas as amostras foram secas via liofilização e medido o peso para cada ensaio. A Figura 10 ilustra os resultados relacionados com o rendimento de CB devido ao efeito que as variações dos parâmetros causaram na quantidade de massa seca produzida. Os resultados foram agrupados por parâmetro analisado e cada parâmetro teve três variáveis analisadas. Por exemplo, os resultados da massa de CB relacionados com a fonte de carbono foram agrupados em manitol, glicose e glicerol ou amostra 01, 02 e 03, respectivamente, onde a Tabela 1 mostra que estas amostras apresentam apenas variação em relação à fonte de carbono.

Figura 10 – Rendimento de produção das massas secas de CB esférica de acordo com cada variação particular do parâmetro.



Fonte: Autor (2016).

Assim, é possível visualizar graficamente que o glicerol como fonte de carbono atingiu o maior rendimento em CB entre todas as amostras. Estes resultados corroboram com (KESHK e SAMESHINA, 2005) que apresentaram resultados similares com relação ao rendimento de produção de CB via glicerol.

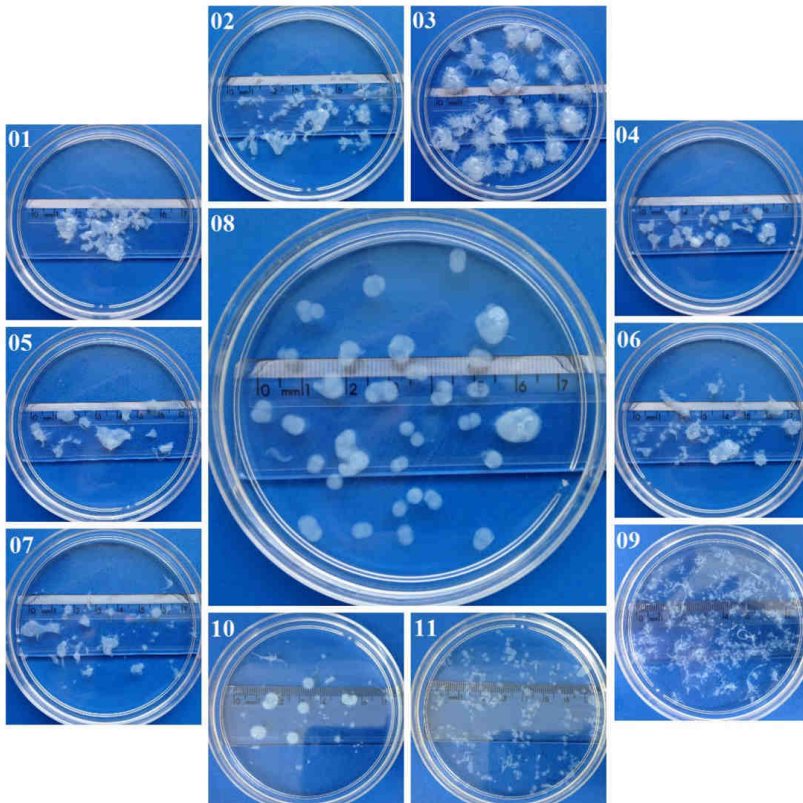
Os resultados referentes ao volume de inóculo mostraram que uma concentração de 20% foi suficiente para produzir o valor mais alto de CB, em comparação com concentrações de 10 e 30%.

A temperatura de 25 °C provocou a produção de praticamente duas vezes mais CB do que na temperatura de 20 °C e pelo menos 50% mais do que com a temperatura de 30 °C. Assim, há uma tendência de que com o uso de glicerol, 20% de volume de inóculo, 50 ml de volume médio, velocidade de agitação de 100 rpm e com temperatura de 25 °C será produzido o maior rendimento de BC.

A Figura 11 apresenta imagens numeradas de todas as amostras produzidas de CB obtidas por cultura agitada e variação de parâmetros. Observou-se que houve uma tendência para a formação de geometrias indefinidas e produção de corpos aglomerados de CB nas amostras 01 e 02, produzidas com manitol e glicose, respectivamente. A amostra 3 apresenta a formação de grandes corpos esféricos (diâmetros médios de 10 mm) com uma geometria que difere pela presença de ramificações que se projetam a partir da sua superfície exterior, produzida com glicerol. Este resultado mostra que a utilização de glicerol como fonte de

carbono ocorre uma tendência de formação de grandes corpos esféricos de CB e em grandes quantidades. É possível analisar o efeito do volume do inóculo, onde a amostra 2 obteve uma massa de CB maior do que as amostras 04 e 05. No entanto, essas amostras apresentaram um formato mais esférico e menos aglomerado em relação a amostra 02. As amostras 02, 06 e 07 apresentaram o efeito do volume do meio de cultura na produção de CB esférica, sendo possível observar uma sutil diferença na geometria da amostra 07 devido a uma redução da aglomeração e formação de corpos esféricos. As amostras 02, 08 e 09 mostraram que com o aumento da velocidade de agitação ocorreu a geração de aglomeração e diminuição do tamanho dos corpos CB.

Figura 11 – Fotografias das amostras de CB produzidas em cultura de agitada de acordo com a Tabela 1.



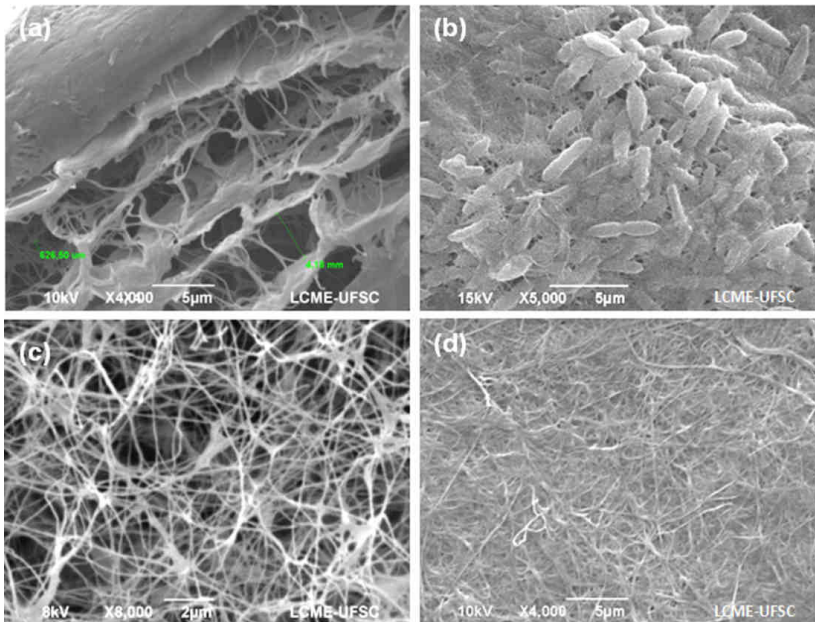
Fonte: Autor (2016).

A Figura 11 ilustra que a velocidade de agitação de 100 rpm produziu CB uniforme com formas esféricas e sem a presença de aglomerações de acordo com a amostra 08. A temperatura de 30 °C foi crítica para a formação de CB esférica com diâmetros médios de 3 mm. Assim, o aumento da temperatura de incubação tende a formar esferas menores de acordo com a amostra 11, a formação de corpos esféricos contendo a geometria mais próxima de um formato esférico do que qualquer outro espécime é observado na amostra 10. Todas as amostras apresentaram uma tendência de aglomeração após o quarto dia de cultivo.

Os resultados experimentais mostraram que com o uso de glicerol, 20% de volume de inóculo, 50 ml de meio de volume, temperatura de incubação de 30 °C e uma velocidade de agitação de 100 rpm, existe uma tendência para o maior rendimento em massa para a produção de CB esférica. No entanto, essas condições não produziram CB com tamanhos e formas padronizadas e sem aglomeração. O MEV foi utilizado para caracterizar morfologicamente a estrutura de CB e as micrografias mostraram uma morfologia composta por uma rede aleatória de nanofibras de celulose.

A Figura 12 mostra as micrografias de MEV das amostras esféricas de CB, onde se pode visualizar uma morfologia composta por uma rede aleatória de nanofibras de celulose, referente a amostra 08. A Figura 12 (a) ilustra a morfologia de um corpo esférico de CB através de uma amostra em corte que mostra a camada de revestimento exterior e a região interior dos corpos esferoidais. Pode ser visualizados detalhes da superfície externa, que consiste em camadas densas cobrindo uma microestrutura interna na forma de favos de mel. A região interna é composta de camadas interconectadas por fibras formando grandes poros com dimensões em torno de 0,6 μm a 500 μm . A Figura 12 (a) e a Figura 12 (c) mostram a estrutura interna que apresentam uma rede fibrosa de celulose com tamanhos nanométricos. A Figura 12 (b) mostra uma micrografia da superfície externa de uma esfera de celulose não submetida à purificação, onde podem ser observadas as bactérias inseridas na rede de nanofibras de celulose. Na Figura 12 (d) pode-se verificar a presença de uma rede densa de nanofibras de CB que estão cobrindo o corpo esférico de CB. Considerando as morfologias de cada amostra, não foram encontradas diferenças significativas entre qualquer estrutura analisada para um determinado processo.

Figura 12 – Micrografias de MEV da amostra 08 de CB esférica produzidas em cultura agitada. (A) corte transversal da amostra onde se visualiza a camada de revestimento exterior e a região interior dos corpos esféricos. (B) superfície de uma esfera de CB contendo bactérias inseridas na rede de nanocelulose (c) região interna do corpo esférico consistindo de rede porosa de nanofibras de CB. (D) região externa do corpo esférico consistindo de densas redes de nanofibras de CB.



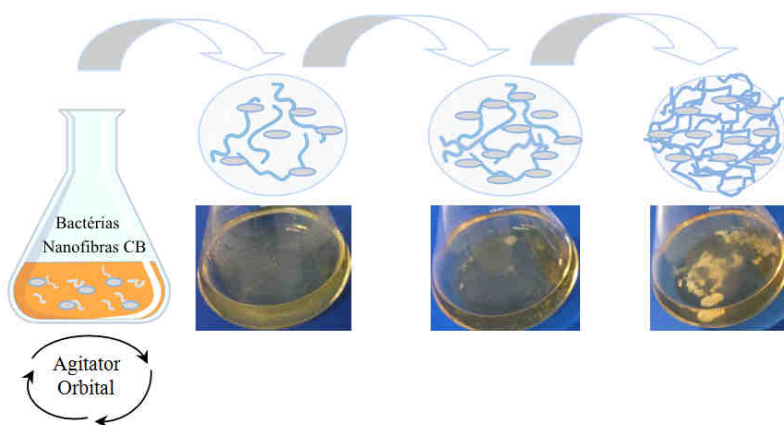
Fonte: Autor (2016).

Os parâmetros do processo e os fenômenos determinantes na formação de esferas de CB, em condições dinâmicas, não foram completamente esclarecidos. Nos últimos anos, foram realizados estudos para uma maior compreensão dos fenômenos inerentes as condições de cultura para a formação de corpos esféricos de CB, que incluem a densidade celular bacteriana, estirpe bacteriana, inserção *in-situ* de aditivos e condições dinâmicas. Estes parâmetros de processo parecem ser determinantes para o tamanho e dimensionalidade da forma final da CB. As fibras de celulose são sintetizadas e excretadas em feixes enquanto as bactérias se movem pelo meio de cultura. O inóculo inicial pode conter alguns resíduos de fibras de celulose que parecem ter um

papel importante na formação das esferas de CB por fornecerem uma estrutura preliminar de nucleação onde as células podem agregar e então formar esferas (HU; CATCHMARK; VOGLER, 2013). O biofilme consiste em um conglomerado de substâncias poliméricas extracelulares (EPS), produzidas principalmente pelos próprios organismos ali contidos. Esta estrutura forma uma arquitetura 3D responsável pela adesão às superfícies e pela coesão no biofilme (FLEMMING; WINGENDER, 2010).

A Figura 13 apresenta um esquema do possível mecanismo de formação de esferas. O inóculo contém células e resíduos de fibras. As células microbianas aderem nos resíduos de fibras para iniciar a formação do biofilme. Estas fibras podem proporcionar suporte estrutural para o crescimento das bactérias e nucleação inicial para a formação de esferas. No entanto, outros parâmetros do processo podem influenciar o mecanismo de formação de esferas, incluindo volume do inóculo, volume do meio, fonte de carbono, temperatura e velocidade de agitação, como demonstrado neste estudo.

Figura 13 – Ilustração esquemática da formação de celulose bacteriana esférica. As fotografias correspondem a diferentes tempos de cultura. Uma variação específica de parâmetros pode ser usada, e produz formas diferentes.



Fonte: Autor (2016).

3.4 CONCLUSÕES

A análise experimental dos parâmetros da produção de CB foi realizada conforme o planejamento experimental. A avaliação da massa seca e absorção de água de CB mostrou que a fonte de carbono, velocidade de agitação e a temperatura causaram um efeito positivo na formação de corpos esféricos. Outros parâmetros avaliados não causaram efeito significativo na produção de CB. A análise morfológica revelou a estrutura típica de CB e não foram observadas diferenças notáveis entre as amostras verificadas. Os resultados mostraram um caminho para uma produção mais controlada de CB com a utilização de cultura agitada, abrindo oportunidades para novas aplicações, como em fotocatalise e aplicações médicas.

CAPÍTULO 4

4 PREPARAÇÃO DE NANOCOMPÓSITO HIDROGEL DE CELULOSE BACTERIANA/DIÓXIDO DE TITÂNIO

4.1 INTRODUÇÃO

A celulose bacteriana é um biopolímero com propriedades interessantes, tais como a biocompatibilidade, elevada resistência à tração, elevada capacidade de absorção, retenção de água e alta cristalinidade. As nanopartículas de dióxido de titânio (TiO_2) são extremamente importantes em aplicações elétricas e fotocatalíticas, sensores e na área biomédica. Materiais multifuncionais, baseados em celulose bacteriana, com propriedades diferenciadas, podem ser projetados a partir do nanocompósito de CB/ TiO_2 pelo método *ex-situ* através de imersão sol-gel. Amostras foram produzidas como um nanocompósito constituídas por hidrogéis de CB/ TiO_2 . As caracterizações foram realizadas por microscopia eletrônica de varredura, espectroscopia de dispersão de energia (EDS) e espectroscopia de infravermelho por transformação de fourier (FTIR). A análise morfológica do nanocompósito revelou a existência de interação molecular e adesão entre nanopartículas de TiO_2 e a matriz de nanofibras celulósicas, encontrando-se o pico de titânio no espectro de EDS, comprovando a incorporação com êxito de nanopartículas. O FTIR mostrou modificação nos grupos funcionais, sugerindo interação entre os componentes. Deste modo, a fabricação de um nanocompósito de CB/ TiO_2 por método de imersão sol-gel apresenta um grande potencial para futuras aplicações.

4.2 MATERIAIS E MÉTODOS

4.2.1 Preparação das esferas de celulose bacteriana

A produção de esferas foi realizada com a bactéria *Komagataeibacter hansenii* ATCC 23769. O inóculo adotado para esta produção foi o mesmo utilizado previamente. As esferas foram produzidas sob cultura agitada em um agitador orbital. Os parâmetros adotados na produção de esferas seguiram os melhores resultados obtidos nos experimentos realizados no capítulo 3. Deste modo, a fonte de carbono utilizada foi o glicerol, volume de inóculo com valor de 10%, volume do meio e do frasco contendo 50 e 125 ml,

respectivamente. A velocidade de agitação foi mantida em 100 rpm com temperatura de incubação de 30 °C. O cultivo foi realizado durante quatro dias.

4.2.2 Preparação do nanocompósito celulose bacteriana/dióxido de titânio pelo método *ex-situ*

A solução sol-gel foi preparada pela imersão de 0,5 g de nanopartículas de TiO₂ (Evonik Degussa, P-25, tamanho das partículas aproximadamente 21 nm), em 25 ml de água deionizada. Subsequentemente, 2 g de hidrogéis de CB (previamente preparados) foram submergidos na solução sol-gel em um frasco Erlenmeyer de 125 ml. Em seguida, o frasco foi posicionado no agitador orbital (Tecnal TE-424) e agitado com a velocidade de 125 rpm em temperatura constante de 30 °C durante 3 horas. Por fim, as amostras foram congeladas e liofilizadas em -55 °C por 24 horas.

4.2.3 Caracterização por MEV, EDS e FTIR

As amostras foram inseridas em um *stub* de alumínio e fixadas sob uma fita dupla face de carbono. As superfícies das amostras foram cobertas com uma camada de ouro de 30 nm com a utilização de uma metalizadora Leica EM SCD 500. A análise em MEV foi realizada com um microscópio JEOL JSM-6390 LV, contendo acoplado em sua estrutura um dispositivo para a análise EDS da marca Thermo Scientific. Os elétrons foram acelerados com uma voltagem de 10 kV ocasionando um aumento de até 1500 vezes. O EDS foi medido em 5 regiões diferentes de cada amostra. O espectro FTIR foi obtido através de um espectrofotômetro FTIR Perkin Elmer Frontier equipado com um acessório de amostragem ATR universal para amostras sólidas na faixa de 600-400 cm⁻¹ com uma resolução média de 4 cm⁻¹ com 30 escaneamentos.

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

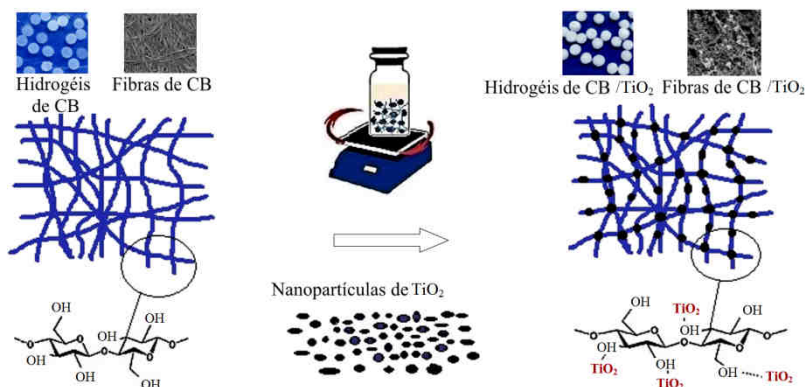
Devido à sua toxicidade, aglomeração e grande tamanho de partícula, alguns materiais orgânicos não podem ser adicionados diretamente ao meio de cultura durante a biossíntese de CB. Esta limitação pode ser superada através do método de imersão por redução, em sol-gel ou de reação de precipitação. Estes métodos permitem a impregnação de nanopartículas na estrutura porosa de nanofibrilas por

absorção física e por ligações covalentes e de hidrogênio (ROSS; MAYER; BENZIMAN, 1991).

Nanocompósitos funcionais baseados em CB foram produzidos pelo método *ex-situ* através da introdução de nanopartículas de TiO_2 via a imersão sol-gel. Os nanocompósitos foram preparados por imersão e agitação de hidrogéis de CB em uma dispersão sol de nanopartículas de TiO_2 em água deionizada, permitindo que as nanopartículas fossem mantidas e fixadas nos espaços entre as nanofibrilas da matriz do hidrogel, conforme pode ser observado no esquema mostrado na Figura 14. Os aditivos de TiO_2 foram incorporados com as cadeias de celulose por possíveis ligações de hidrogênio entre as fases orgânicas e inorgânicas. A CB tem uma grande quantidade de grupos hidroxílicos na sua superfície, onde, sua modificação pôde ser facilmente realizada, alcançando grupos funcionais e padrões de funcionalização usando a técnica *ex-situ* (SULAEVA; HENNIGES; ROSENAU, 2015). Os grupos hidroxílicos estão sempre presentes na superfície das fibrilas de CB e causam interação por ligações de hidrogênio entre as fibrilas de CB e a rede inorgânica hidrofílica sol-gel do TiO_2 . Em outras palavras, considerando-se os grupos hidroxílicos livres, as nanopartículas presentes na solução sol TiO_2 , ligaram-se à superfície das nanofibras de CB (UDDIN et al., 2007).

A estrutura de celulose contém locais quimicamente ativos devido a uma rede porosa 3D de nanofibras com uma grande área superficial, permitindo o aprisionamento mecânico de componentes secundários. Unidades organizadas de nanofibras tornam possível a adesão de várias macromoléculas e nanopartículas através da formação de interações não-covalentes. As cadeias poliglucanas geram a formação de ligações de hidrogênio entre as cadeias e os materiais secundários. As unidades de glicose contidas na celobiose permitem a substituição, oxidação ou desoxi-halogenação de grupos hidroxílicos, substituição ou oxidação do C_6 , oxidação do C_2 e C_3 e a hidrólise das ligações glicosídicas (YEH et al., 2014).

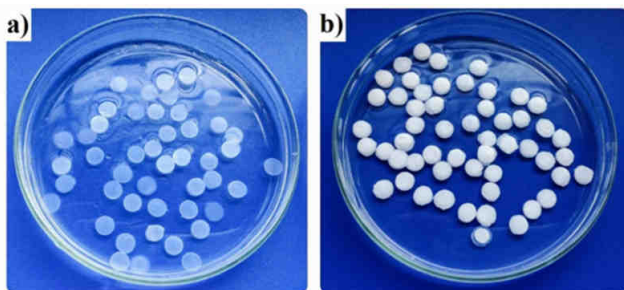
Figura 14 – Esquema da formação de nanocompósitos de CB/TiO₂.



Fonte: Autor (2016).

A Figura 15 apresenta uma fotografia dos hidrogéis de CB obtidos. Os hidrogéis de CB foram inseridos na solução de nanopartículas de TiO₂ previamente preparada e mantida em agitação para a incorporação das nanopartículas nas nanofibras de CB. Como pode ser visto na Figura 15a e na Figura 15b, ocorreu uma mudança na coloração dos hidrogéis de CB devido à introdução das nanopartículas de TiO₂, comprovando a adesão dos aditivos sobre a rede de fibras de celulose. Os hidrogéis de CB tornaram-se opacos.

Figura 15 – Fotografias de hidrogéis de CB. (a) Hidrogéis de CB. (b) Hidrogéis nanocompósitos de CB/TiO₂.



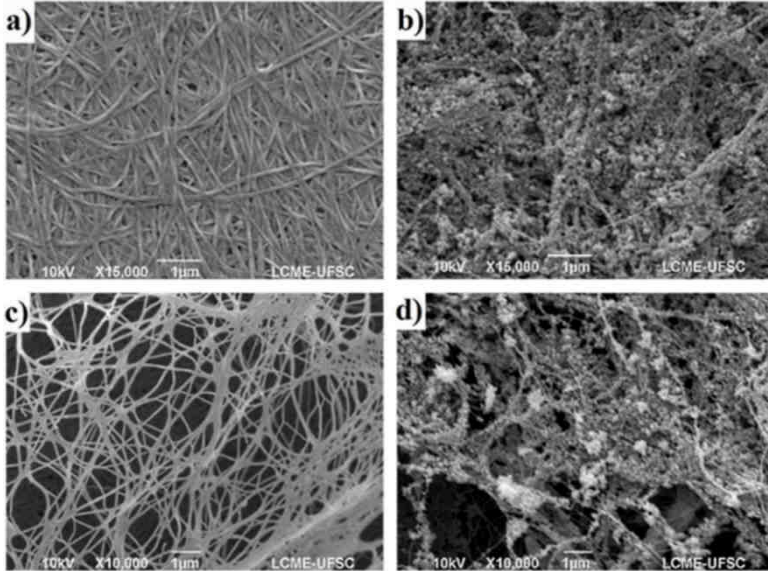
Fonte: Autor (2016).

As micrografias do MEV das superfícies da CB liofilizada e CB/TiO₂ são mostradas na Figura 16. A superfície dos hidrogéis de CB é formada por uma densa estrutura de rede de nanofibras interligadas de celulose (Figura 16a). Os nanocompósitos mostraram nanopartículas de TiO₂ enredadas e aderidas às nanofibras de celulose, como mostrado na Figura 16b. A estrutura de nanofibras gerou uma estrutura em rede organizada aleatoriamente tendo porosidade (Figura 16c). Esta geometria peculiar do arranjo de rede pode ser atribuída ao movimento irregular das bactérias durante a biossíntese de CB (ZHU et al., 2011).

As bactérias sob condições de cultura agitada tendem a formar microesferas de celulose, assim, a maior parte das bactérias são posicionadas na superfície do hidrogel formando uma casca com uma rede mais densa do que a sua região interior (GUTIERREZ et al., 2012).

A partir da Figura 16 pode-se observar com precisão as nanofibras de celulose revestidas por um grande número de nanopartículas de TiO₂.

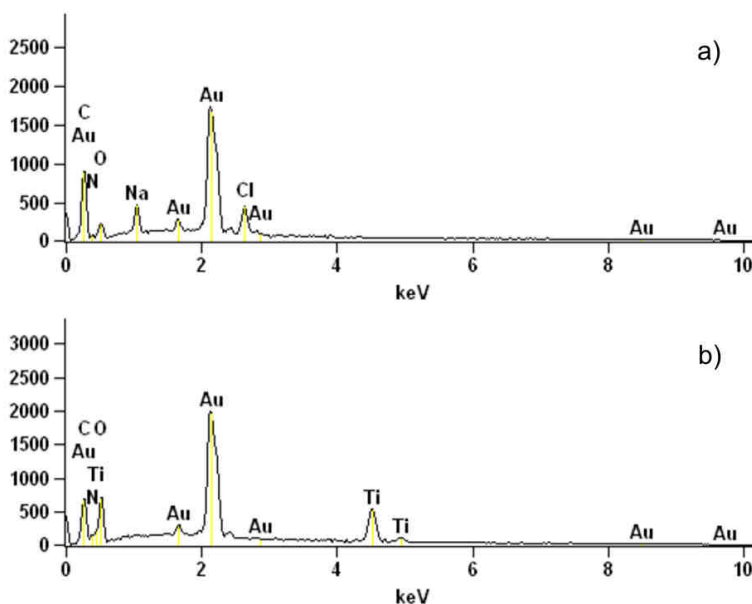
Figura 16 – Micrografias de MEV. Em (a) superfície da esfera constituída por uma rede de nanofibras de CB. Em (c) estrutura da região interior da esfera de CB. Em (b) superfície externa da esfera de CB com as nanofibras recobertas com nanopartículas de TiO_2 . Em (d) região interior da esfera de CB recobertas com nanopartículas de TiO_2 .



Fonte: Autor (2016).

A análise química foi caracterizada por EDS acoplado ao MEV. O espectro EDS indicou a presença de elementos químicos e análise quantitativa para CB e o nanocompósito CB/ TiO_2 . As medições foram obtidas a partir de cinco pontos das amostras e em diferentes locais da superfície (Figura 17).

Figura 17 – Em (a) espectro EDS da estrutura de CB e em (b) do nanocompósito de CB/TiO₂.



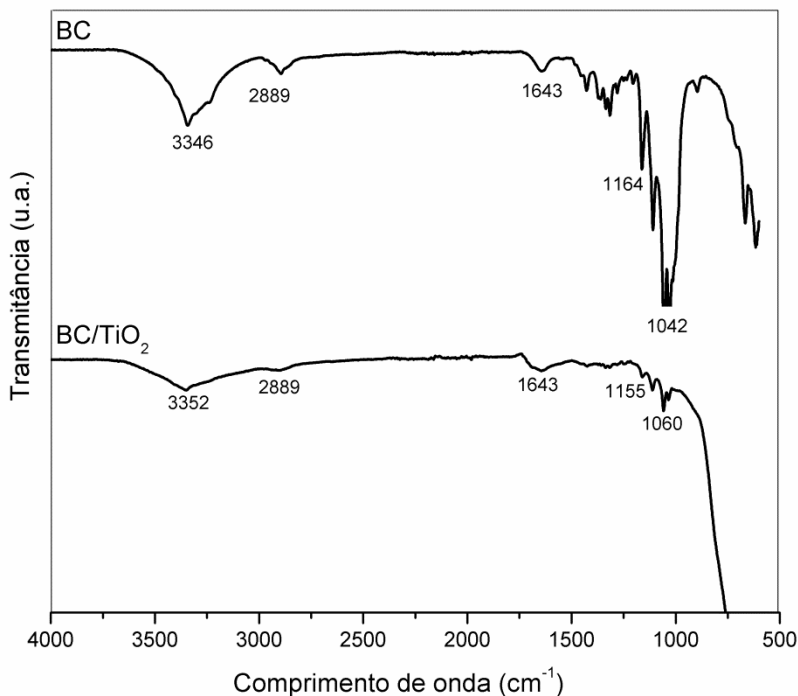
Fonte: Autor (2016).

A Figura 18a mostra o espectro da superfície de CB, que contém picos de carbono e de oxigênio a partir das moléculas de CB, enquanto que os picos de cloro e de sódio são derivados de impurezas contidas na água usada no processo de purificação da CB. Como mostrado na Figura 18b, a presença de nanopartículas de TiO₂ foi confirmada na matriz de CB devido à medição de picos do elemento titânio no espectro EDS. A quantidade média de titânio presente nas amostras foi de 32,82% em massa. Picos do elemento ouro são provindos do revestimento realizado sobre as amostras para permitir a caracterização por MEV.

Os espectros de CB e CB/TiO₂ são mostrados na Figura 18. Analisando os espectros ATR-FTIR de CB e de CB/TiO₂, observa-se que a banda de vibração de estiramento (O-H), característica de CB, apresentou um pequeno deslocamento de 3346 cm⁻¹ (CB) para 3352 cm⁻¹ (CB/TiO₂), que pode estar relacionado à interação entre os grupos hidroxílicos da CB com Ti-O. Devido à cobertura nas fibras por nanopartículas de TiO₂, o estiramento relativo a banda C-H (2889 cm⁻¹) foi bloqueado como resultado de impedimento estérico. As bandas de

CB/TiO₂ associados ao estiramento de C-OH (1042 cm⁻¹) e vibrações de flexão C-O-C (1164 cm⁻¹) foram deslocadas em relação a CB. Estas diferenças propõem que há interação entre CB e TiO₂ (MOHAMED et al., 2005; SUN; YANG; WANG, 2010).

Figura 18 – Espectro ATR-FTIR da estrutura pura de CB e do nanocompósito CB/TiO₂.



Fonte: Autor (2016).

O FTIR é uma espectroscopia de adsorção em locais de frequência IR que mostra a informação qualitativa sobre a presença de grupos funcionais e de ligação com a superfície de óxidos. O espectro IR reproduz um gráfico da radiação incidente versus a intensidade de radiação absorvida (OH et al., 2005). Foi importante verificar se as nanopartículas de TiO₂ foram aderidas na superfície das fibras de celulose. As investigações com o FTIR foram utilizadas para relatar a composição qualitativa do nanocompósito de CB/TiO₂ para verificar a

presença de interação química entre as nanopartículas de TiO_2 e as fibras de celulose.

4.4 CONCLUSÕES

As nanopartículas de TiO_2 foram incorporadas na estrutura de nanofibras de hidrogéis CB pelo método de imersão e agitação sol-gel, pois após o processo observou-se que a impregnação de TiO_2 na matriz celulósica resultou em uma mudança nas características físicas da estrutura CB, ficando opaca. A caracterização morfológica da estrutura revelou que o material nanocompósito compreende uma rede de nanofibras revestidas com uma grande quantidade de nanopartículas de TiO_2 , sugerindo a interação por ligações de hidrogênio entre os constituintes. A análise por EDS mostrou um espectro com picos do elemento titânio numa quantidade média de 32% em massa e realçou a interação entre a superfície da CB e as nanopartículas de TiO_2 . O espectros do FTIR propõem que há interação entre CB e TiO_2 . Estes materiais nanocompósitos têm potencial para aplicações antibacterianas e fotocatalíticas.

CAPÍTULO 5

5 PREPARAÇÃO DE NANOCOMPÓSITOS DE CELULOSE BACTERIANA/DIÓXIDO DE TITÂNIO VIA MÉTODOS *IN-SITU* E *EX-SITU* PARA APLICAÇÕES FOTOCATALÍTICAS

5.1 INTRODUÇÃO

Foram produzidas amostras nanocompósitas de CB/TiO₂ através dos métodos *ex-situ* e *in-situ*. As caracterizações para a avaliação morfológica foram realizadas por MEV e as caracterizações químicas foram efetuadas via EDS. As análises via MEV dos nanocompósitos revelaram a existência de interação molecular e adesão entre as nanopartículas e a matriz de nanofibras celulósicas. Os espectros EDS revelaram picos de titânio, comprovando a incorporação com êxito das nanopartículas. Testes para a avaliação da atividade de adsorção e fotocatalise foram efetuados nos nanocompósitos, e os resultados mostraram altos índices de remoção do corante. Deste modo, a fabricação dos nanocompósitos e sua posterior aplicação em atividades fotocatalíticas mostraram um grande potencial para futuras aplicações.

5.2 MATERIAIS E MÉTODOS

5.2.1 Preparação dos corpos esféricos de celulose bacteriana

A produção de esferas foi realizada com a bactéria *Komagataeibacter hansenii* ATCC 23769. As esferas foram produzidas sob cultura agitada em um agitador orbital. Os parâmetros adotados na produção de esferas seguiram os melhores resultados obtidos dos experimentos realizados de produção de esferas de CB no capítulo 3. Optou-se por utilizar a condição de cultivo que produziu esferas com morfologia estrelada, por ter maior área de contato. Deste modo, a fonte de carbono utilizada foi o glicerol, volume de inóculo com valor de 10%, volume do meio e do frasco contendo 50 e 125 ml, respectivamente. A velocidade de agitação foi mantida em 100 rpm com temperatura de incubação de 30 °C.

5.2.2 Obtenção via os métodos *in-situ* e *ex-situ* dos nanocompósitos de celulose bacteriana/dióxido de titânio

A inserção das nanopartículas de TiO_2 na matriz de CB utilizando o método *ex-situ* seguiu as mesmas etapas e procedimentos descritos anteriormente (Capítulo 4). A CB foi adicionada em um frasco Erlenmeyer de 250 ml junto com pó esférico de TiO_2 (Evonik Degussa, P-25) e inserido em um agitador orbital com agitação, temperatura e tempo controlados.

Referente ao método de inserção das nanopartículas na matriz de fibras de CB utilizando o método *in-situ* também foi utilizado na confecção dos nanocompósitos de acordo com Li et al, (2015) com adaptações. Deste modo, 2 g de hidrogéis de CB foram misturadas a 300 ml de água deionizada contendo 4,0 ml de ácido sulfúrico 65%, sob agitação, seguido da adição por gotejamento de 700 μL de $\text{TiOSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{SO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$. A mistura seguiu sob agitação a temperatura de 70 °C durante 4,5 horas. Por fim, as amostras foram lavadas com água destilada até a remoção completa de todos os resíduos.

5.2.3 Caracterização via MEV e EDS

As amostras foram inseridas em um *stub* de alumínio e fixadas sob uma fita dupla face de carbono. As superfícies das amostras foram cobertas com uma camada de ouro de 30 nm com a utilização de uma Leica EM SCD 500. A análise em MEV foi realizada com um microscópio JEOL JSM-6390 LV, contendo acoplado em sua estrutura um dispositivo para a análise EDS da marca Thermo Scientific. Os elétrons foram acelerados com uma voltagem de 10 kV ocasionando um aumento de até 1500 vezes. O EDS foi medido em 5 regiões diferentes de cada amostra

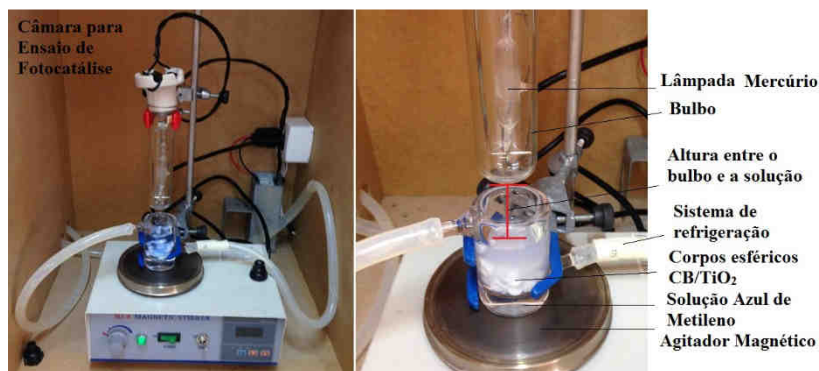
5.2.4 Ensaio de fotocatalise

Utilizou-se um sistema para a realização dos testes de fotocatalise com a seguinte configuração: câmara de proteção confeccionada em madeira, um reator com sistema de refrigeração por água e agitação, uma lâmpada de vapor de mercúrio (Philips HPL-N 125 W) com bulbo de vidro posicionado a 3,5 cm acima da superfície da solução, conforme pode ser observado na Figura 19.

Na realização do teste, 1 g de nanocompósitos de CB/ TiO_2 , na forma de hidrogel, produzidos *in-situ* e *ex-situ*, foram imersos em uma

solução contendo 50 ml de azul de metileno ($10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) com pH 5,5, sob agitação e imediatamente colocadas sob a irradiação de uma lâmpada de vapor de mercúrio. O sistema foi mantido em temperatura ambiente e a solução foi irradiada durante 35 minutos. Amostras da solução de azul de metileno foram coletadas em quantidades aproximadas de 1 mL, nos diferentes tempos de 0, 10, 15, 25 e 35 minutos e medidos em relação a sua absorbância em 664 nm em um espectrofotômetro visível (BEL - PHOTONICS, modelo 1105).

Figura 19 – Sistema para a realização dos ensaios de fotocatalise.



Fonte: Autor (2016).

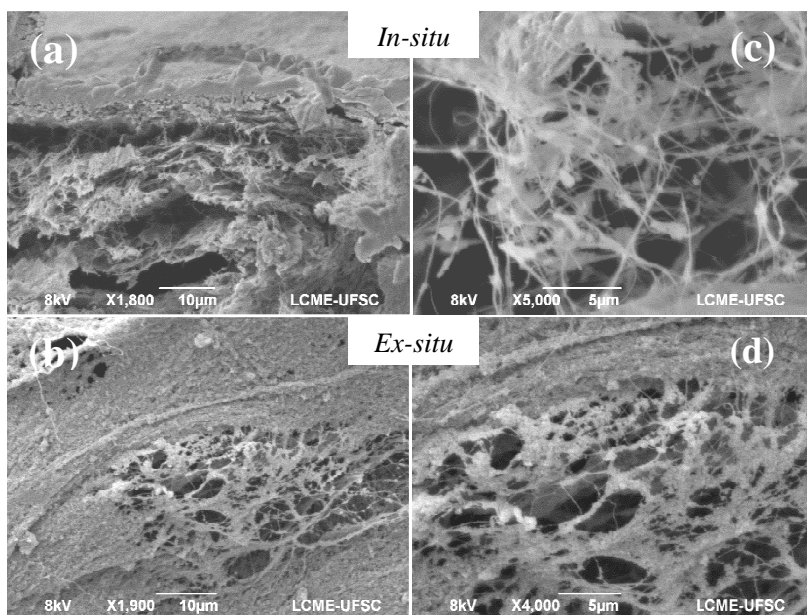
5.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Corpos nanocompósitos com formato esferoidal estrelados, baseados em CB, foram produzidos pelo método *ex-situ* e *in-situ* através da introdução de nanopartículas de TiO_2 via imersão sol-gel e através da reação de síntese de partículas de TiO_2 , respectivamente. Ambos os métodos de inserção do TiO_2 na matriz de fibras de CB permitiram que as nanopartículas fossem mantidas e fixadas nos espaços entre as nanofibrilas da matriz do hidrogel. As nanopartículas de TiO_2 foram incorporadas com as cadeias de CB através de ligações de hidrogênio. A CB contém seis grupos hidroxílicos livres em cada monômero, deste modo, existe grande possibilidade de modificação devido à grande reatividade dos grupos funcionais.

As micrografias do MEV das superfícies dos nanocompósitos de CB/TiO_2 são mostradas na Figura 20. A Figura 20 (a e c) representam as imagens de MEV dos nanocompósitos confeccionados via a síntese do titânio pelo método *in-situ*. Em (a) é apresentada uma densa camada na

superfície da esfera e em (c) pode-se observar nanopartículas de TiO_2 enredadas e aderidas à rede interconectada de nanofibras de CB. A Figura 20 (b e d) representam as imagens de MEV dos nanocompósitos confeccionados via a síntese do titânio pelo método *ex-situ*. Neste caso, é visível a presença das nanopartículas cobrindo a superfície das nanofibras celulósicas formada por uma densa estrutura de nanofibras interligadas de CB. É possível observar em ambas nas imagens um grande número de nanopartículas de TiO_2 enredadas e aderidas às nanofibras de CB. A análise visual em relação a todas as imagens aparenta uma quantidade maior de nanopartículas de TiO_2 aderidas às nanofibras de CB da amostra confeccionada via o método *ex-situ*.

Figura 20 – Micrografias de MEV de amostras nanocompósitas de CB/ TiO_2 . As imagens 20 (a e c) representam o nanocompósito confeccionado via o método *in-situ* e as imagens 20 (b e d) representam o nanocompósito confeccionado via o método *ex-situ*.

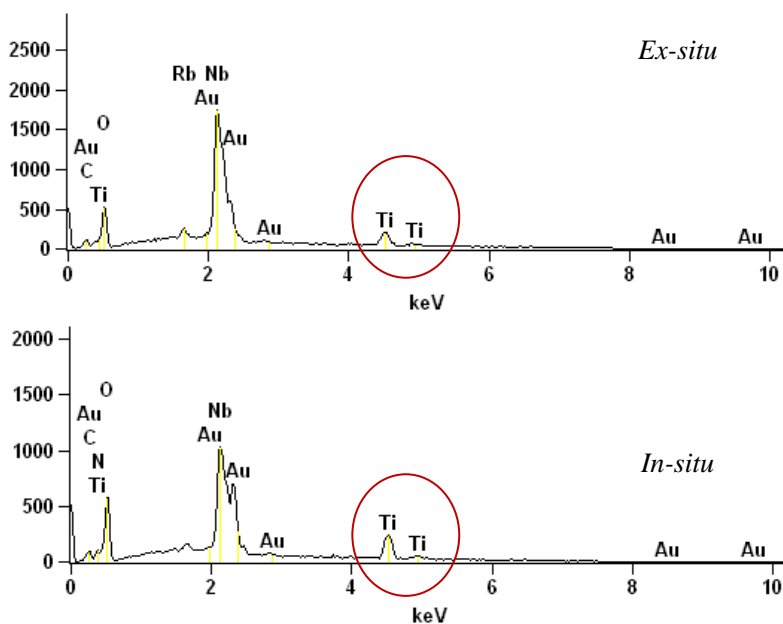


Fonte: Autor (2016).

O EDS foi utilizado como ferramenta para a análise química, via sistema acoplado ao MEV. O espectro de EDS indicou a presença de elementos químicos, dispersão uniforme e análise quantitativa para os

nanocompósitos CB/TiO₂ *in-situ* e *ex-situ*. As medições foram tomadas a partir de cinco pontos das amostras e em diferentes locais da superfície. A Figura 21 mostra os espectros de ambos os materiais. Podendo verificar a presença de picos de titânio, fato que comprova a inserção com êxito do TiO₂. A análise de EDS também gerou valores estimados dos percentuais de titânio anexados em cada amostra, tendo encontrado 26 e 14,6% de titânio nas amostras *ex-situ* e *in-situ*, respectivamente.

Figura 21 – Espectros EDS dos nanocompósito de CB/TiO₂ confeccionados via método *in-situ* e *ex-situ*.



Fonte: Autor (2016).

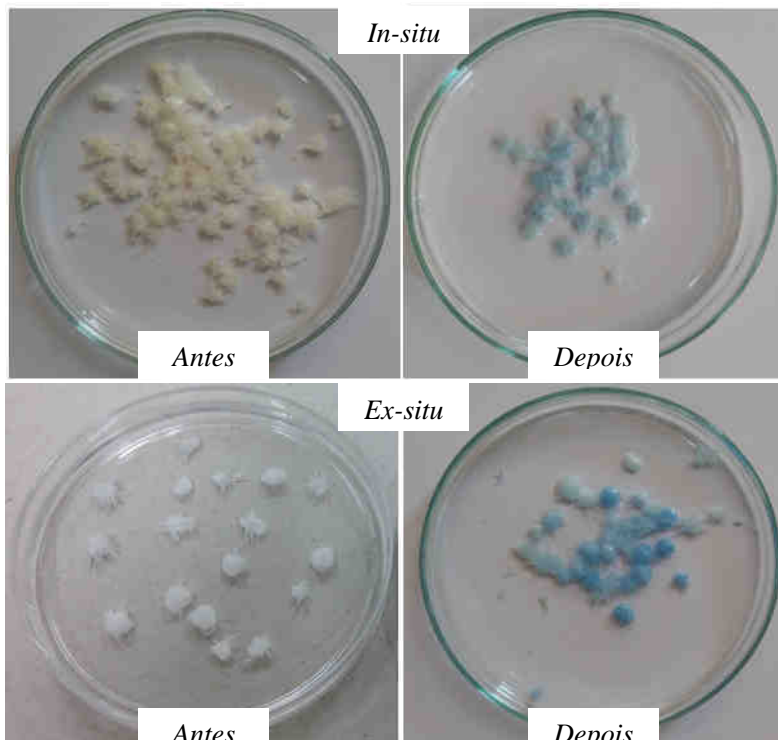
A obtenção de amostras de nanocompósitos de CB/TiO₂ *ex-situ* e *in-situ* objetivou aplicações de adsorção e fotocatalise, assim, ambas as amostras foram submetidas à avaliação da atividade de adsorção e de fotocatalise.

A adsorção é uma operação de transferência de massa que analisa a capacidade que sólidos contém de armazenar substâncias em sua

superfície provindas de fluidos. A substância que se acumula na interface do material é denominada adsorbato e a superfície sólida a qual o adsorbato se acumula é denominada de adsorbente (RUTHVEN, 1984). Existem dois mecanismos baseados na remoção das substâncias de fluidos via adsorção, quimissorção e fisissorção, sendo via química e física, respectivamente. Na adsorção física ocorre interação fraca entre os componentes (Van der Waals) e na química ocorre à troca ou partilha de elétrons formando ligações fortes. Deste modo, os nanocompósitos foram testados em relação a sua capacidade de adsorção em soluções de azul de metileno. As amostras foram inseridas na solução de azul de metileno e permaneceram sob agitação sem a presença da lâmpada. Através de um espectrofotômetro visível foi possível medir a absorbância da solução de azul de metileno. A medição inicial da solução de azul de metileno, ou seja, antes do início, acusou um valor de 0,048 u.a. Após o início do ensaio, a solução foi medida nos tempos de 10, 15, 25 e 35 minutos.

A Figura 22 apresenta a fotografia dos nanocompósitos de CB/TiO₂ fabricados via os métodos *in-situ* e *ex-situ* antes e após o término do ensaio de adsorção (35 minutos). Como pode ser observado, após a realização do teste em ambos os casos ocorreu uma mudança na coloração das amostras, indo do branco para o azul, devido à adsorção do corante azul de metileno. A mudança de coloração da amostra via inserção *ex-situ* apresenta uma mudança mais acentuada em relação à amostra fabricada via inserção *in-situ*. Estas mudanças de cor comprovam a remoção do corante pelas amostras após a realização do teste.

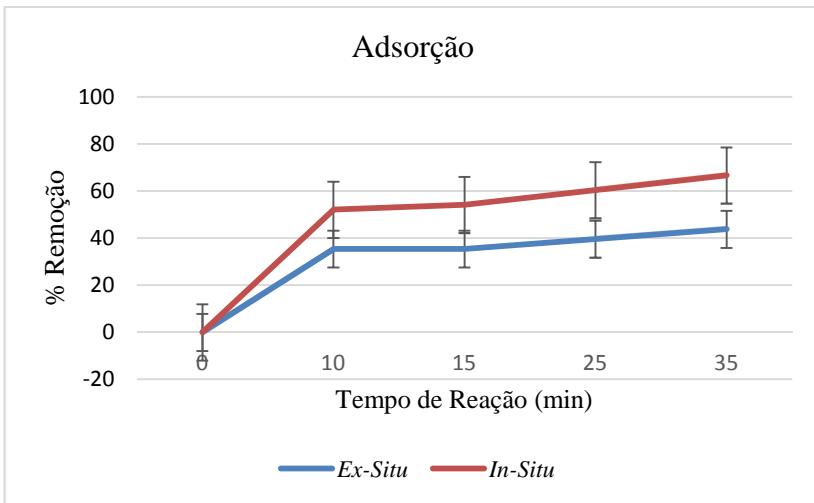
Figura 22 – Fotografias das amostras de CB/TiO₂ antes e após o teste de adsorção por 35 min.



Fonte: Autor (2016).

Para a avaliação do efeito de adsorção sobre os materiais compósitos baseados em CB/TiO₂ foram realizados experimentos para avaliar a cinética de adsorção para a obtenção do percentual de remoção do corante após 35 minutos. Os resultados para os materiais fabricados via *in-situ* e *ex-situ* podem ser verificados na Figura 23. A cinética de adsorção representada pelo material *ex-situ* atingiu percentuais de redução de 35,41, 35,41, 39,58 e 43,75 %, sendo que o material *in-situ* alcançou 52,08, 54,16, 60,41 e 66,66 % após os tempos de 10, 15, 25 e 35 minutos, respectivamente.

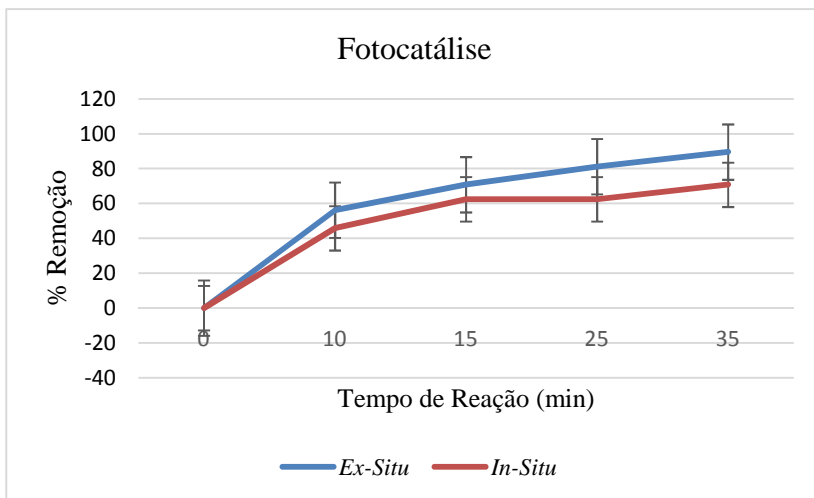
Figura 23 – Gráfico do ensaio de adsorção de azul de metileno pelos nanocompósitos de CB/TiO₂ *in-situ* e *ex-situ*.



Fonte: Autor (2016).

O teste para a avaliação da fotocatalise seguiu os mesmos procedimentos adotados no teste de adsorção anterior, no entanto, uma lâmpada de vapor de mercúrio foi acoplada ao reator. A Figura 24 apresenta um gráfico com os resultados da fotocatalise plotados em relação ao percentual de remoção pelo tempo de reação. Observa-se que o material *in situ* atingiu percentuais de remoção de 45,83, 62,5, 62,5 e 70,83 %, sendo que o material *ex-situ* alcançou 56,25, 70,83, 81,25 e 89,58 % após os tempos de 10, 15, 25 e 35 minutos, respectivamente.

Figura 24 – Gráfico da atividade fotocatalítica dos nanocompósitos de CB/TiO₂ *in-situ* e *ex-situ* relacionados ao percentual de remoção de azul de metileno pelo tempo de ensaio.



Fonte: Autor (2016).

5.4 CONCLUSÕES

Neste estudo foi possível desenvolver nanocompósitos de CB/TiO₂ via os métodos de inserção de nanopartículas *ex-situ* e *in-situ*. As micrografias de MEV confirmaram a adesão das nanopartículas de TiO₂ à rede de fibras de CB, assim como a análise em EDS revelou a presença de picos de titânio nos espectros confirmando a presença do TiO₂. Os ensaios de adsorção e fotocatalise foram realizados alcançou-se uma remoção do corante através do nanocompósito *ex-situ* de 89,58% após 35 minutos do início do teste contra 70,83% de remoção do corante pelo nanocompósito *in-situ*. A comparação entre os ensaios de adsorção e fotocatalise mostrou que para o material *in-situ* a fotocatalise ocasionou um aumento de 4,17% de remoção do corante, enquanto que no material *ex-situ* ocorreu um aumento de 45,83%, enfatizando um maior potencial para a adição de partículas TiO₂ (P25) em CB para aplicações de fotocatalise. Os materiais alcançaram bons resultados e apresentam potencial para a aplicação industrial.

CAPÍTULO 6

6 CONCLUSÕES E SUGESTÕES FUTURAS

6.1 CONCLUSÕES

A produção e desenvolvimento de corpos esféricos de CB foram efetuados. O estudo dos parâmetros inerentes à produção de CB em cultura agitada mostrou uma direção para uma produção mais controlada de corpos esféricos de CB objetivando um maior rendimento e geometrias esféricas.

As amostras produzidas com as geometrias mais esféricas de CB foram utilizadas como matriz para a incorporação de nanopartículas de TiO_2 . Estas nanopartículas foram inseridas na matriz celulósica de CB através do método *ex-situ* ou imersão sol-gel e também através da síntese de TiO_2 sobre as fibras de CB através de método *in-situ*. Ambos os métodos foram realizados para a incorporação do TiO_2 na matriz celulósica, resultando na formação de nanocompósitos de CB/ TiO_2 .

Ensaio para avaliar a atividade de fotocatalise foram realizados nos nanocompósitos de CB/ TiO_2 . Ambos os materiais avaliados alcançaram um elevado percentual de remoção do corante de azul de metileno, sendo que as amostras confeccionadas via o método *ex-situ* obtiveram uma remoção de 89,58% e as confeccionadas via o método *in-situ* alcançaram 70,83% em 35 minutos de teste, contra 43,75% e 66,66% para os testes de adsorção. Estes resultados demonstraram que a inserção de partículas de TiO_2 via o método *ex-situ* em CB esférica apresentaram um maior potencial para a fotocatalise em relação as partículas de TiO_2 sintetizadas nas nanofibras de celulose via o método *in-situ*.

Este trabalho proporcionou o desenvolvimento de novos materiais e novas práticas de produção de CB e nanocompósitos de CB/ TiO_2 . Existe grande potencial e gama de aplicações para os novos materiais desenvolvidos, tais como, em aplicações biomédicas (tratamento de feridas e liberação liberada de fármacos) e em aplicações fotocatalíticas (tratamento de efluentes).

6.2 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

A partir do estudo desenvolvido foi possível destacar algumas questões para trabalhos futuros, que se encontram listadas a seguir:

- Realizar a variação dos parâmetros inerentes as inserções de nanopartículas de TiO_2 na matriz de CB para ambos os métodos, tais como, a quantidade de reagentes de titânio e os efeitos da temperatura.
- Efetuar testes da atividade de fotocatalise em corpos esféricos puros de CB e em nanocompósitos de CB/ TiO_2 com diferentes concentrações de titânio e confeccionados em diferentes temperaturas.
- Utilizar os nanocompósitos de CB/ TiO_2 que obtiveram os melhores resultados nos testes da atividade de fotocatalise em aplicações indústrias, tais como, para a remoção de corantes dos efluentes da indústria de tecidos.

REFERÊNCIAS

- BOOTTEN, T.J.; HARRIS, P.J.; MELTON, L.D.; NEWMAN, R.H. WAXS and ^{13}C NMR study of *Gluconoacetobacter xylinus* cellulose in composites with tamarind xyloglucan, *Carbohydrate Research*, v. 343, n. 2, p. 221–229, 2008.
- BROWN, A. J. An acetic ferment which forms cellulose, *Journal of the Chemical Society*, v. 49, p. 432-439, 1886.
- BUXBAUM, G. *Industrial inorganic pigments*, Weinheim: Wiley-VCH, v. 2, p. 43- 70, 1997.
- CAO, G.; YANG, W. *Nanostructures and Nanomaterials: Synthesis, Properties, and Applications*, World Scientific, v. 2, n. 2, 2004.
- CHAO, Y.; ISHIDA, T.; SUGANO, Y.; SHODA, M. Bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum* in a 50-L internal-loop airlift reactor, *Biotechnol. Bioeng.*, v. 68, n. 3, p. 345-352, 2000.
- CHAWLA, P. R.; BAJAJ, I. B.; SURVASE, S. A.; SINGHAL, R. S. *Microbial Cellulose: Fermentative Production and Applications*, *Food Technology and Biotechnology*, v. 47, n. 2, p. 107-124, 2009.
- CHEN, X.; MAO, S. S. Titanium dioxide nanomaterials: synthesis, properties, modifications, and applications, *Chem. Rev.*, v. 107, p. 2891-2959, 2007.
- CZAJA, W.; ROMANOVICZ, D.; BROWN JR, M. Structural investigations of microbial cellulose produced in stationary and agitated culture. *Cellulose*, v. 11, p. 403-411, 2004.
- CZAJA, W.; KRYSZYNOWICZ, A.; BIELECKI, S.; BROWN JR, M. Microbial cellulose - the natural, *Biomaterials*, v. 27, n. 2, p. 145-151, 2006.
- CZAJA, W.; YOUNG, D. J.; KAWECKI, M.; BROWN JR, R. M. The future prospects of microbial cellulose in biomedical applications, *Biomacromolecules*, v. 8, n. 1, p. 1-12, 2007.

DAOUD, W. A.; XIN, J. H.; ZHANG, I. Surface functionalization of cellulose fibers with titanium dioxide nanoparticles and their combined bactericidal activities. *Surface Science*, v. 599, p. 69-75, 2005.

DIEBOLD, U. The surface science of titanium dioxide, *Surface Science Reports*, v. 48, p. 53-229, 2003.

ESA, F.; TASIRIN, M. S.; RAHMAN, A. N. Overview of Bacterial Cellulose Production and Application, *Agriculture and Agricultural Science Procedia*, v. 2, p. 113–119, 2014.

FLEMMING, H.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology*, v.8, p.623-633, 2010.

FRIEDRICH, K.; SCHLARN, A. K. Tribology of polymeric nanocomposites, *Friction and wear of bulk materials and coatings*, v. 2, 2013.

FUJISHIMA, A.; ZHANG, X.; TRYK, D. A. TiO₂ photocatalysis and related surface phenomena. *Surface Science Reports*, v. 63, p. 515–582, 2008.

GALKINA, O. L.; SYCHEVA, A.; BLAGODATSKIY, A.; KAPTAY, G., KATANAIEV, V. L.; SEISENABEVA, G. The sol–gel synthesis of cotton/TiO₂ composites and their antibacterial properties. *Surface & Coatings Technology*, v. 253, p. 171-179, 2014.

GONÇALVES, G. A. B. Synthesis and characterization of TiO₂/cellulose nanocomposites, Universidade de Aveiro, *Dissertação de Mestrado*, Aveiro, 2007.

GUTIERREZ, J.; TERCJAK, A.; ALGAR, I.; RETEGI, A.; MONDRAGON, I. Conductive properties of TiO₂/bacterial cellulose hybrid fibres, *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 377, p. 88-93, 2012.

HU, Y.; CATCHMARK, J. M.; VOGLER, J. Factors Impacting the Formation of Sphere-Like Bacterial Cellulose, *Biomacromolecules*, v. 14, n. 10, p. 3444-3452, 2013.

KESHK, S.; SAMESHIMA, K. Evaluation of different carbon sources for bacterial cellulose production. *African Journal of Biotechnology*, v.4, p.478-482, 2005.

KLEMM, D.; SCHUMANN, D.; UDHARDT, U.; MARSCH, S. Bacterial synthesized cellulose – artificial blood vessels for microsurgery, *Prog. Polym. Sci.*, v. 26, p. 1561-1603, 2001.

KLEMM, D.; HEUBLEIN, B.; FINK, H.; BOHN, A. Cellulose: Fascinating Biopolymer and Sustainable Raw Material, *Angew. Chem.*, v. 44, p. 3358 – 3393, 2005.

LI, Y.; TIAN, C.; TIAN, H.; ZHANG, J.; HE, X.; PING, W.; LEI, H. Improvement of Bacterial Cellulose production by *Aceobacter xylinum* DSMZ-2004 on poor quality horticultural substrates using the Taguchi Method for media optimization. Part I, *Cellulose Chem. Technol.*, v. 47, n. 1-2, p. 61-68, 2013.

LI, Y.; CAO, L.; LI, L. YANG, C. In situ growing directional spindle TiO₂ nanocrystals on cellulose fibers for enhanced Pb²⁺ adsorption from water. *Journal of Hazardous Materials*, v. 289, p. 140–148, 2015.

LINSEBIGLER, A. L.; LU, G. Q.; YATES, J. T. Photocatalysis on TiO₂ surfaces - principles, mechanisms, and selected results. *Chem. Rev.*, v. 95, n. 3, p. 735-758, 1995.

MOHAMED, M. A.; SALLEH, W. M. N.; JAAFAR, J.; ISAMIL, A. F.; MUTALIB, M. B.; JAMIL, S. M. Incorporation of N-doped TiO₂ nanorods in regenerated cellulose thin films fabricated from recycled newspaper as a green portable photocatalyst. *Carbohydrate Polymers*, v. 133, p. 429-437, 2005.

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.

OH, S. Y.; YOO, D. I.; SHINB, Y.; SEO, G. FTIR analysis of cellulose treated with sodium hydroxide and carbon dioxide. *Carbohydrate Research*, v. 340, p. 417-428, 2005.

RECOUVREUX, D.; RAMBO, C. R.; BERTI, F. V.; CARMINATTI, C. A. Novel three-dimensional cocoon-like hydrogels for soft tissue regeneration, *Materials Science and Engineering C*, v. 31, p. 151–157, 2011.

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

RUTHVEN, D. M. *Principles of Adsorption and Adsorption Process*. New York: John Wiley & Sons, 1984.

SULAEVA, I.; HENNIGES, U.; ROSENAU, T.; POTTHAST, A. Bacterial cellulose as a material for wound treatment: Properties and modifications. A review. *Biotechnology Advances*, v. 33, p. 1547-1571, 2015.

SUN, D.; YANG, J.; WANG, X. Bacterial cellulose/TiO₂ hybrid nanofibers prepared by the surface hydrolysis method with molecular precision. *Nanoscale*, v. 2, p. 287-292, 2010.

UDDIN, M. J.; CESANO, F.; BONINO, F.; BORDIGA, F.; SPOTO, G.; SCARANO, D.; ZECCHINA, A. Photoactive TiO₂ films on cellulose fibres: synthesis and characterization. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, v. 189, p. 286-294, 2007.

VIANA, M. M. Estudo de filmes finos e materiais particulados de TiO₂ e de Ag/TiO₂ produzidos pelo processo sol-gel, Universidade Federal de Minas Gerais, Tese de Doutorado, Belo Horizonte, 2011.

YAMADA Y.; YUKPHAN P.; LAN VU H.T.; MURAMATSU, Y.; OCHAIKUL, D., TANASUPAWAT, S.; NAKAGAWA, Y. Description of *Komagataeibacter* gen. nov., with proposals of new combinations (*Acetobacteraceae*). *J. Gen. Appl. Microbiol.*, v. 58, p.397-404, 2012.

YEH, S.; CHEN, Y.; HIS, C.; KO, H.; WANG, M. Thermal Behavior and Phase Transformation of TiO₂ Nanocrystallites Prepared by a Coprecipitation Route. *Metallurgical and Materials Transactions A*, v. 45, n. 1, p. 261-268, 2014.

ZHU, H.; SHIRU, J.; WAN, T.; JIA, Y.; YANG, H.; LI, J.; YAN, L.; ZHONG, C. Biosynthesis of spherical Fe_3O_4 /bacterial cellulose nanocomposites as adsorbents for heavy metal ions. *Carbohydrate Polymers*, v. 86, p. 1558-1564, 2011.

APÊNDICE A

PRODUÇÃO CIENTÍFICA

Trabalhos publicados em revistas indexadas internacionalmente

BRANDES, R.; CARMINATTI, C.; MIKOWSKI, A.; AL-QURESHI, H.; RECOUVREUX, D. A Mini-review on the Progress of Spherical Bacterial Cellulose Production, *Journal of Nano Research*, v. 45, p. 142-154, 2017.

BRANDES, R.; SOUZA, L.; VARGAS, V.; MIKOWSKI, A.; CARMINATTI, C.; AL-QURESHI, H.; RECOUVREUX, D. Preparation and characterization of bacterial cellulose/TiO₂ hydrogel nanocomposite. *Journal of Nano Research*, v. 43, p. 73-80, 2016.

Trabalhos submetidos em revistas indexadas internacionalmente

BRANDES, R.; SOUZA, L.; OLIVEIRA, E.; CARMINATTI, C.; AL-QURESHI, H.; ANTÔNIO, R.; RECOUVREUX, D. Effect of Processing Parameters on the Spherical Bacterial Cellulose Formation, *Materials Research*.