



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

LUISA MACEDO DE VASCONCELOS

**MICRO-ONDAS COMO UM MÉTODO ALTERNATIVO PARA A OXIDAÇÃO DE
CELULOSE BACTERIANA**

FORTALEZA

2020

LUISA MACEDO DE VASCONCELOS

MICRO-ONDAS COMO UM MÉTODO ALTERNATIVO PARA A OXIDAÇÃO DE
CELULOSE BACTERIANA

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do grau de bacharela em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Silveira Vieira

FORTALEZA

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

V45m Vasconcelos, Luisa Macedo de.
Micro-ondas como método alternativo para a oxidação de celulose bacteriana / Luisa Macedo de Vasconcelos. – 2020.
65 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Curso de Biotecnologia, Fortaleza, 2020.
Orientação: Prof. Dr. Rodrigo Silveira Vieira.

1. Celulose bacteriana . 2. Micro-ondas. 3. Oxidação por periodato. 4. Modificação química. I. Título.

CDD 661

LUISA MACEDO DE VASCONCELOS

MICRO-ONDAS COMO UM MÉTODO ALTERNATIVO PARA A OXIDAÇÃO DE
CELULOSE BACTERIANA

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Curso de Graduação em Biotecnologia do
Centro de Ciências da Universidade Federal do
Ceará, como requisito parcial à obtenção do
grau de bacharela em Biotecnologia.

Aprovada em: 19 de maio de 2020

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Rodrigo Silveira Vieira (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. André Luis Coelho da Silva
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dra. Niédja Fittipaldi Vasconcelos
Universidade Federal do Ceará (UFC)

À minha mãe e ao meu pai, por tudo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família pelo apoio e amor sem condições. Em particular, gostaria de agradecer aos meus pais, Hilma e Igor, aos meus avós, Melânia, Vilma e Gerardo e ao Padim.

Ao Prof. Rodrigo Silveira Vieira pela oportunidade, orientação e investimento na minha carreira e à Professora Fábيا Karine de Andrade pelo apoio e disponibilidade.

À Dra. Niédja Fittipaldi Vasconcelos por sua dedicação, tempo, paciência e amizade durante esses anos. À MSc. Érika Patrícia por todo seu ensino, ajuda e compreensão. A presença de vocês engrandeceu imensamente a produção desse trabalho e minha experiência de iniciação científica.

Agradeço em particular ao Prof. André Luis Coelho por ser um professor solícito e suas aulas cheias de curiosidades. Agradeço pelo tempo e atenção cedidos durante sua participação na banca examinadora desse trabalho.

Aos colegas do NPL, Isabela, Lana, Lorena, Nonato, Rúbens e Thamyres, e aos colegas da Embrapa, Celso, Daniel, Diego, Fábio, Matheus, Mayara, Natália, Rayanne e Vivânia por compartilhar trabalho, ideias e o dia-a-dia comigo. Um agradecimento especial às colegas de grupo Evellheyn Rebouças e Sandy Lucindo pela amizade, conversas e apoio.

Aos amigos que esses quatro anos me trouxeram, Andrielly, Diego, Guilherme, Igor, Joaquim, Lívia, Marcella, Markos e Thaís, e aos amigos que me acompanham desde o começo, Ana Vitória, Clara Gomes, Clara Norões e Kate por dividir comigo todos os momentos felizes e me apoiar durante todas as frustrações.

À Universidade Federal do Ceará (UFC) e todo o colegiado do curso de Bacharelado em Biotecnologia pela excelente formação. Às coordenadoras Profa. Cristina Paiva e Profa. Márjory Holanda, e ao Gilmar Ferreira da Costa por toda dedicação e apoio.

Ao Grupo de Pesquisa em Separações por Adsorção (GPSA/UFC), em particular o Núcleo de Pesquisas em Lubrificantes pela formação de qualidade. À Embrapa Agroindústria Tropical, em especial ao Laboratório de Tecnologia da Biomassa (LTB) e Laboratório de Microbiologia de Alimentos e toda sua equipe pela infraestrutura e apoio na realização dos experimentos.

Aos profissionais do LTB, LMA e NPL, Jane, Adriano, Amanda, Régia, Andrea e Carol, cujo trabalho, esforço e apoio tornaram possível o desenvolvimento dessa pesquisa e de incontáveis outras além.

Ao Prof. Diego Lomonaco e a equipe do Laboratório de Produtos e Tecnologia em Processos (LPT/UFC) pelos ensinamentos e por me conceder o uso do equipamento de micro-ondas.

Gostaria de agradecer à Central Analítica-UFC/CT-INFRA/MCTI-SISNANO/Pró-Equipamentos CAPES pela produção de imagens de MEV e ao Prof. Enrique Rodríguez Castellón (Universidade de Málaga) pelas medidas de XPS.

Por fim, agradeço ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), pelo auxílio financeiro que possibilitou minha formação e minha pesquisa.

RESUMO

Celulose bacteriana (CB) é um polímero natural cujas características específicas possibilitam sua aplicação em uma profusão de diferentes áreas, principalmente para produtos de valor agregado. A modificação química é uma ferramenta que introduz nova funcionalidade ao material, aumentando seu potencial para aplicações específicas. Nesse contexto, a oxidação por periodato de sódio é uma modificação química tradicional e muito usada que gera 2,3-dialdeído celulose, mas possui a inconveniência de ser um processo bastante longo. Com o intuito de otimizar o processo, esse trabalho utilizou irradiação por micro-ondas como fonte de calor para reduzir o tempo de reação e avaliou as características físicas e químicas do material gerado. Membranas úmidas de CB foram oxidadas com duas concentrações de NaIO_4 (0,75% ou 1%) sob condições controladas de tempo e temperatura. A CB oxidada com micro-ondas foi caracterizada por MEV, FTIR, TGA e XPS e quanto ao grau de oxidação e os resultados obtidos foram contrastados com CB oxidada obtida sob aquecimento térmico comum. Resultados mostraram que as membranas oxidadas em micro-ondas tiveram níveis de oxidação significativamente maiores que aquelas oxidadas em banho-maria sob as mesmas condições. Em especial, o uso de alta concentração de NaIO_4 e irradiação de micro-ondas permitiu converter 73% da celulose em 30 minutos. As técnicas de FTIR e XPS confirmaram que a oxidação por micro-ondas foi efetiva, pois houve a formação de aldeídos na estrutura do polímero. XPS também mostrou a formação de ácidos carboxílicos para todas as condições, indicando uma segunda oxidação dos aldeídos. A TGA indicou que a CB oxidada em micro-ondas apresenta melhor estabilidade térmica que a contraparte convencional. Resultados de MEV demonstraram que a oxidação em micro-ondas não causou o mesmo desgaste da microestrutura que a oxidação convencional, concordando assim com a análise térmica. Afinal, oxidação assistida por micro-ondas é um bom veículo para a modificação de celulose bacteriana, gerando uma oxidação maior na mesma condição de tempo, temperatura e concentração de periodato em relação à oxidação convencional.

Palavras-chave: Celulose bacteriana. Modificação química. Oxidação por periodato. Micro-ondas.

ABSTRACT

Bacterial cellulose (BC) is a natural polymer whose specific properties enable its application in a multitude of different areas, mainly for high value products. Chemical modification can introduce new functionality to the material, increasing its potential for specific applications. In this context, sodium periodate oxidation is a popular and simple chemical modification that generates 2,3-dialdehyde cellulose. However, the process is often quite long. As a means of optimizing the process, microwave radiation was applied as a heat source to reduce reaction times and the products chemical and physical properties were evaluated. BC membranes were oxidized with two concentrations of NaIO_4 (0.75% or 1%) under controlled conditions of time and temperature. Microwave oxidized CB was characterized by SEM, FTIR, TGA and XPS and by determining oxidation degree and the results obtained were contrasted with oxidized CB under conventional thermal heating. Results demonstrated that microwave-assisted oxidized membranes had oxidation levels significantly higher than those oxidized in a water bath under the same conditions. The use of a high concentration of NaIO_4 and microwave irradiation allowed to convert 73% of the cellulose in 30 minutes. FTIR and XPS confirmed that the microwave-assisted oxidation was effective, for there was formation of aldehyde groups in the polymer's structure. XPS also exhibited an additional formation of carboxylic acids for all samples, indicating a second oxidation of aldehyde groups. TGA indicated that microwave oxidized CB has better thermal stability than its conventionally oxidized counterpart. SEM images reported less degradation of CB microstructure in microwave oxidized samples than conventionally oxidized samples. Ultimately, microwave-assisted oxidation is a good vehicle for the modification of bacterial cellulose, generating greater oxidation in the same intervals of time, temperature and oxidizing agent concentration compared to conventional oxidation.

Keywords: Bacterial cellulose. Chemical modification. Periodate oxidation. Microwave

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação da estrutura química da celulose.	19
Figura 2 – Modelo esquemático da síntese da celulose por bactérias gram-negativas. . .	21
Figura 3 – (a) Micrografia de fitas de CB sendo excretadas, e imagens de (b) CB produzidas na forma de <i>pellets</i> e (c) membranas de espessuras diferentes.	21
Figura 4 – Aplicações de celulose bacteriana na indústria de alimento	24
Figura 5 – Produtos de CB para a pele como (a) máscara para rosto Celmat ® Professional Biocellulose Mask, (b) curativo para lesões cutâneas Nexfill e (c) Suprasorb ® X	26
Figura 6 – Mecanismo de oxidação de celulose por periodato	30
Figura 7 – Estratégia experimental do trabalho esquematizada.	35
Figura 8 – Representação esquemática dos experimentos de oxidação de celulose bacteriana	37
Figura 9 – Curva padrão de concentração de periodato de sódio	38
Figura 10 – Fotografias das membranas de CB não modificada (c), (a) CBOx-30-Conv-0,75%, (b) CBOx-30-Conv-1%, (d) CBOx-30-MO-0,75%, e (e) CBOx-30-MO-1%	41
Figura 11 – Espectros de FTIR das membranas (a) CB, (b) CBOx-30-Conv-0,75% e (c) CBOx-30-MO-0,75%.	44
Figura 12 – Espectros de FTIR das membranas (a) CB, (b) CBOx-30-Conv-1% e (c) CBOx-30-MO-1%.	45
Figura 13 – Análise termogravimétrica das membranas de CB e CBOx	46
Figura 14 – Curva da derivada da massa obtida a partir da análise termogravimétrica das membranas de CB e CBOx	48
Figura 15 – (a) Micrografia da superfície da membrana de CB e (b) histograma de distribuição de diâmetro de fibra	49
Figura 16 – (a) Micrografia da superfície da membrana de CBOx-30-Conv-1% e (b) histograma de distribuição de diâmetro de fibra	50
Figura 17 – (a) Micrografia da superfície da membrana de CBOx-30-MO-1% e (b) histograma de distribuição de diâmetro de fibra	51

Figura 18 – Deconvolução dos espectros C1s para as membranas (a) CB sem modificação química, (b) CBOx-30-Conv-0,75%, (c) CBOx-30-MO-0,75% e (d) CBOx-30-MO-1%. Em cada figura, C1 representa a contribuição das ligações C–C e C–H, C2 representa a contribuição de C–O, C3 representa C=O e O–C–O e C4, O–C=O. 54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Conversão de celulose para DAC - DAC preparada a partir de polpa de celulose vegetal (DP = 650) com $0.25 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ NaIO}_4$ a 60°C	29
Tabela 2 – Compilação de aplicações de micro-ondas para otimizar processos químicos	34
Tabela 3 – Resumo dos experimentos de oxidação da membrana úmida de CB. O método de aquecimento convencional usado foi banho-maria, isolado da luz e sem agitação	37
Tabela 4 – Graus de oxidação obtidos em triplicata para as membranas de CBOx	42
Tabela 5 – Temperaturas de <i>onset</i> de degradação térmica e temperatura de máxima degradação da CB e CBOx	47
Tabela 6 – Composição química das amostras de CB e CBOx. A composição está em porcentagem do total	52
Tabela 7 – Razão atômica de carbono e oxigênio e contribuição dos estados químicos do carbono na deconvolução dos espectros C1s obtido por XPS	52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CB	celulose bacteriana
UV	ultravioleta
UDP-Glc	uridina-difosfato-glicose
DP	grau de polimerização
HS	Hestrin-Schramm
PVA	álcool polivinílico
PEG	polietilenoglicol
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
MCC	celulose microcristalina
AZADO	2-azaadamantane n-oxil
TEMPO	2,2,6,6-tetrametilpiperidina 1-oxil
DAC	2,3-dialdeído celulose
RMN	resonância magnética nuclear
FTIR	espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier
MO	micro-ondas
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
CBOx	celulose bacteriana oxidada
GOx	grau de oxidação
ATR	reflexão total atenuada
TGA	análise termogravimétrica
MEV	microscopia eletrônica de varredura
XPS	espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X

LISTA DE SÍMBOLOS

T_{onset}	temperatura de início da degradação
T_{max}	temperatura de máxima degradação
m_s	massa seca
®	marca registrada

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	OBJETIVO	18
2.1	Objetivos específicos:	18
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
3.1	Celulose: visão geral	19
3.2	Celulose bacteriana (CB)	20
3.2.1	<i>Síntese da CB</i>	20
3.2.2	<i>Características da CB</i>	22
3.3	Celulose bacteriana como material de interesse industrial	23
3.3.1	<i>Indústria alimentícia</i>	23
3.3.2	<i>Ambiental e agrícola</i>	24
3.3.3	<i>Cosmética</i>	25
3.3.4	<i>Biomédica</i>	25
3.3.4.1	<i>Curativos cutâneos</i>	25
3.3.4.2	<i>Liberção de fármacos</i>	26
3.3.4.3	<i>Implantes e scaffolds</i>	27
3.4	Oxidação da celulose	28
3.5	Irradiação de micro-ondas	31
4	METODOLOGIA	35
4.1	Produção de membranas de celulose bacteriana	35
4.2	Purificação da celulose bacteriana	36
4.3	Oxidação da membrana de celulose	36
4.4	Técnicas de caracterização	37
4.4.1	<i>Grau de oxidação (GOx)</i>	37
4.4.2	<i>Infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)</i>	39
4.4.3	<i>Análise termogravimétrica (TGA)</i>	39
4.4.4	<i>Microscopia eletrônica de varredura (MEV)</i>	39
4.4.5	<i>Espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X (XPS)</i>	40
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	41

5.1	Efeito do tempo, da concentração de agente oxidante e da propagação de calor no GOx	42
5.2	Comprovação da modificação química por FTIR	44
5.3	Avaliação das características térmicas	46
5.4	Morfologia do material oxidado	49
5.5	Avaliação da composição química por XPS	51
6	CONCLUSÕES	56
7	TRABALHOS FUTUROS	57
	REFERÊNCIAS	58

1 INTRODUÇÃO

A celulose bacteriana (CB) é um homopolímero natural de glicose produzido por uma gama de bactérias gram-negativas, aeróbicas e não patogênicas que tem ganhado espaço em nichos do mercado como matéria-prima de produtos de valor agregado. As características físicas e químicas da CB – pureza, estrutura tridimensional nanométrica, alta porosidade, cristalinidade e ótima estabilidade química – a tornam um material ideal para diversas indústrias incluindo a alimentícia (1), cosmética (2), e agrícola (3). Entretanto, é na indústria de biomateriais e produtos farmacêuticos que a CB tem recebido mais atenção devido a sua biocompatibilidade e pluralidade de aplicações (4).

À medida que se buscam novas utilidades para a CB, também se buscam novos métodos para otimizar as características químicas, físicas, biológicas e mecânicas do material, a fim de torná-lo mais apropriado a uma aplicação específica. Reações químicas são amplamente usadas para gerar modificações específicas e controladas sobre o material. Para que seja viável, o processo deve ser simples, de baixo custo e deve ser seguro para o manipulador e o ambiente.

Dentre os métodos de modificação química, a oxidação de celulose com periodato gera novas possibilidades. O íon periodato causa a quebra dos anéis de glicopirranose das cadeias de celulose e insere grupos aldeído na estrutura, gerando assim um produto mais reativo, menos cristalino e mais biodegradável (5). A oxidação por periodato é um processo bem estabelecido e amplamente adotado, porém ainda apresenta alguns fatores limitantes, particularmente o tempo de reação, já que as metodologias estabelecidas na literatura requerem várias horas de reação. Processos longos, além de ser um investimento de tempo e energia, mantêm a CB sob condições severas de pH e temperatura que podem levar à degradação do material.

Irradiação de micro-ondas é um método de aquecimento caracterizado pela transferência homogênea e quase instantânea de energia. Quando micro-ondas interagem com substâncias polares ocorre a transformação de energia eletromagnética em energia cinética para as moléculas (6). O uso do micro-ondas é bem estabelecido na literatura como forma de diminuir tempo de reação e garantir melhores rendimentos de produto. Nesse trabalho foi proposto aplicar irradiação de micro-ondas à oxidação por periodato de celulose bacteriana e utilizar métodos químicos e físicos para descrever o material oxidado. Ao fim, determinou-se que o micro-ondas é uma alternativa viável aos métodos convencionais.

Nesse trabalho foi proposto o uso da irradiação de micro-ondas para oxidar membranas úmidas de celulose bacteriana. Métodos químicos e físicos foram usados para descrever o

material oxidado. Ao fim, determinou-se que o micro-ondas é uma alternativa viável para oxidar as membranas de CB quando comparado aos métodos tradicionais que demandam muito tempo.

O objetivo do trabalho foi aplicar irradiação de micro-ondas sobre membranas de CB com o uso de periodato de sódio a fim de comparar seu desempenho em relação ao método tradicional de oxidação.

2 OBJETIVO

O objetivo principal deste trabalho de conclusão de curso é a oxidação de membranas de celulose bacteriana úmidas com o uso de micro-ondas de alta potência e a caracterização do produto por técnicas químicas e físicas, visando estabelecer o uso de micro-ondas como um método alternativo eficiente para oxidar celulose bacteriana com periodato de sódio.

2.1 Objetivos específicos:

- Avaliar a eficácia da aplicação de micro-ondas na oxidação de membranas de celulose bacteriana;
- Determinar o grau de oxidação das membranas oxidadas;
- Avaliar a influência do tempo, concentração de agente oxidante e tipo de propagação de calor sobre o grau de oxidação das membranas;
- Comprovar a modificação química do material por FTIR e XPS;
- Avaliar as características térmicas do material oxidado por TGA;
- Estudar as modificações morfológicas sofridas pelo material por MEV.

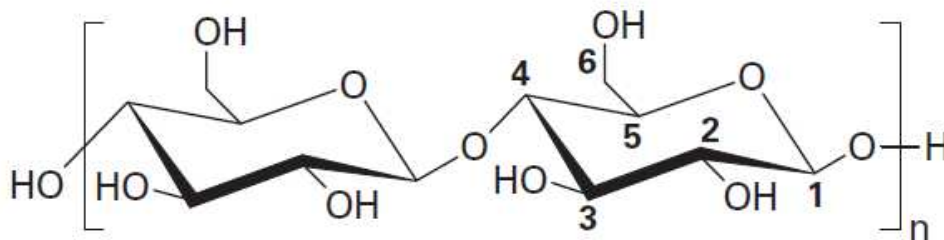
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Celulose: visão geral

Celulose é o polímero natural mais abundante do planeta, compondo aproximadamente um terço de toda a biomassa vegetal do planeta. Ela é produzida por uma gama de organismos, como algas, líquens, fungos, bactérias e algumas espécies de tunicatos (7), embora sua abundância seja primariamente devida às plantas vascularizadas, cuja produção global é estimada em $1,5 \times 10^{12}$ toneladas por ano (8). Nas células vegetais a celulose é o componente principal da parede celular e é tipicamente associada a outros polímeros naturais como lignina, hemicelulose e pectinas. Assim, as indústrias que utilizam celulose como matéria prima – de papel, têxtil e combustível – tem como fonte principal a matéria vegetal.

Quimicamente, a celulose é um homopolímero linear cuja unidade monomérica é a celobiose que, por sua vez, é formada pela esterificação de duas moléculas de D-glicopiranoses unidas por ligações β -1,4-glicosídicas. Ligações do tipo β ocorrem entre moléculas cuja hidroxila do carbono anomérico está em posição trans, a 180° da hidroxila do carbono 2. Assim, cada unidade de glicose está rotacionada em relação à vizinha, como ilustrado na Figura 1. Subsequentemente, a união de centenas de unidades de celobiose forma uma molécula de celulose linear. Essa configuração permite a formação de pontes de hidrogênio entre moléculas de celulose paralelas que caracteriza a microfibrila de celulose, que tem uma estrutura rígida e alta resistência a tração (9, 10).

Figura 1 – Representação da estrutura química da celulose.



Fonte: Dufresne, 2012 (9)

A composição química da celulose é independente da sua origem, porém a estrutura – a maneira como moléculas de celulose são organizadas dentro de uma microfibrila e a maneira como microfibrilas são organizadas entre si – varia com o organismo produtor e influencia suas propriedades físicas e mecânicas.

3.2 Celulose bacteriana (CB)

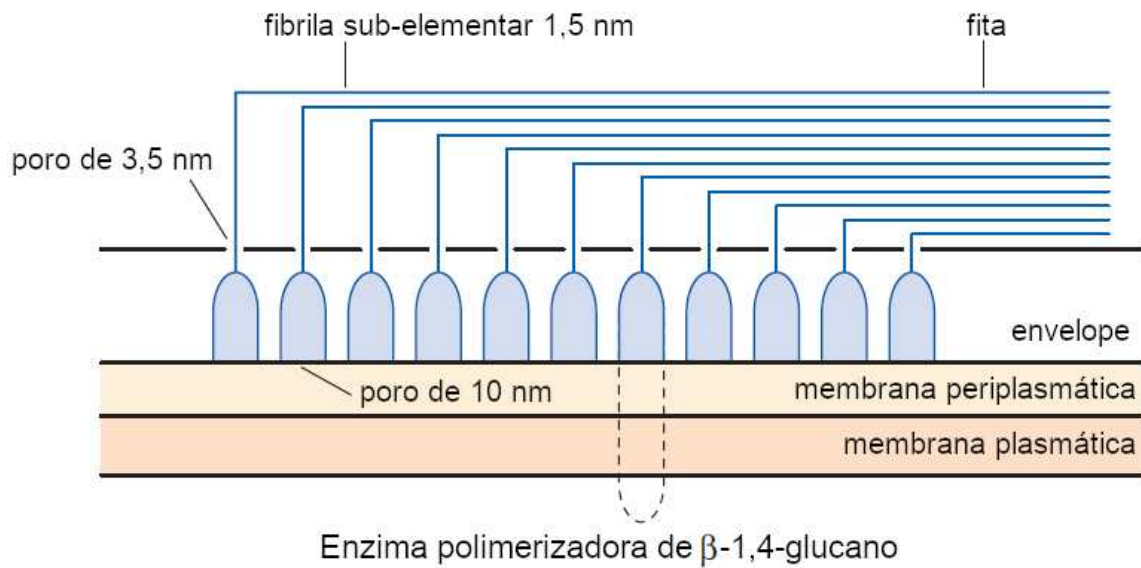
Celulose bacteriana (CB) foi descrita pela primeira vez por Brown que, em 1886, observou a produção de uma membrana gelatinosa por *Acetobacter xylinum* na interface entre o mosto e o ar de uma dorna de fermentação de vinagre (11). Desde então foram identificados vários outros táxons passíveis de produzir CB, como *Azotobacter*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Acetobacter*, *Komagataeibacter*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Rhizobium* e a bactéria gram-positiva *Sarcina ventriculi* (12). Para a bactéria, a CB é um metabólito secundário secretável e atua como um mecanismo de defesa, protegendo a comunidade microbiana de fatores ambientais, tais como a radiação ultravioleta (UV) e toxinas nocivas, além de manter a umidade do microambiente (13).

3.2.1 Síntese da CB

A síntese da CB é um processo complexo, dependente de oxigênio e tem como matéria prima carboidratos simples como glicose, sucrose e manitol (14). A síntese inicia-se no citoplasma, onde ocorre a formação de uridina-difosfato-glicose (UDP-Glc) pela ação da UDPG-pirofosforilase. No organismo procarioto, UDP-Glc é a precursora direta da celulose e é polimerizada pelo complexo celulose sintetase, localizado na membrana plasmática (14, 15, 16). As fibrilas de celulose formadas são secretadas através de poros na membrana. Esses poros estão dispostos linearmente e apresentam diâmetro de 3 a 4 nm (17). Essas estruturas foram esquematizadas na Figura 2. As fibrilas secretadas se agregam em nanofibras com forma de fitas chamadas *ribbons* e, ainda na escala nanométrica, chegam a apresentar entre 3 e 4 nm de espessura e 20 a 100 nm de largura (17).

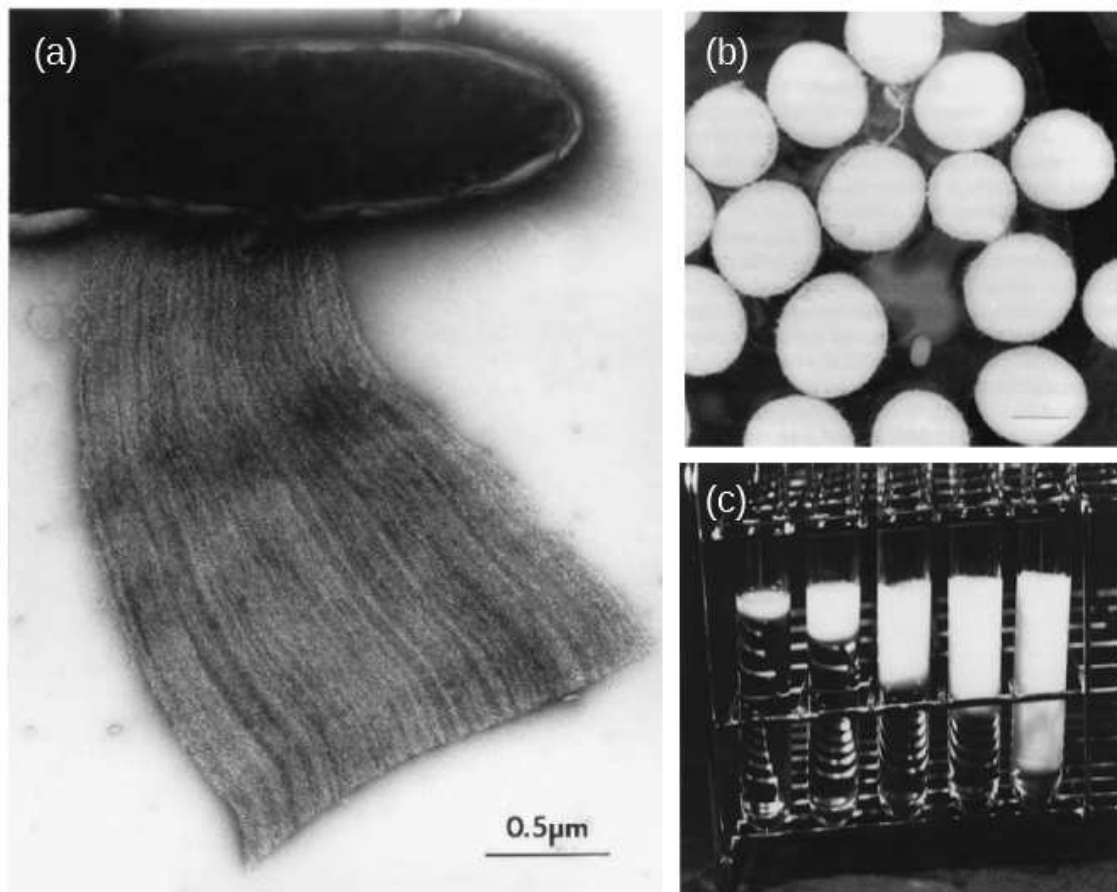
Nanofibras são depositadas em camadas na interface entre o meio de cultura e o ar onde elas se entrelaçam e formam uma estrutura. A micrografia apresentada na Figura 3(a) mostra fitas de celulose sendo secretadas. A eficiência de produção é o fator mais importante a ser considerado ao se produzir a CB em escala industrial e depende muito da espécie e cepa de bactéria, da fase de crescimento da cultura e das condições de cultivo (1, 18). Atualmente, as cepas mais exploradas para produção da CB comercial pertencem ao gênero *Komagataeibacter* (previamente classificado como parte do gênero *Gluconacetobacter*) (19).

Figura 2 – Modelo esquemático da síntese da celulose por bactérias gram-negativas.



Fonte: Dufresne, 2012 (9), adaptado

Figura 3 – (a) Micrografia de fitas de CB sendo excretadas, e imagens de (b) CB produzidas na forma de *pellets* e (c) membranas de espessuras diferentes.



Fonte: (a) Hirai, Tsuji e Horii, 2002 (17), (b) Iguchi, Yamanaka e Budhiono, 2000 (20) e (c) Czaja, Romanovicz e Brown, 2004 (21)

3.2.2 Características da CB

A CB difere de celulose vegetal em vários aspectos. A CB não se encontra associada a outras macromoléculas como ligninas e hemiceluloses, possibilitando que o processo de purificação seja mais simples, rápido e sem a necessidade do uso de processos químicos agressivos ao material ou ao meio ambiente (8). A espessura da fibra pode ser até 100 vezes menor que a fibra de celulose vegetal (22), dando ao material uma razão superfície/volume muito alta e sua porosidade característica. A CB é extremamente hidrofílica e retém até 100 vezes o seu próprio peso em água (23). Por razão de sua estrutura nanométrica, a CB apresenta maiores índices de cristalinidade e grau de polimerização (DP) do que a celulose vegetal (12, 16), alta resistência a tração (24), alto módulo de Young (em média 15 GPa) (25, 24), boa flexibilidade e moldabilidade (26).

Existe uma maior versatilidade na produção da CB por ser um produto microbiano. Variar as condições de cultivo permite modificar as características e a quantidade do material. Fermentação estática, um processo sem turbulência no meio de cultura, produz CB na forma de membranas ou filmes, de espessura e tamanho definidos pelo tempo de cultivo e pelas dimensões do recipiente, respectivamente. Já na fermentação agitada, turbulência é gerada no meio de cultura e permite uma melhor transferência de oxigênio. Como oxigênio é um fator limitante na síntese da CB a fermentação agitada possibilita uma maior produção. Neste caso, a CB é sintetizada na forma de *pellets*, esferas de tamanhos que podem ser controlados (27) e que possuem menor cristalinidade e grau de polimerização (21, 27) que a CB em forma de membrana. As Figuras 3(b) e 3(c) mostram CBs produzidas na forma de membranas e esferas, respectivamente. Logo, o tipo de cultivo depende da aplicação final da celulose.

O meio comercial para produção de CB é o meio Hestrin-Schramm (HS) (28), um meio complexo e rico em glicose. Apesar da popularidade do meio HS, CB tem a vantagem de ser cultivável em vários outros meios de cultura como, por exemplo, resíduos orgânicos, o que diminui significativamente o custo de produção (1). O gênero *Gluconacetobacter* em particular é capaz de metabolizar vários açúcares e alguns álcoois de fontes diferentes. Sucos, resíduos agroindustriais de cana-de-açúcar, arroz, frutas, tubérculos e resíduos de cervejarias e destilarias foram estudados para produção de CB (16, 29, 30, 31).

Alguns estudos demonstraram que a presença de outras macromoléculas no meio de cultura, como hemiceluloses em resíduos agroindustriais, são incorporadas à membrana de celulose durante o cultivo (32). Assim, culturas complexas podem gerar CBs de qualidade e

estruturas diferentes. Porém, essa habilidade também pode ser manipulada para produção de copolímeros e compósitos específicos *in situ*. A incorporação de quitosana no meio de cultura leva à síntese de um copolímero com propriedades superiores à da CB natural da mesma cepa (33, 34). Adição de álcool polivinílico (PVA) (35, 36) ou polietilenoglicol (PEG) (37) ao meio de cultura forma nanocompósitos com morfologias variáveis de acordo com a quantidade de PEG ou PVA no meio de cultura.

3.3 Celulose bacteriana como material de interesse industrial

É amplamente reconhecido que celulose bacteriana tem custo de produção bem acima da celulose de origem vegetal, então não é viável para as principais indústrias de celulose – papel, têxtil e combustíveis – que são produtos de baixo custo. Porém, as características específicas da CB asseguram espaço em nichos do mercado como produto de valor agregado (38).

3.3.1 Indústria alimentícia

Existe uma gama de possíveis aplicações da CB na indústria alimentícia. A celulose é “generally recognized as safe” (reconhecido como seguro) pela *Food and Drug Administration* (FDA) dos Estados Unidos (39) e não possui sabor nem valor calórico, pois ela não é digerida por seres humanos. Atualmente, há vários derivados de celulose vegetal usados como aditivos alimentícios, principalmente como estabilizantes (14, 22).

Celulose microcristalina (MCC) de origem vegetal é usada como estabilizante e modificador de textura em vários alimentos processados. Em bebidas, MCC é usada para manter partículas em suspensão. Em cremes, molhos e sobremesas congeladas, MCC pode substituir gorduras e ajuda a manter a textura do produto independente de mudanças de temperatura (40).

Já a celulose bacteriana está no mercado na forma de nata de coco, uma sobremesa filipina, e seus derivados. A CB pode ter tanto seu sabor, quanto a sua textura modificada e, assim preencher uma demanda de mercado por sobremesas e doces de baixa caloria (41, 42). A CB produzida juntamente a uma cultura do fungo *Monascus sp.* que produz monacolina K, uma substância usada para tratar hipercolesterolemia (colesterol alto), foi proposta como base alimentícia para substituir carnes processadas (43). A CB também tem grande potencial como substituinte de gorduras (22, 44). Lin e Lin demonstraram que a substituição parcial das gorduras em bolinhos de carne por CB não modificava o gosto ou a textura do alimento (46).

Tangente à produção de alimento, celulose bacteriana é um potencial material de embalagem para alimentos. Por ser reconhecida como segura, CB pode ser associada a outros compostos para desenvolver filmes biodegradáveis, comestíveis ou descartáveis, para verduras e carnes (47, 48). A Figura 4 ilustra as diversas aplicações de CB na indústria alimentícia.

Figura 4 – Aplicações de celulose bacteriana na indústria de alimento



Fonte: Shi *et al.*, 2014 (41), adaptado

3.3.2 Ambiental e agrícola

Celulose bacteriana tem sido usada como matriz ou suporte para substâncias que degradam poluentes no ambiente. Poluentes inorgânicos como nitrato podem ser degradados por complexos de CB e nanopartículas catalíticas de Pd/Cu (49, 50). CB também já foi usada como matriz para nanopartículas de TiO₂ que degradam poluentes por meio de fotocatalise (51). Ademais, a alta cristalinidade, porosidade e capacidade de retenção de água significa que a CB tem um grande poder de adsorção de corantes (52, 53) e metais pesados como Cr e As (54, 55) e pode ser aplicada na descontaminação de efluentes industriais (56). CB-polietilenoimina, por exemplo, é capaz de reter chumbo, cobre e mercúrio (57). Para a retenção de vanádio, nanocristais de celulose modificados com alendronato de sódio apresentaram bons resultados (58). Aerogéis

de nanocelulose modificados com grupos amino demonstraram boa capacidade de adsorção de CO₂ e gases nitrogenados (59), podendo ser aplicados para diminuir a emissão de gases de certas indústrias. Na agricultura, *pellets* de CB apresentam forte potencial como aditivos de solo ou composição de fertilizante por causa de sua grande retenção de umidade (52, 3).

3.3.3 *Cosmética*

Produtos cosméticos são aqueles aplicados no corpo humano para higienizar ou cuidar da beleza sem afetar estruturas e funções normais do corpo (42). Na cosmética e estética, a celulose bacteriana pode ser facilmente encontrada como estabilizante de emulsões (óleos-em-água) para rosto, cabelo ou unhas e componente de unhas artificiais, além de ser amplamente usada como matéria-prima para diversos produtos de várias empresas farmacêuticas (14). Algumas características – moldabilidade, hidrofilicidade, permeabilidade de gases, boa adesão à pele e facilidade de descarte – tornam a CB um bom material base para máscaras e películas para a pele, tal como o produto da Figura 5(a). Por causa de seu altíssimo conteúdo de água, a CB é um material hidratante, aumentando a hidratação da pele em até 28% em relação aos produtos comerciais (60). Por essa razão, ela pode ser usada para tratamento de cicatrizes pós-cirúrgicas e irritação (61). Ainda, a porosidade específica da CB permite que ela seja associada a componentes ativos como vitaminas, aloe vera ou exfoliantes como ácido salicílico (42, 62).

3.3.4 *Biomédica*

Na medicina a celulose bacteriana se apresenta como bom material para contato prolongado com os tecidos corporais por ser biocompatível, atóxico e não alergênico. Mais, a CB é um produto esterilizável, facilmente descartável e de origem renovável, aspectos que respondem a demandas do mercado moderno.

3.3.4.1 *Curativos cutâneos*

O uso mais comum de celulose bacteriana na medicina é como curativos. Já se encontram no mercado vários curativos comerciais a base de CB, como NexFill (Fibrocel Produtos Biotecnológicos, Brasil) e Suprasorb (Lohmann-Rauscher, Alemanha), mostrados nas Figuras 5(b) e 5(c). O curativo de CB mantém a umidade e temperatura da ferida controladas, previne infecções, e permite a respiração da ferida (63). A CB é capaz de absorver os exudatos

de uma ferida e não provoca dores na aplicação e retirada do curativo (64). De maneira geral, curativos de CB apresentam maior eficiência do que curativos convencionais, principalmente para o tratamento de feridas crônicas e queimaduras (65, 66, 67). Curativos de CB e seus compósitos podem ser modificados para conferir novas funcionalidades pela adição de agentes antimicrobianos, anti-inflamatórios, desbridantes ou células vivas (68, 69, 70, 71, 72).

Figura 5 – Produtos de CB para a pele como (a) máscara para rosto Celmat[®] Professional Biocellulose Mask, (b) curativo para lesões cutâneas Nexfill e (c) Suprasorb[®] X



Fonte: (a) <https://bowil.pl/en/products/celmat-face/>; acessado em 8 de abr, 2020 (b) <http://nexfill.com.br/produtos/>; acessado em 8 de abr, 2020 (c) <https://www.lohmann-rauscher.com/en/products/wound-care/modern-wound-care/suprasorb-x>; acessado em 8 de abr, 2020

3.3.4.2 Liberação de fármacos

As celulosas bacterianas podem ser matrizes para a entrega controlada de fármacos. CB na forma de membranas, hidrogéis e compósitos apresentam potencial como veículo de drogas, principalmente para aplicação tópica. CB pode ser usado na sua forma nativa, após funcionalização química ou na forma de compósitos.

Antibióticos como tetraciclina e ceftriaxona foram associados à CB para produzir curativos com propriedades bactericidas. Nanopartículas de prata também podem ser veiculadas em membranas de celulose sem apresentar citotoxicidade para o tecido. CB também pode ser um veículo para enzimas, servindo como plataforma de imobilização (73, 74).

A funcionalização da superfície do material promove versatilidade ao material e pode tornar a liberação de drogas mais prolongada e controlada. Badshah *et al.*, (2018) usaram modificação química da CB para carregá-la com moléculas hidrofóbicas ou moléculas hidrofílicas, demonstrando que a modificação da CB aumenta suas aplicações (75). Stoica-Guzun e colaboradores comprovaram que radiação ionizante modifica a permeabilidade da CB, retardando a liberação de tetraciclina. A inserção de grupos funcionais como aldeídos ou ácidos carboxílicos promove ligações covalentes com outras moléculas, que são mais fortes e estáveis do que as ligações de hidrogênio que são formadas na celulose não modificada (70, 76). Compósitos de CB com outros polímeros como PEG também podem ser produzidos para otimizar a liberação de uma biomolécula (77). Matrizes de CBs também podem ser desenvolvidas para liberar seus fármacos em resposta a uma mudança ambiental tal como pH ou temperatura (78, 79).

3.3.4.3 *Implantes e scaffolds*

A celulose bacteriana, como um polímero natural altamente puro e biocompatível, tem excelente potencial como biomaterial. De acordo com Chen e Thouas,

Um biomaterial é qualquer material biocompatível ... que é usado para substituir ou auxiliar parte de um órgão ou tecido, enquanto em contato íntimo com o tecido vivo.

Fonte: Chen e Thouas, 2012 (80)

As características físicas, químicas e arquitetônicas da CB a tornam um ótimo biomaterial com uma variedade de aplicações.

A alta cristalinidade, estrutura ultra-fina e porosidade simulam a matriz extracelular dos tecidos animais, composta primariamente de colágeno, cuja fibra tem dimensões similares às fibras da CB (14, 81). Esse conjunto de fatores garante boa adesão para células e permite integração aos tecidos (82). CB é naturalmente insolúvel e tem boa longevidade *in vivo* pois o organismo humano não produz enzimas capazes de degradá-la. É considerada biocompatível devido a alta pureza do material que não causa toxicidade no tecido vivo (83). Suas propriedades mecânicas – alta resistência a tensão e elasticidade (84) – são superiores a maioria de outros

polímeros naturais e suficientemente próximo dos valores de alguns tecidos do corpo humano, garantindo assim uma implantação segura.

Scaffolds são estruturas 3D porosas que permitem adesão de células e guiam a formação de tecidos, enquanto são lentamente degradados e reabsorvidos pelo corpo. Os *scaffolds* idealmente devem fornecer uma matriz que tenha porosidade que permita não só espaço para a proliferação de células, mas também a vascularização do local; ser degradado e reabsorvido de forma controlada e proporcional com a formação de tecido e, nesse processo, produzir somente substâncias que possam ser metabolizadas pelo corpo; e proporcionar a sinalização celular necessária para promover a regeneração do tecido (85).

Em fermentação estática, a CB é sintetizada nas dimensões do recipiente. Assim, o uso de matrizes especializadas levou ao desenvolvimento de vasos sanguíneos artificiais cujo comprimento, diâmetro interno e espessura podem ser ajustáveis. O protótipo de Schumann *et al.* apresentou bons resultados *in vivo* quando substituiu a artéria coronária de porcos e ovelhas (86). CB funcionalizada pode estender o uso do material. Por exemplo, a associação de CB com heparina gera um material anticoagulante que protege de trombose (87).

Estratégias similares foram utilizadas para produzir implantes de uretra. Um *scaffold* biomimético baseado em CB para implante de uretra demonstrou excelente regeneração dos tecidos e dos vasos sanguíneos da região (88). Outro implante de uretra construído a partir de CB e fibroína carregado de células teve ótima regeneração do tecido muscular e epitelial (89).

Estudos clínicos demonstraram que a CB resulta na mesma taxa de cura do tímpano que o material mais comum do mercado, com maior restauração da audição, menor custo e menos tempo de hospitalização (90, 91). Hidrogéis de CB e compósitos de CB demonstram potencial como matriz para engenharia de tecido da córnea, como um método substituto ao transplante de córnea (92, 93). Logo, CB tem grande potencial para a medicina regenerativa.

Fica claro então que existe espaço no mercado para a CB, e que há uma demanda não só para o desenvolvimento de métodos mais economicamente viáveis de produzir CB em massa, mas também de métodos para ampliar seu uso por meio de funcionalizações.

3.4 Oxidação da celulose

A modificação química da celulose expande as possibilidades de aplicação do material. Oxidação, em particular, tem sido aplicada em várias áreas. Oxidação completa da celulose resulta em dióxido de carbono e água (94), mas a oxidação parcial e controlada do material

produz plataformas versáteis para várias aplicações. Ela pode ser usada para inserir grupos funcionais, aumentar a adsorção de água e moléculas específicas, proteger de hidrólise ácida e queima e tornar a celulose mais biodegradável (5).

Existem várias metodologias na literatura para a oxidação de celulose, as quais podem ser categorizadas pelo tipo de processo reativo – oxidação dos grupos hidroxila ou oxidação pela desestabilização e abertura do anel piranose. No primeiro grupo enquadram-se os métodos usando oxidantes 2-azaadamantane n-oxil (AZADO) (95, 96), 2,2,6,6-tetrametilpiperidina 1-oxil (TEMPO) (97, 98) e óxidos de nitrogênio (38) e no segundo, os métodos por sais de periodato (38).

Oxidação por periodato é seletiva e ocorre pela clivagem da ligação entre os carbonos C2 e C3 dos anéis de glicopirranose da unidade de celobiose, formando assim 2,3-dialdeído celulose (DAC) na proporção de 2 aldeídos por unidade funcional. A Figura 6 esquematiza a reação de oxidação mediada por periodato. Esse método tem vantagens explícitas por ser um processo relativamente simples, sem reações secundárias significativas e seguro para o ambiente (99). A conversão de celulose para DAC é diretamente proporcional ao tempo de reação e quantidade de agente oxidante (100). Assim, a conversão de celulose para DAC pode ser facilmente controlada, como ilustrada na Tabela 1.

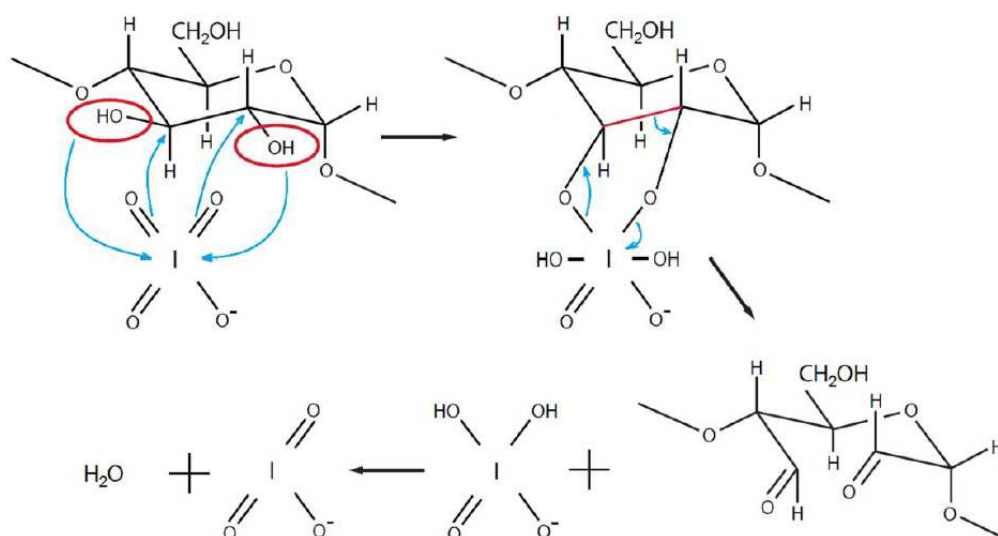
Tabela 1 – Conversão de celulose para DAC - DAC preparada a partir de polpa de celulose vegetal (DP = 650) com $0.25 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NaIO}_4$ a 60°C

tempo de reação (h)	CHO/g de celulose (mmol)	% de conversão
2	$7,13 \pm 0,03$	57
4	$7,75 \pm 0,09$	62
5	$8,08 \pm 0,06$	65
6	$9,29 \pm 0,17$	73
8	$19,14 \pm 0,09$	81

Fonte: Klemm *et al.*, 1998 (94), adaptada

Em geral, oxidação ocorre em soluções aquosas de periodato de sódio (NaIO_4) ou periodato de potássio (KIO_4), aquecida entre 40 e 60°C . Algumas variações do método já foram descritas buscando otimizar o processo. Uso de temperaturas mais altas e sais metálicos permite diminuir o tempo e concentração de oxidante (101). Sais como clorito de lítio desestabilizam as ligações de hidrogênio intermoleculares entre as fibrilas de celulose, facilitando o acesso do agente oxidante. *Ball-milling* como forma de misturar reagentes permite diminuir o uso de recursos como água, energia e tempo (102).

Figura 6 – Mecanismo de oxidação de celulose por periodato



Fonte: Münster, 2018 (5)

Em contraste a outros métodos de oxidação citados anteriormente, a oxidação com periodato ocorre tanto nas regiões cristalinas quanto nas regiões amorfas. A oxidação inicial é randômica, mas ocorre nas regiões de fácil acesso - as regiões amorfas. Logo, a cristalinidade inicial do material influencia diretamente a eficiência do processo. O estudo cinético da produção de DAC feito por Calvin *et al.* em 2006 demonstrou que oxidação ocorre em três etapas simultâneas: a oxidação rápida e randômica da região amorfa, a oxidação lenta da superfície cristalina e a oxidação lenta do núcleo (core) cristalino, parte do material mais difícil de acessar (103). As duas etapas lentas contribuem diretamente para a queda em cristalinidade do material (104). Além disso, a oxidação de um anel glicopiranosose resulta na perda de cristalinidade local que, assim, torna as unidades vizinhas mais suscetível à oxidação, gerando aglomerações de material oxidado (104). Tais características do processo significam que a oxidação por periodato gera um produto heterogêneo.

Aldeídos são altamente reativos e tendem a buscar estabilidade em outras formas. Assim, DAC tende a se apresentar como uma mistura de aldeído livre, aldeído hidratado, hemiacetal e hemiacetais intra- e intermoleculares (105). Hemiacetais formados entre o aldeído de uma fibra e a hidroxila de outra leva a agregação de fibrilas e a compactação do material. Mudanças na estrutura química do material foram confirmadas por ressonância magnética nuclear (RMN) de estado sólido (106) e espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) (104, 107). Reatividade dos aldeídos também permite que DAC seja novamente modificada pra produzir ácidos carboxílicos, iminas e grupos sulfatados (5, 104).

Polímeros amorfos são tipicamente menos estáveis que os cristalinos e essa tendência se aplica à DAC. O início da degradação térmica da DAC ocorre à temperaturas mais baixas que a da celulose (108, 109). De maneira geral, quanto maior a taxa de oxidação, menor seria a termoestabilidade do produto final. Além disso, os aldeídos da DAC são reativos e são mais suscetíveis a degradação enzimática e hidrólise que a celulose nativa (110). Assim, a DAC tem ótimo potencial para ser usada na produção de biomateriais ou em produtos descartáveis.

Nas últimas duas décadas DAC tem sido aplicada para absorção de corantes ou metais pesados em efluentes (53), cromatografia, imobilização de enzimas (70), liberação de fármacos (76), engenharia de tecidos (111, 112) e produção de compósito (113, 2), demonstrando a variedade de aplicações para CB oxidada por periodato.

3.5 Irradiação de micro-ondas

Nas últimas décadas, o uso do equipamento de micro-ondas (MO) de alta potência como ferramenta na área de síntese química ganhou popularidade por ser energeticamente eficiente e promover o aquecimento rápido e homogêneo do meio reacional (114, 115). Essa tecnologia resulta em velocidades de reações maiores, alta pureza e melhor rendimento dos produtos, quando comparado à métodos convencionais de aquecimento.

Micro-ondas são ondas eletromagnéticas de frequências entre 300 MHz e 300 GHz e comprimento de onda entre 1 m e 1 mm, respectivamente. São ondas de relativamente baixa energia, situadas no espectro eletromagnético entre radiação infravermelho e ondas de rádio. A energia emitida pela micro-onda não é suficiente para quebrar ligações covalentes (6). Em contrapartida, a energia é transformada em calor quando as micro-ondas interagem com moléculas polares ou polarizáveis. Moléculas com dipolo tendem a se alinhar com o campo eletromagnético e a oscilação do campo causado pela micro-onda induz sua rotação. Assim, há a transformação de energia de campo em energia cinética de moléculas (6) no processo chamado aquecimento dielétrico. Essa forma de aquecimento é contrastante ao aquecimento convencional por convecção e condução, cuja transferência de calor se dá por causa de um gradiente de temperatura e é limitada pela permeabilidade térmica da matéria. O micro-ondas é altamente eficiente como fonte de calor para reações que ocorrem em meio aquoso, como é o caso da oxidação de CB por periodato em meio ácido.

Apesar de haver controvérsias quanto a extensão da influência das micro-ondas sobre reações químicas, as evidências empíricas determinam que o seu uso permite diminuir o

tempo de reação de várias horas para alguns minutos (115). A Tabela 2 faz uma compilação de exemplos publicados em que o uso de micro-ondas otimizou a modificação química de materiais pela minimização do tempo de reação e/ou pelo aumento do rendimento ou pureza do produto. Também, o micro-ondas possibilita o escalonamento de um processo com maior eficiência energética que o uso de chapa quente ou banho-maria, resultado do maior controle que existe sobre o *input* de energia no sistema (6). Assim, o micro-ondas não só permite otimizar um processo químico, mas também oferece viabilidade financeira.

Modificação química assistida por micro-ondas de polímeros naturais é reportada na literatura e os resultados demonstram que o aquecimento por micro-ondas favorece a reação. Carboximetilação de quitosana, sob aquecimento tradicional teve conversão máxima de 70% e atingiu esse valor com 240 min. Porém, com aplicação de micro-ondas o rendimento atingiu valores acima de 85% em um décimo do tempo (116). Na oxidação de amido por peróxido em micro-ondas foi obtido 59,3 mmol·100 g⁻¹ de aldeídos e 36,9 mmol·100 g⁻¹ de ácidos carboxílicos no mesmo tempo necessário para obter 25,2 mmol·100 g⁻¹ e 21,2 mmol·100 g⁻¹, respectivamente, usando aquecimento comum, sem usar catalisador (117). Produção de hidrogéis de quitosana ocorreu em uma única etapa em 90 s de irradiação em micro-ondas. A deposição de hidroxiapatita em *scaffolds* biomiméticos de quitosana foi feita com sucesso por micro-ondas após somente 9 ciclos de 30 s de irradiação, sem necessitar um agente nucleante (118). A produção de vários copolímeros diferentes foram reportados. Por exemplo, a copolimerização de quitosana e o polímero sintético acrilamida sob irradiação de micro-ondas ocorreu após 1 min e 10 s, teve o dobro do rendimento do processo com outras fontes de calor e o copolímero gerado apresentou maior capacidade de adsorver cátions (119). Um copolímero de alginato de sódio e N,N'-dimetilacrilamida foi produzido com 1 h de síntese sob irradiação de micro-ondas com alto rendimento (120).

Modificações químicas de celulose em micro-ondas também são reportadas, destacando-se reações de carboximetilização, acetilação e despolimerização. Acetilação por anidrido acético foi descrito múltiplas vezes. Usando ZnCl₂ como catalisador, foi possível obter rendimentos maiores do que pelo método convencional (95,8% em relação a 87,1%) e aumentar o grau de substituição, além de diminuir o tempo de reação de 72 h a alguns minutos (121). Efeitos similares foram observados quando se usou iodo (122) ou FeCl₃ (123) como catalisadores. Nesses trabalhos também foram reportados altos rendimentos e graus de substituição após poucos minutos de irradiação, apesar do uso de diferentes temperaturas. Mission *et al.* mostraram que o

uso do micro-ondas permite despolimerização efetiva de celulose em glicose começando em 30 s e que uma hora de irradiação teve taxa de conversão de 61%, taxa superior às alternativas presentes na literatura (124). Finalmente, carboximetilação assistida por micro-ondas foi feita com sucesso e alto grau de substituição em poucos minutos (125). Os autores não procuraram fazer comparações diretas entre o método com micro-ondas e métodos tradicionais, mas a literatura descreve métodos que usam aquecimentos convencionais que necessitam de 1 a 6 h.

Várias formas de oxidação foram estabelecidas no micro-ondas. A inserção de grupos carboxilato em hidrogel de celulose por TEMPO foi possível em somente 6h. Nesse trabalho, os autores reportaram a produção de $1,28 \text{ mmol} \cdot \text{g}^{-1}$ de carboxilato em comparação a $1,27 \text{ mmol} \cdot \text{g}^{-1}$ em 36 h de produção tradicional (aquecimento em banho-maria) (126). Possivelmente, essa extensão da reação é o motivo pelo qual o método do banho-maria teve uma recuperação de massa menor que o micro-ondas (85,4% comparado a 96,0%). O uso de irradiação de micro-ondas para oxidar celulose com TEMPO e OZONE[®] permitiu cortar 24 h do tempo total do processo, além de obter produtos puros, cujos grupos funcionais eram majoritariamente carboxilato, sem a presença de aldeídos ou outras formas de oxidação que caracterizou o método tradicional com o qual compararam (127). Lu *et al.* reportaram a funcionalização de micropartículas de celulose por ácido oxálico em micro-ondas que teve melhor desempenho que o método comparado, pois as partículas produzidas eram menores em escala e com melhor estabilidade (128). Ademais, a taxa de funcionalização também foi superior, gerando $1,08 \text{ mmol} \cdot \text{g}^{-1}$ de carboxilato em 1 h de reação, comparado a $0,42 \text{ mmol} \cdot \text{g}^{-1}$ do método convencional. Apesar dos vários exemplos de modificações químicas de celulose na literatura, a oxidação de CB por periodato ainda não foi estabelecida, embora periodato já foi usado junto a outros materiais. Mohammadi *et al.* estabeleceram o uso de periodato como agente oxidante na degradações oxidativa de fenóis assistida por micro-ondas, obtendo degradação de 98,8% da amostra em 30 min, onde a reação, nas mesmas condições mas sem aquecimento por micro-ondas teve rendimento de somente 11,5% (129).

Como o processo de oxidação da membrana de CB por periodato frequentemente descrito na literatura requer temperaturas amenas (40-60 ° C) e longo tempo de reação (6 horas ou mais) (70, 104, 111, 130), acreditamos que o uso de micro-ondas pode tornar o processo mais eficiente em relação ao tempo.

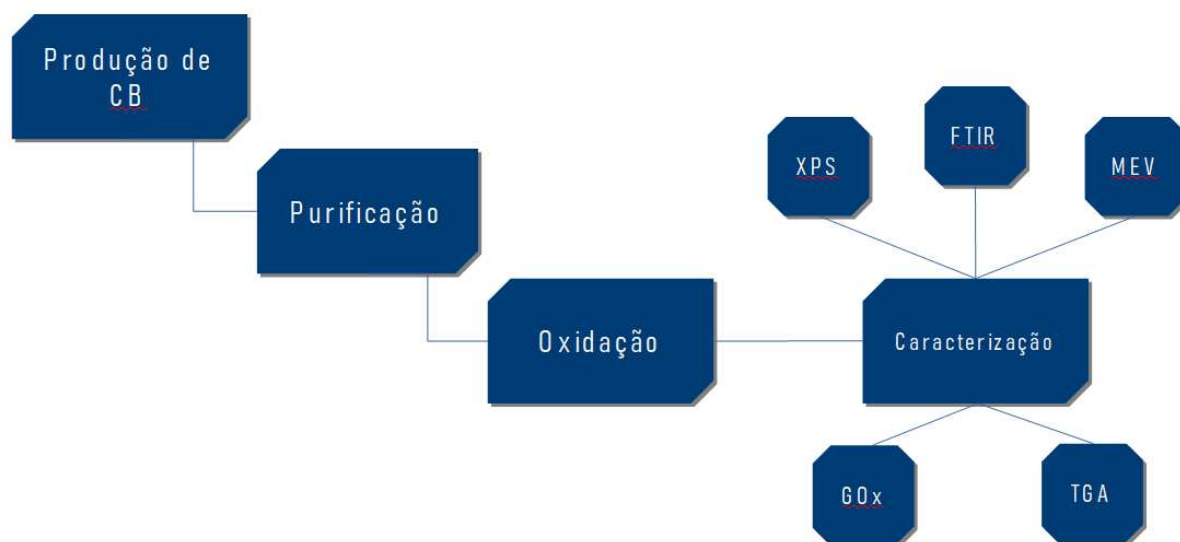
Tabela 2 – Compilação de aplicações de micro-ondas para otimizar processos químicos

Reação	Condições ótimas de micro-ondas	Resultados	ref.
Carboximetilação de quitosana	260 W por 20 min a 100 ° C	A taxa de conversão superou 85% em 20 min, superando a taxa de conversão máxima atingida pelo método tradicional - 70% em 240 min	(116)
Oxidação de amido por peróxido	190 W por 15 min	Foram obtidos 59,3 mmol·100 g ⁻¹ de aldeídos no mesmo tempo necessário para obter 25,2 mmol·100 g ⁻¹ com aquecimento por banho-maria	(117)
Deposito de hidroxiapatita em quitosana	600 W, 9x por 0,5 min	Depositação foi feita com sucesso sem necessitar agentes nucleantes	(118)
Copolimerização de quitosana e acrilamida	1,16 min a 95 ° C	Teve o dobro do rendimento e o copolímero apresentou melhor capacidade de absorver Ca ²⁺ e Zn ²⁺ que os experimentos padrões	(119)
Copolimerização de alginato de sódio e N,N'-dimetilacrilamida	500 W por 60 min a 75 ° C	Produzido com somente 1 h de síntese com alto rendimento e pouca perda de reagentes	(120)
Acetilação de celulose	1400 W por 3 min	Obteve rendimentos de 95,8% e grau de substituição de 2,87 comparado ao método convencional de 72 h que rendeu 87.1% e teve GS de 2,6	(121)
Depolimerização de MCC	200 W por 60 min a 453 K	61% do MCC foi depolimerizado em 1 h, superando qualquer taxa que o autor encontrou na literatura	(124)
Carboximetilação de celulose	200 W a 70 ° C por 7,5 min	Teve um grau de substituição de 1,46 após pouco tempo e apresentou a possibilidade do processo ser escalonado	(125)
Oxidação de hidrogel de celulose com TEMPO	600 W por 6 h a 60 ° C	Produziu 1,28 mmol·g ⁻¹ de carboxilato em 6 h comparado a 1,27 mmol·g ⁻¹ em 36 h no banho maria de 60° C	(126)
Oxidação de celulose com TEMPO e OZONE [®]	25 W por 30 min a 60 ° C	Cortou o tempo de reação de 24 h para 30 min e gerou produtos mais puros	(127)
Micropartículas de celulose oxidada por ácido oxálico	800 W por 30 min a 115 ° C	Produziu 1,08 mmol·g ⁻¹ de carboxilato em relação a 0,42 mmol·g ⁻¹ no método convencional por 1 h além de partículas menores	(128)
Oxidação de fenol por periodato	600 W por 30 min	Obtiveram 98,8% de degradação oxidativa de fenol sob condições que, sem incidência de micro-ondas, alcançava somente 11,5%	(129)
Esterificação de celulose	300 W por 1 min a 140 ° C	60 s foi o suficiente para atingir grau de substituição e ganho de massa comparável a experimentos de 30 min a 2 dias	(131)

4 METODOLOGIA

A Figura 7 apresenta a estratégia experimental do trabalho em quatro etapas. O desenvolvimento do material envolve a produção, purificação e oxidação de CB e a caracterização do material se deu por meio de cinco técnicas físicas e químicas.

Figura 7 – Estratégia experimental do trabalho esquematizada.



Fonte: Elaborado pela autora

4.1 Produção de membranas de celulose bacteriana

A bactéria *Komagataeibacter hansenii* (ou *Gluconacetobacter hansenii* ou ainda *Komagataeibacter xylinus*) foi adquirida da *American Type Culture Collection* (ATCC) 53582. Ela foi cultivada por fermentação estática para produzir membranas de CB no meio de cultura Hestrin-Schramm (HS) (28). O meio de cultura continha 20 g·L⁻¹ de glicose, 5 g·L⁻¹ de peptona, 5 g·L⁻¹ de extrato de levedura, 1,15 g·L⁻¹ de ácido cítrico e 2,7 g·L⁻¹ de fosfato de sódio dibásico, de pH 5,0. O inóculo foi preparado em frascos Schott 500 mL adicionando 10% (v/v) de cultura bacteriana ativada a 100 mL de meio de cultura HS esterilizado. A CB foi cultivada em incubadoras (B.O.D. TE 391, Tecnal, São Paulo, BR) a 30 °C por 7 dias de fermentação. A CB foi produzida no Laboratório de Microbiologia de Alimentos, Embrapa Agroindústria Tropical (Fortaleza, CE).

4.2 Purificação da celulose bacteriana

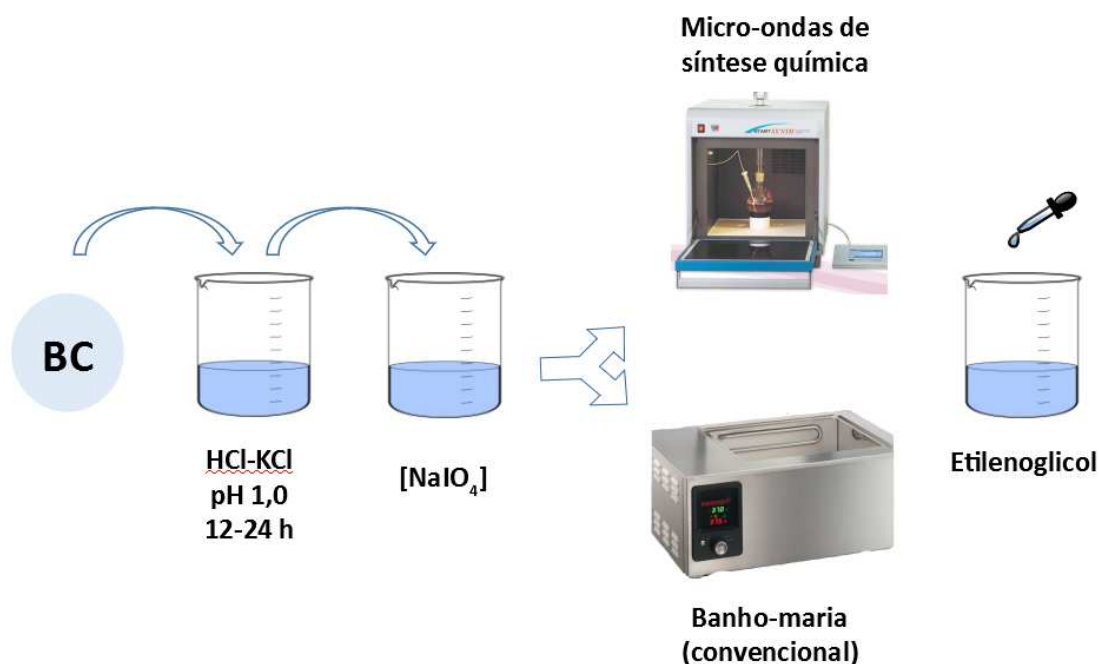
Primeiramente, as membranas de CB foram lavadas com água corrente para retirar o excesso do meio de cultura. Em seguida, as membranas foram imersas em água destilada a 80 °C por 1 h. Esse procedimento foi realizado duas vezes. Após a lavagem, as membranas foram imersas em 0,3 mol·L⁻¹ de carbonato de potássio (K₂CO₃) a 80 °C por 1 h. Esse procedimento foi realizado duas vezes para garantir a retirada completa do meio de cultura, bactéria e material proteico. Para finalizar, as membranas passaram por lavagem com água destilada a temperatura ambiente até atingir pH entre 6 e 7.

4.3 Oxidação da membrana de celulose

A metodologia para oxidação por periodato foi adaptada a partir do método descrito por Li *et al.* (111). Os parâmetros estudados incluem a concentração de periodato de sódio (NaIO₄) e o tipo de propagação de calor (convecção ou irradiação). Para aquecimento por convecção usou-se um banho-maria (que a partir de agora será chamado de método convencional) e para o aquecimento por irradiação usou-se um equipamento de micro-ondas para síntese química StartSYNTH (Milestone Srl, Itália) na potência de 300 W durante aquecimento e 100 W após atingir a temperatura desejada. A temperatura foi controlada por sensor infravermelho. Os experimentos com micro-ondas foram feitos no Laboratório de Produtos e Tecnologia em Processos da UFC. A Figura 8 ilustra o processo de oxidação da CB.

As membranas úmidas foram imersas em solução tampão HCl/KCl de pH 1,0 por 12 a 24 h a 25 °C. Periodato de sódio foi dissolvido em HCl/KCl para a concentração de 1% ou 0,75% (m/v). As membranas foram postas em recipientes de vidro e cobertas por 100 mL da solução de periodato. Os recipientes foram vedados e postos dentro do banho-maria ou dentro do micro-ondas sob ausência de luz. A reação ocorreu à 90 °C sem agitação. Após a reação, adicionou-se etilenoglicol (12 mL por 25 mL de meio reativo) para decompor o excesso de NaIO₄, mantendo o recipiente em temperatura ambiente por 60 min, com agitação manual periódica. As membranas de celulose bacteriana oxidada (CBOx) foram lavadas com água deionizada até atingir pH 6 a 7 para remoção completa da solução e agente de oxidação. Os seis experimentos feitos e suas condições são detalhado na Tabela 3.

Figura 8 – Representação esquemática dos experimentos de oxidação de celulose bacteriana



Fonte: Elaborado pela autora

Tabela 3 – Resumo dos experimentos de oxidação da membrana úmida de CB. O método de aquecimento convencional usado foi banho-maria, isolado da luz e sem agitação

Experimento	método de aquecimento	tempo de reação	temperatura	$[IO_4^-]$
CBOx-30-MO-0,75%	micro-ondas	30 min	90 °C	0,75%
CBOx-30-Conv-0,75%	convencional	30 min	90 °C	0.75%
CBOx-60-Conv-0,75%	convencional	60 min	90 °C	0.75%
CBOx-30-MO-1%	micro-ondas	30 min	90 °C	1%
CBOx-30-Conv-1%	convencional	30 min	90 °C	1%
CBOx-60-Conv-1%	convencional	60 min	90 °C	1%

Fonte: Elaborada pela autora

4.4 Técnicas de caracterização

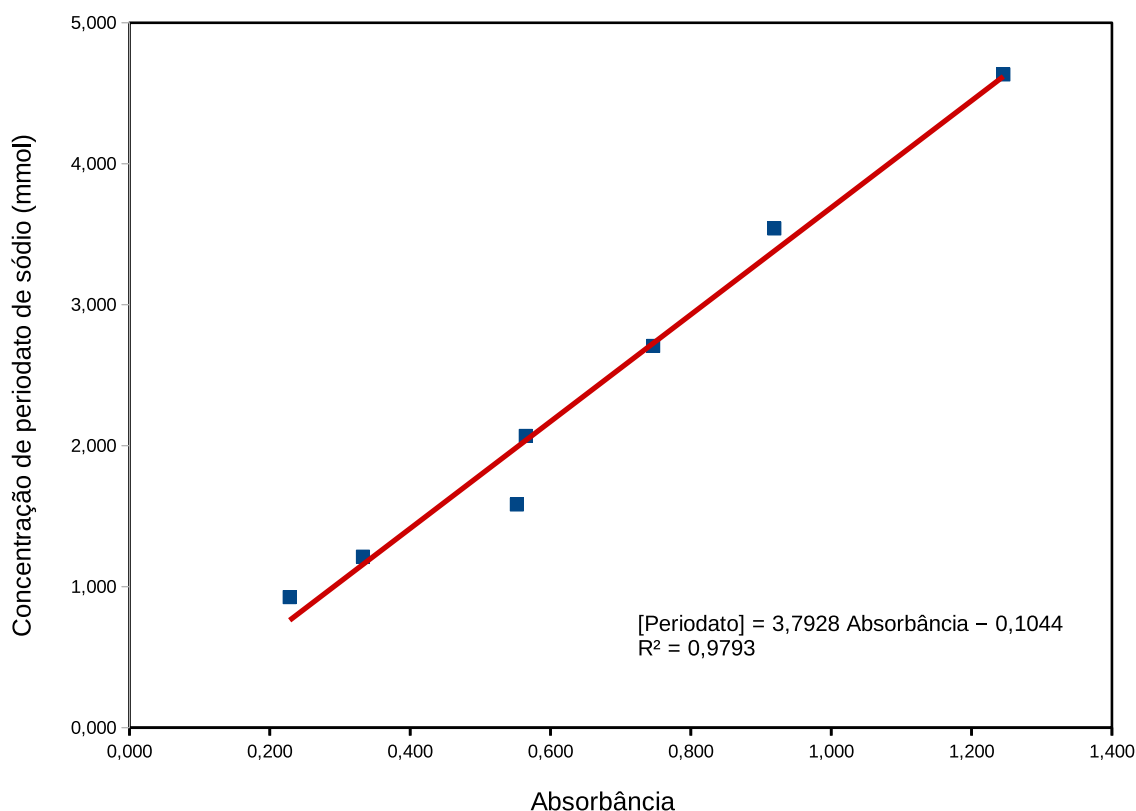
As características químicas e físicas das membranas de CBOx são descritas usando as técnicas detalhadas a seguir.

4.4.1 Grau de oxidação (GOx)

O grau de oxidação (GOx) foi determinado por um método espectrofotométrico que quantifica o consumo de IO_4^- . O método foi desenvolvido a partir do trabalho de Maekawa (132). Antes do início da oxidação, foi reservado 1 mL da solução de IO_4^- e 1 mL do sobrenadante foi

coletado após a oxidação. As amostras foram coletadas em tubos Eppendorf, 1,5 mL, Eppendorf Quality™ e protegidas da luz. Cada amostra foi diluída com solução HCl/KCl na razão 1:4 v/v e a absorbância foi medida no espectrofotômetro Serie Biomate™ 3 (Thermo Electron Corporation, Waltham, U.S.A.) a 290 nm em cubeta de quartzo. A correlação entre a absorbância e a concentração de IO_4^- em $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ foi determinada a partir da curva padrão de concentração mostrada na Figura 9).

Figura 9 – Curva padrão de concentração de periodato de sódio



Fonte: Elaborado pela autora

A quantidade de aldeído em mmol por grama de celulose foi determinado usando a seguinte equação:

$$\frac{\text{mmol de CHO}}{\text{g de celulose}} = \frac{([\text{IO}_4^-]_i - [\text{IO}_4^-]_f) * 2}{m_s}, \quad (4.1)$$

onde $[\text{IO}_4^-]_i$ e $[\text{IO}_4^-]_f$ são as concentrações inicial e final de periodato e m_s é a massa seca da amostra. O GOx em porcentagem foi obtido a partir da relação descrita por (94) e considerando o valor teórico de 12,5 mmol de CHO por grama de celulose completamente convertida em DAC.

4.4.2 *Infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)*

Amostras liofilizadas foram avaliadas por FTIR para comprovar que houve modificação química na CB. Foi usado um espectrômetro Spectrum Two (Perkin Elmer, Waltham, EUA) equipado com acessório de reflexão total atenuada (ATR). A resolução espectral foi de 4 cm^{-1} e varreduras foram coletadas na faixa espectral de 4000 a 600 cm^{-1} em modo transmitância. A análise foi feita no Laboratório de Tecnologia da Biomassa, Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza/CE.

4.4.3 *Análise termogravimétrica (TGA)*

Análise termogravimétrica (TGA) fornece informações sobre a estabilidade térmica do material e pureza do material. Para essa análise as amostras foram liofilizadas e moídas. Cada amostra, de aproximadamente 6 mg, foi colocada em um cadinho de cerâmica e medida em um analisador térmico simultâneo (STA) (STA 6000, Perkin Elmer, Massachusetts, EUA), varrendo de 50 a $700\text{ }^{\circ}\text{C}$, a uma taxa de aquecimento de $10\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$, sob atmosfera de ar sintético a $40\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. As curvas de TGA foram processadas no software OriginPro 8.5 (OriginLab Corp.). A temperatura de *onset* é obtido a partir do cruzamento das linhas tangentes à temperatura inicial e à inflexão da curva. A temperatura de máxima degradação é determinada a partir da derivada da massa do TGA. A análise foi feita no Laboratório de Tecnologia da Biomassa, Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza/CE.

4.4.4 *Microscopia eletrônica de varredura (MEV)*

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) permite visualizar a microestrutura e superfície do material. A membrana de CBOx foi liofilizada e imersa em nitrogênio líquido para fraturar. As amostras foram metalizadas com uma fina camada de ouro em equipamento Emitech, modelo K550 (Quorum Technologies Ltd, Kent, U.K.) e micrografias foram obtidas no Microscópio Eletrônico de Varredura FEI Quanta-450 FEG (Thermo Fisher Scientific, Waltham, U.S.A.) operando a 15 kV. As imagens foram obtidas na Central Analítica da Universidade Federal do Ceará. O diâmetro das fibras foi calculado a partir de no mínimo 100 leituras no *software* de processamento de imagens ImageJ 1.52V (USA).

4.4.5 Espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X (XPS)

Espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X (XPS) foi feita no espectrômetro PHI Versaprobe II Scanning XPS Microprobe (Physical Electronics; USA) usando anodo padrão de alumínio Al K α (100 μ m, 100 W, 20 kV, 1486,6 eV) e neutralização de carga. Os espectros foram analisados usando o programa PHI SmartSoft e processados com MultiPak 9.3. Os espectros do carbono foram referenciados para C1s no sinal de 284,8 eV e as curvas foram deconvoluídas pelo método dos mínimos quadrados, empregando função Gaussiana-Lorentziana. A contribuição de cada estado químico para a composição do espectro do carbono foi usada para determinar a relação entre a quantidade de carbono pertencente à estrutura da celulose e quantidade de carbono pertencente a grupos oxidados por periodato. Esses valores foram obtidos usando a Equação (4.2), que é o inverso da equação descrita por Luz *et al.* (112):

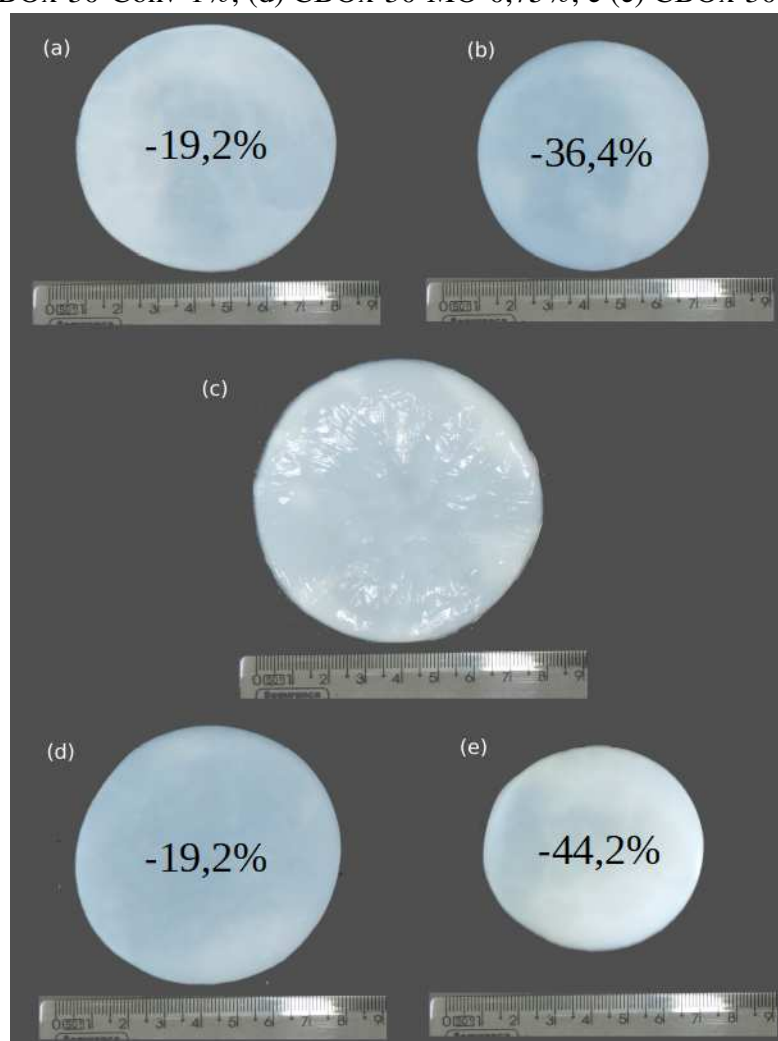
$$\frac{C3 + C4}{C2}, \quad (4.2)$$

onde C2 = área sob o segundo pico da deconvolução do espectro C1s; C3 = área sob o terceiro pico da deconvolução do espectro; C4 = área sob o quarto pico da deconvolução do espectro. Os espectros de XPS foram obtidos no Departamento de Química Inorgânica, Cristalografia e Mineralogia da Universidade de Málaga, Málaga/Espanha.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

A Figura 10 mostra fotografias das membranas úmidas de CB e CBOx. A membrana central da imagem (c) é a membrana de CB antes da modificação química. Essas membranas têm um diâmetro de 7,9 cm, resultado do frasco de diâmetro de 86 mm onde foi produzida. As membranas oxidadas encolheram durante a oxidação. CBOx-30-Conv-0,75%, CBOx-30-Conv-1%, CBOx-30-MO-0,75% e CBOx-30-MO-1% possuem diâmetros médios de 7,1, 6,3, 7,1, e 5,9 cm. Isso equivale a 19,2%, 36,4%, 19,2% e 44,2% de perda de área de superfície em relação a membrana original, como pode ser visto na Figura 10(a),(b),(d) e (e), respectivamente. Tais mudanças macroscópicas na membrana estão associadas a dois fatores: o encurtamento de fibrilas devido à hidrólise de ligações glicosídicas e a agregação de fibrilas que vem com a formação de hemiacetais entre fibrilas diferentes.

Figura 10 – Fotografias das membranas de CB não modificada (c), (a) CBOx-30-Conv-0,75%, (b) CBOx-30-Conv-1%, (d) CBOx-30-MO-0,75%, e (e) CBOx-30-MO-1%



Fonte: Elaborado pela autora

5.1 Efeito do tempo, da concentração de agente oxidante e da propagação de calor no GOx

O grau de oxidação refere-se à porcentagem de celulose que sofreu conversão, formando DAC. A Tabela 4 apresenta os resultados do GOx para todos os experimentos. As variáveis estudadas foram o tempo de oxidação, o método de propagação de calor e a concentração de periodato. A temperatura da reação foi fixada em 90 °C. Temperaturas elevadas podem causar a decomposição do periodato em radicais livres e afetar a oxidação da celulose. Um estudo realizado por Sirviö *et al.* demonstrou que esse processo ocorre após duas horas de reação (101). Assim, os experimentos de 30 a 60 min não estão suscetíveis à decomposição de periodato. Um experimento inicial confirmou essa hipótese demonstrando não haver mudanças relevantes na absorbância de solução de periodato aquecido a 90 °C de 15 a 60 min.

Tabela 4 – Graus de oxidação obtidos em triplicata para as membranas de CBOx

Amostra	GOx (mmol/g de cellulose)	GOx (%)
CBOx-30-Conv-0,75%	2,25	19,2
CBOx-60-Conv-0,75%	8,13	64,9
CBOx-30-Conv-1%	4,41	36,0
CBOx-60-Conv-1%	10,02	79,6
CBOx-30-MO-0,75%	3,13	26,0
CBOx-30-MO-1%	9,26	73,6

Fonte: Elaborada pela autora

De maneira geral, o uso de micro-ondas como fonte de energia da reação gerou produtos mais oxidados sob as mesmas condições de tempo, temperatura e concentração de reagentes, quando comparado ao método convencional. CBOx-30-Conv-0,75% teve o menor grau de oxidação de todos os experimentos (19,2%). CBOx-30-MO-0,75%, em relação ao anterior, teve um GOx 35% maior (GOx=26,0%). Da mesma maneira, comparando os experimentos feitos com 1% periodato e 30 minutos de reação, o GOx de CBOx-30-MO-1% dobrou em relação ao CBOx-30-Conv-1%. Para o método convencional superar a oxidação no micro-ondas foi necessário dobrar o tempo de reação, como pode ser visto entre CBOx-60-Conv-1% e CBOx-30-MO-1%. Assim, comprovou-se que o micro-ondas permite obter um produto mais oxidado do que os métodos convencionais cuja propagação de calor se dá por condução e convecção.

Aquecimento dielétrico ocorre pela transferência direta de energia cinética a moléculas polares quando elas procuram se alinhar a um campo eletromagnético oscilatório. Essa

transferência leva 1 ns (115) e a taxa de aquecimento pode ser controlado pelo equipamento. Assim, o sistema atinge a temperatura desejada em alguns segundos e de maneira uniforme.

É bem conhecido que a concentração de periodato de sódio disponível e o tempo de reação influenciam positivamente na oxidação da celulose (100). Esse comportamento foi comprovado pelos experimentos realizados neste trabalho. Com o uso de irradiação de micro-ondas o GOx obtido com 1% de periodato é quase o triplo do obtido com 0,75% nos primeiros trinta minutos de reação. Por aquecimento convencional, no primeiro intervalo de tempo (30 min) a taxa de conversão CBOx-30-Conv-1% é 1,87 vezes maior que o valor para CBOx-30-Conv-0,75%. Isso demonstra que o aumento da concentração de reagente leva a uma maior velocidade de oxidação durante o início da reação. Já nos 30 min seguintes de reação, o GOx do experimento CBOx-60-Conv-1% é somente 1,22 vezes maior que o do CBOx-60-Conv-0,75%.

Além disso, pode-se comparar as frações de celulose convertidas em CBOx após esses dois intervalos de tempo para explorar a eficiência da reação. A razão entre CBOx-60-Conv-0,75% e CBOx-30-Conv-0,75% é 3,4 enquanto que a razão entre CBOx-60-Conv-1% e CBOx-30-Conv-1% é 2,2. Esses valores sugerem que a eficiência da reação química com 1% de agente oxidante é menor que a de 0,75% no segundo intervalo de tempo. Logo, a velocidade de oxidação usando 1% de periodato é maior que sua contraparte no início da reação, mas a perda de eficiência com o tempo ocorre de maneira mais intensa. Tal comportamento pode ser interpretado de acordo com a cinética de reação descrita por Calvini *et al.* (103) e explicada na seção 3.4. A concentração inicial de periodato influencia a taxa de conversão nas etapas de oxidação iniciais que se referem à oxidação da superfície da membrana. Porém, a próxima etapa, que corresponde à oxidação do *core*, é limitada pela dificuldade de acesso ao material. Nesse caso, o reagente deve permear no material, de modo que a reação satura com menores concentrações de agente oxidante do que observado na etapa de oxidação da superfície. Assim, pode-se concluir que não é necessário aumentar a concentração de reagente para atingir altos níveis de oxidação.

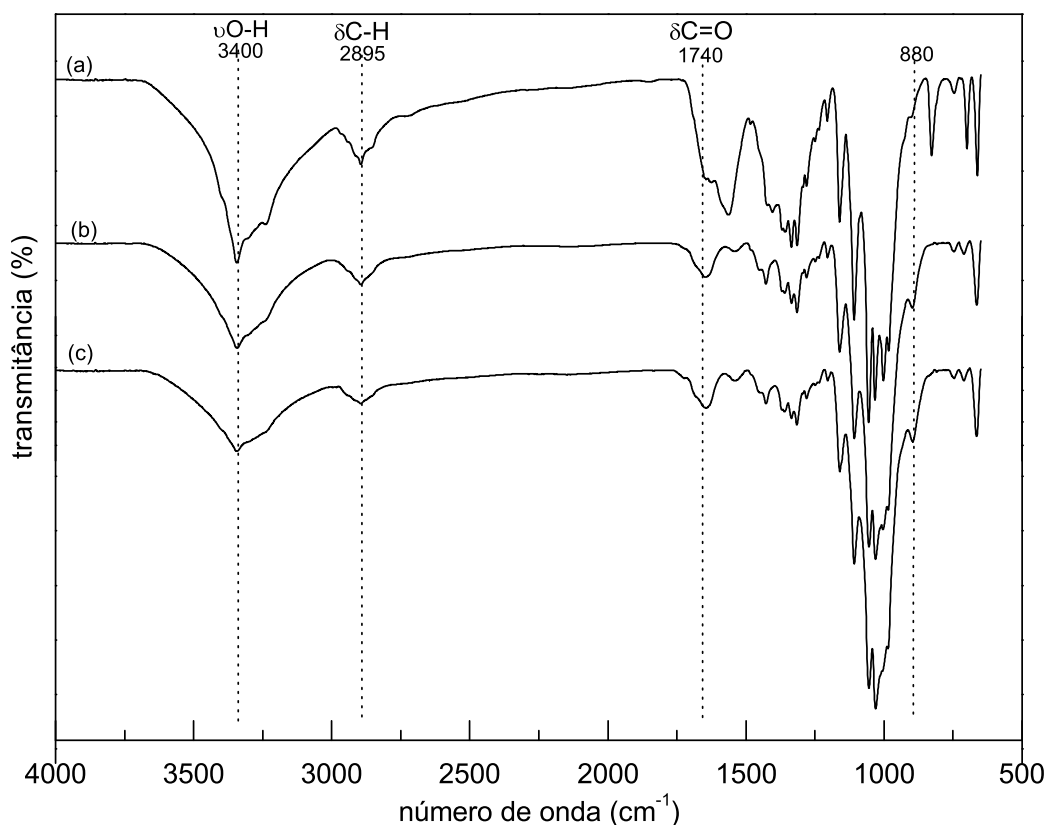
Tal resultado não é congruente ao reportado por Varma e Kulkarni (100). Neste trabalho os autores determinaram que em temperaturas acima de 35 °C a taxa de conversão para DAC é proporcional à concentração de periodato de sódio durante todo o processo de oxidação sem perda significativa de eficiência. Porém, nesse experimento usou-se celulose vegetal em polpa e diluída e a reação sob agitação, fatores que favorecem o contato do agente oxidante com o material.

5.2 Comprovação da modificação química por FTIR

A espectroscopia no infravermelho se baseia na interação da radiação infravermelho com a matéria. Uma molécula absorve radiação quando a energia da radiação tem a mesma frequência que a vibração da ligação da molécula. A absorção e transmitância da energia gera um sinal que é característico da molécula e suas ligações.

Através dos espectros de FTIR pode-se confirmar a modificação química da CBOx. A Figura 11 apresenta os espectros da (a) CB sem modificação química, (b) CBOx-30-Conv-075% e (c) CBOx-30-MO-0,75%, e a Figura 12 apresenta os espectros da (a) CB sem modificação química, (b) CBOx-30-Conv-1% e (c) CBOx-30-MO-1%. Destacam-se em ambas as figuras as bandas vibracionais 3400 cm^{-1} , 2895 cm^{-1} , 1740 cm^{-1} e 880 cm^{-1} . O padrão de bandas vibracionais da DAC é bem conhecido e tem sido amplamente estudado desde 1960 (5). As diversas formas que os aldeídos podem tomar impossibilitam a quantificação a partir do espectro de FTIR, logo essa análise só permite determinar a presença de certas características estruturais e uma análise qualitativa do padrão de bandas.

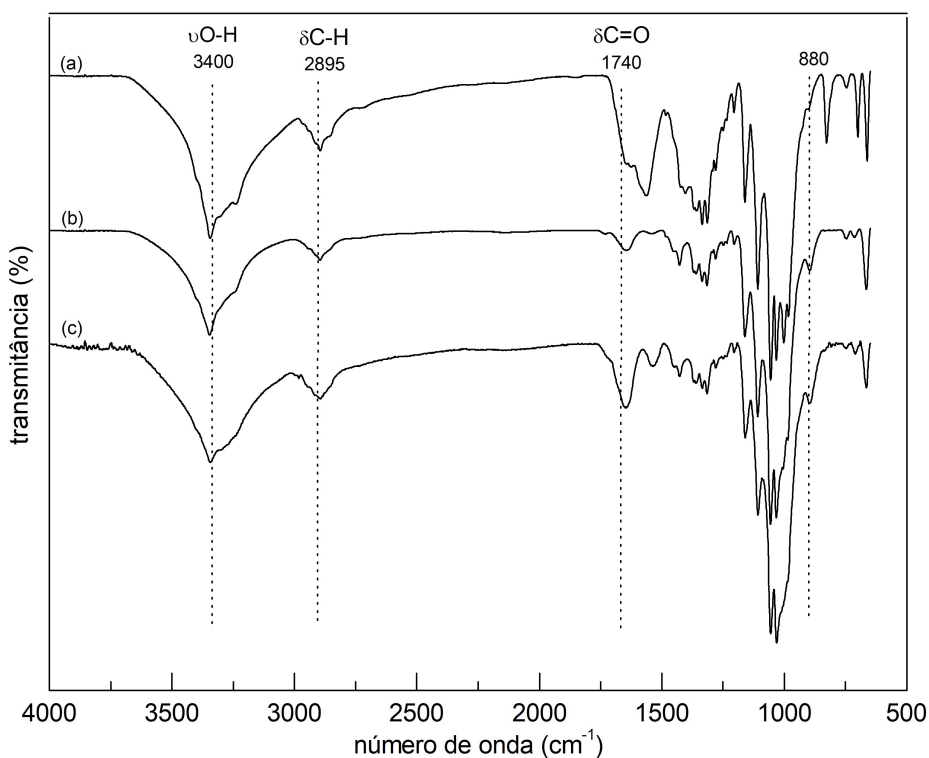
Figura 11 – Espectros de FTIR das membranas (a) CB, (b) CBOx-30-Conv-0,75% e (c) CBOx-30-MO-0,75%.



Fonte: Elaborado pela autora

O aparecimento do estiramento em 1740 cm^{-1} nos espectros (b) e (c) de ambas as figuras corresponde à vibração da carbonila ($\text{C}=\text{O}$) de aldeídos alifáticos que foi inserido na estrutura da celulose. A intensidade dessa banda aumentou de acordo com o aumento do grau de oxidação atribuída à amostra, como pode ser verificado, especialmente, na Figura 12 (b) e (c). Uma banda característica da presença de aldeídos é um leve dubleto na região de 2695 a 2800 cm^{-1} representando a ligação $\text{C}-\text{H}$. Porém, essa banda não é tipicamente verificada nos espectros de celulose oxidada. Como descrito na seção 3.4, aldeídos livres tendem a se estabilizar na forma de hemiacetal ou aldeído hidratado, explicando a falta do dubleto. A presença da banda vibracional em 880 cm^{-1} é devido a formação de hemiacetal ($\text{C}-\text{O}-\text{C}$) na estrutura da CBOx e ela sofre um visível aumento relativo de acordo com o aumento do GOx, assim como a banda vibracional da carbonila. Verifica-se também a perda de intensidade da banda vibracional do hidróxido em 3400 cm^{-1} devido à diminuição da quantidade de grupos hidroxilas na estrutura do material com a oxidação.

Figura 12 – Espectros de FTIR das membranas (a) CB, (b) CBOx-30-Conv-1% e (c) CBOx-30-MO-1%.



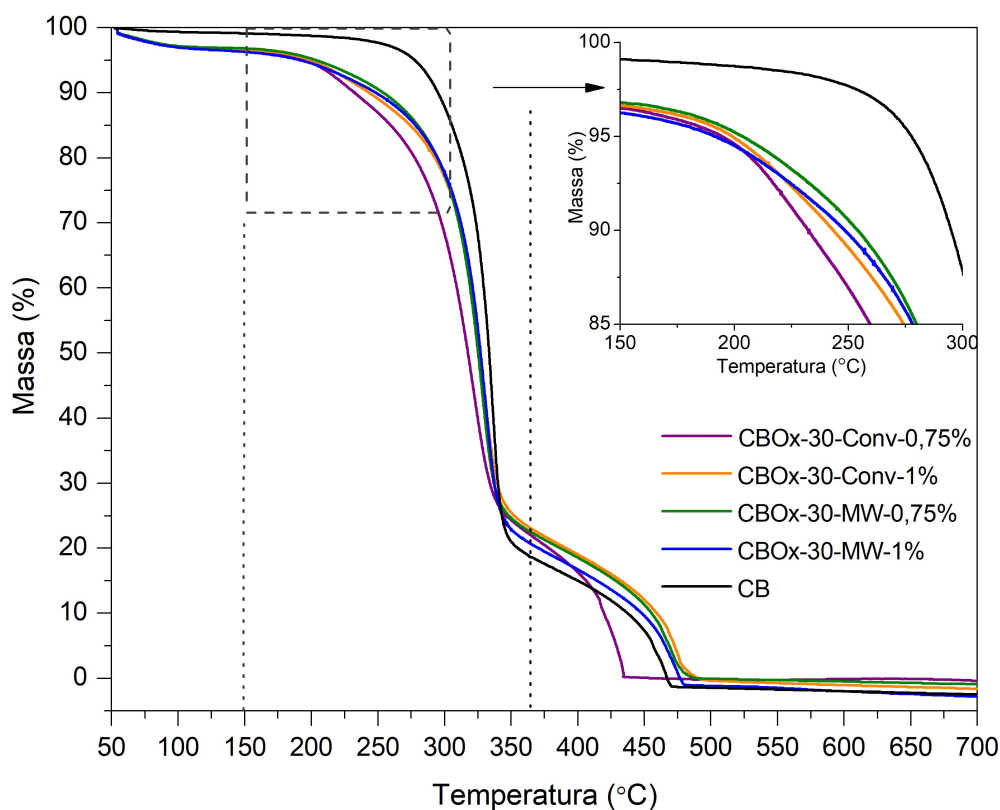
Fonte: Elaborado pela autora

5.3 Avaliação das características térmicas

Análise termogravimétrica fornece várias informações sobre a estrutura da celulose e sua pureza que determinam a estabilidade térmica do material (46). Os dados obtidos pelo TGA dependem de vários fatores, como as características físicas da amostra, sua massa e a taxa de aquecimento do equipamento. Esses parâmetros foram mantidos para comparar os perfis das amostras.

A Figura 13 mostra as curvas termogravimétricas da CB, CBOx por micro-ondas e a metodologia convencional, por 1% e 0,75% periodato. A curva de degradação para a CB está de acordo com o que é visto na literatura (108). Ela possui três eventos de perda de massa distintos. O primeiro evento ocorre até 150 °C e representa a evaporação de qualquer água residual no material ou no cadinho. O segundo evento representa a degradação do material celulósico e corresponde a maior perda de massa percentual. Esse evento se passa entre 150 e 350 °C. Nessa faixa de temperatura tem-se a perda de estrutura seguida da decomposição das nanofibrilas em moléculas menores. Finalmente, o terceiro evento ocorre a partir de 350 °C e se refere a degradação completa dos resíduos e sua carbonização.

Figura 13 – Análise termogravimétrica das membranas de CB e CBOx



Fonte: Elaborado pela autora

A temperatura de *onset* (T_{onset}) é a temperatura a partir da qual se desencadeia a degradação do material (46). Elas foram obtidas utilizando o *software* Origin85 e estão apresentadas na Tabela 5. A T_{onset} da CB sem modificações químicas foi 315 °C. Nessa temperatura o material é esterilizável por calor úmido, considerando uma autoclavagem à 121 °C. A T_{onset} de todas as amostras de celulose oxidada sofreram uma redução de pelo menos 32 °C. Apesar disso, as CBOx continuam apresentando estabilidade que permite que elas sejam esterilizadas por calor úmido ou passem por uma gama de futuras funcionalizações químicas e biológicas como os exemplos descritos na seção 3.3.4.

Tabela 5 – Temperaturas de *onset* de degradação térmica e temperatura de máxima degradação da CB e CBOx

Amostra	T_{onset} (°C)	T_{max} (°C)
CB	315	336
CBOx-30-Conv-0,75%	276	323
CBOx-30-Conv-1%	274	330
CBOx-30-MO-0,75%	283	329
CBOx-30-MO-1%	273	331

Fonte: Elaborada pela autora

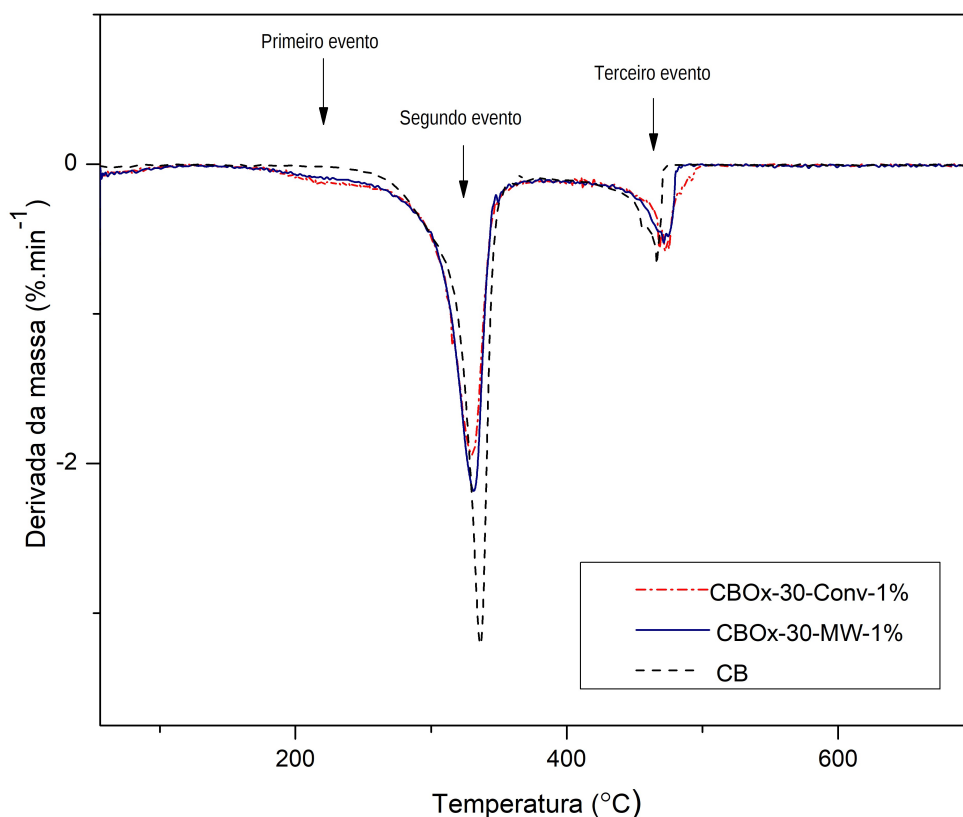
A redução do valor da T_{onset} das CBOx em relação ao valor referente à CB é congruente ao que se conhece sobre as mudanças estruturais sofrida pela CB oxidada por periodato de sódio. Quando se compara os valores entre si pode-se obter informações interessantes. Comparando CBOX-30-Conv-0,75% com CBOX-30-Conv-1% ou CBOX-30-MO-0,75% com CBOX-30-MO-1% percebe-se a redução da T_{onset} com o aumento do GOx. Porém, quando se compara CBOX-30-Conv-0,75% com CBOX-30-MO-0,75% percebe-se que o experimento feito em micro-ondas tem uma T_{onset} significativamente maior do que a T_{onset} da CBOx produzida pelo método convencional. Ademais, CBOX-30-MO-1% possui GOx 37 pontos percentuais mais alto que CBOX-30-Conv-1%, porém as devidas T_{onset} são bastante próximas e suas curvas de degradação são bastante similares. Ou seja, o grau de oxidação da amostra não aparenta estar relacionado às características térmicas do material.

A mudança do T_{onset} está associada a redução do grau de polimerização por hidrólise ácida (133) e redução da cristalinidade (108) que ocorrem durante o processo de oxidação. Isso sugere que, apesar do micro-ondas gerar maiores graus de oxidação que o método convencional para o mesmo conjunto de condições, não houve modificação da estrutura cristalina na mesma taxa. Para comprovar essa hipótese será necessário estudar a cristalinidade do material por difra-

ção de raio-X em um futuro trabalho. Nesse caso, oxidação com micro-ondas teria concentrado a oxidação nas camadas externas da membrana e mantida a cristalinidade nas camadas internas. Esse resultado também sugere que não houve tanta hidrólise ácida da fibras devido ao tempo de reação curto e igual para todos.

A Figura 14 apresenta o gráfico das derivadas da massa do TGA (dTG) para as membranas de CB e CBOx (CB-30-Conv-1% e CB-30-MO-1%). As três etapas dos TGAs são aqui visualizadas como três picos que indicam a temperatura na qual ocorreu a maior perda de massa para aquele evento térmico. O primeiro evento é, como foi explanado acima, a perda de massa referente a evaporação de água residual. Para todas as amostras esse pico é suave, mas ele é mais intenso para as CBOx do que para a CB. Isso indica que as CBOx tinha um maior teor de água residual na sua estrutura, devido em parte à presença de aldeídos hidratados na sua estrutura.

Figura 14 – Curva da derivada da massa obtida a partir da análise termogravimétrica das membranas de CB e CBOx



Fonte: Elaborado pela autora

O segundo evento corresponde à maior perda de massa e ao pico de maior intensidade para todas as curvas na figura. As temperaturas de degradação máxima (T_{\max}) foram obtidas a

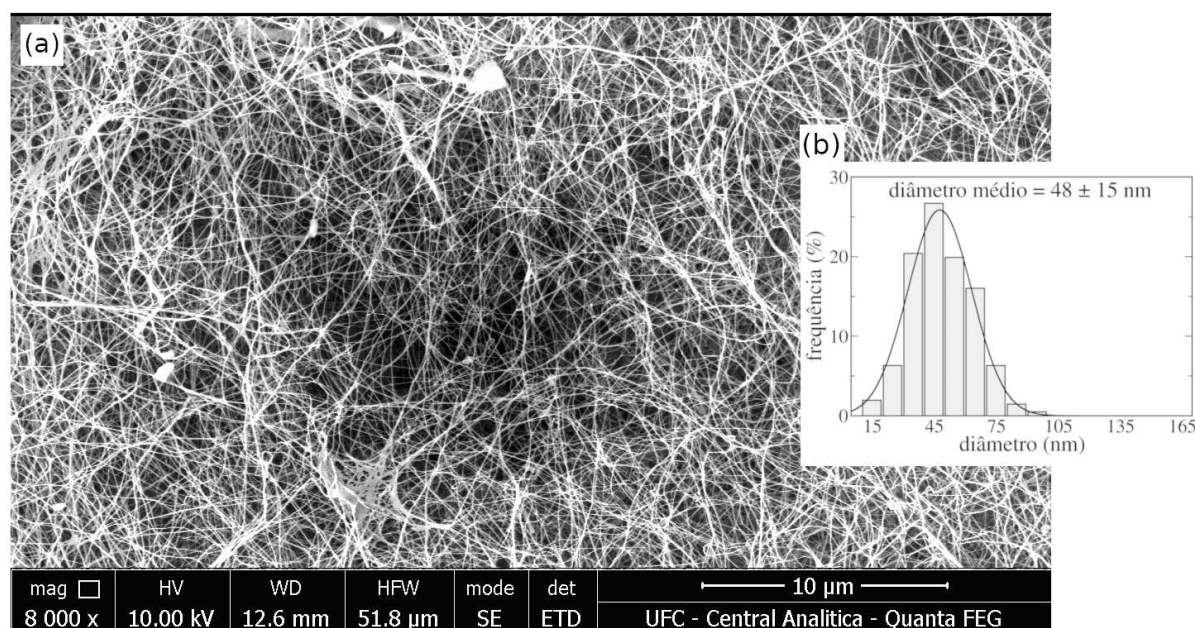
partir desses picos (109) e estão apresentadas na Tabela 5. A diferença entre a T_{\max} da CB para as das CBOx é, em média, 7,75 °C. Isso significa que, apesar do início da degradação das CBOx se dá entre 32 e 42 graus antes da CB, as temperaturas nas quais o material oxidado sofre maior parte da perda de massa é mais próximo a CB sem modificações químicas.

5.4 Morfologia do material oxidado

Microscopia eletrônica de varredura permite visualizar a morfologia das membranas. As micrografias das superfícies das membranas podem ser observadas nas Figuras 15(a), 16(a) e 17(a). As distribuições dos diâmetros das fibrilas estão apresentadas na forma de histograma nas Figuras 15(b), 16(b) e 17(b).

As imagens obtidas da CB mostram uma nano-estrutura 3D formada pela rede contínua de nanofibrilas uniformes e entrelaçadas com diâmetro médio de 48 ± 15 nm. A estrutura observada é característica da superfície das membranas de celulose bacteriana purificada e concorda com as micrografias obtidas por Vasconcelos *et al.* (2020), Li *et al.* (2009) e Shao *et al.* (2017). A orientação aleatória das fibrilas é devida ao movimento esporádico das bactérias no meio de fermentação e é responsável por formar a estrutura de rede (16).

Figura 15 – (a) Micrografia da superfície da membrana de CB e (b) histograma de distribuição de diâmetro de fibra

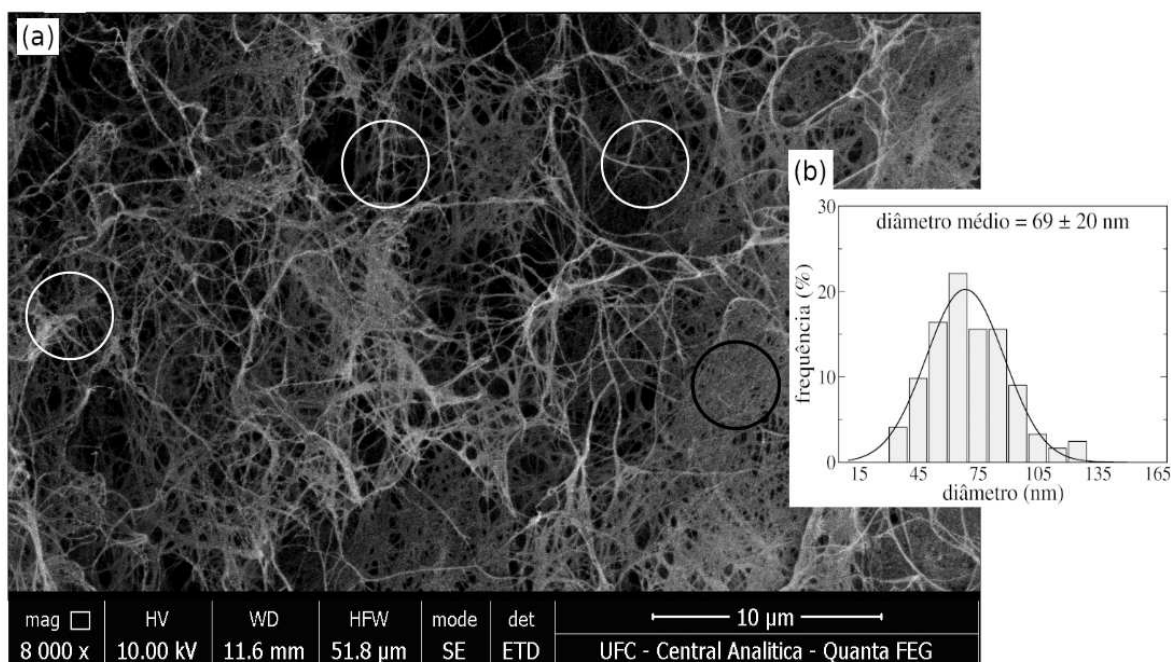


Fonte: Elaborado pela autora

Foram escolhidas as micrografias de CBOx oxidada a 1% de periodato pois elas melhor evidenciam as mudanças morfológicas causadas pela oxidação. As fibras oxidadas têm maior diâmetro médio que as fibras de CB. CBOx-30-Conv-1% sofreu menos mudança na morfologia da fibra que CBOx-30-MO-1%, atributo ligado à menor taxa de oxidação.

Após a oxidação por periodato a rede de fibrilas foi mantida, mas há uma perda na estrutura. O encurtamento de fibras é resultado de hidrólise das ligações glicosídicas entre os monômeros que compõem a celulose e a Figura 16 permite visualizar o encurtamento nitidamente, destacado em branco. Isso é um dos fatores responsáveis pelo encolhimento macroscópico da membrana que foi descrita no início desse capítulo e visto na Figura 10.

Figura 16 – (a) Micrografia da superfície da membrana de CBOx-30-Conv-1% e (b) histograma de distribuição de diâmetro de fibra



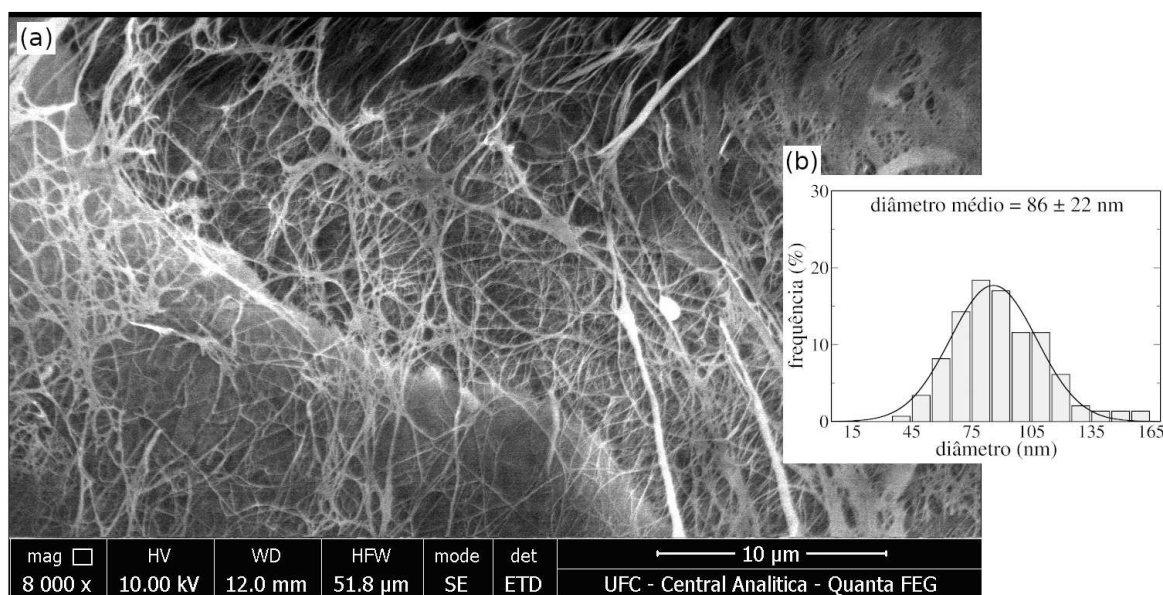
Fonte: Elaborado pela autora

Agregação de fibrila é o outro fator responsável pelo encolhimento da membrana e pode ser visto tanto na Figura 16 (destaque em preto) quanto na Figura 17. CBOx-30-MO-1% mostrou maior agregação de fibras, mas, notavelmente, menos perda de extensão das fibras do que a membrana oxidada pelo método convencional. Isso sugere que a oxidação ocorreu de maneira mais homogênea no micro-ondas que no método por aquecimento convectivo.

As mudanças morfológicas da CB são devidas não só à ação do agente oxidante, mas também ao pH baixo do meio reacional e temperatura que causam a hidrólise das fibrilas. Já que o micro-ondas possibilita atingir um certo grau de oxidação em menor tempo que os métodos

convencionais, o material obtido também sofrerá menos desgaste devido a queda do tempo que ele fica sob condições severas. Quando se deseja obter níveis altos de oxidação, onde a própria modificação química fragiliza a estrutura da CB, a possibilidade de minimizar desgaste adicional é um diferencial.

Figura 17 – (a) Micrografia da superfície da membrana de CBOx-30-MO-1% e (b) histograma de distribuição de diâmetro de fibra



Fonte: Elaborado pela autora

5.5 Avaliação da composição química por XPS

XPS permite investigar a composição química da superfície da membrana de CB por meio das concentrações atômicas relativas e o estado eletrônico dos carbonos da superfície da amostra. As informações obtidas por XPS estão organizadas nas Tabelas 6 e 7 e nos gráficos expostos na Figura 18.

A Tabela 6 mostra a composição elementar das amostras em porcentagem, especificamente as quantidades de carbono, oxigênio e nitrogênio que compõem a amostra. Nitrogênio só estava presente em duas amostras e indica resíduo proteico no local onde foi feita a leitura. Tabela 7 mostra as concentrações relativas entre oxigênio e carbono (O/C) na superfície das amostras e resume a contribuição dos estados químicos do carbono no espectro deconvolvido C1s. Esses valores foram obtidos usando a Equação (4.2) e serão explorados adiante.

Tabela 6 – Composição química das amostras de CB e CBOx. A composição está em porcentagem do total

Amostra	C	N	O	Na
CB	60,16	4,93	34,45	0,46
CBOx-30-Conv-0,75%	56,06	–	43,95	–
CBOx-30-MO-0,75%	60,08	–	39,92	–
CBOx-30-MO-1%	61,17	2,52	36,31	–

Fonte: Elaborada pela autora

Tabela 7 – Razão atômica de carbono e oxigênio e contribuição dos estados químicos do carbono na deconvolução dos espectros C1s obtido por XPS

Amostra	O/C	(C3+C4)/C2
CB	0,57	0,39
CBOx-30-Conv-0,75%	0,73	0,44
CBOx-30-MO-0,75%	0,66	0,54
CBOx-30-MO-1%	0,59	0,80

Fonte: Elaborada pela autora

De acordo com Topalovic *et al.* (135), a razão O/C teórica para celulose pura é 0,83. Assim, o experimental obtido para a CB, 0,57, foi significativamente menor do que o teórico. Topalovic *et al.*, usando fibras de celulose de algodão, obtiveram valores de O/C variando entre 0,32 e 0,76 e influenciados positivamente pela robustez dos métodos de purificação. Outros autores reportaram tendências similares e determinaram a dificuldade de se obter razões O/C próximas do teórico (111, 136, 137). De maneira geral, o valor O/C experimental se afasta do valor teórico devido a presença de contaminantes como outros polímeros, hidrocarbonetos ou proteínas. Como pode ser verificado na Tabela 6 a presença de 4,93% de nitrogênio e aproximadamente 0,50% de sódio na composição atômica da membrana de CB indica que o material estava contaminado com resíduos de proteínas ou meio de fermentação.

As razões O/C das amostras oxidadas são todas superiores à da CB, mas percebe-se uma diminuição do valor com o aumento do grau de oxidação. Dado que todas as amostras foram produzidas a partir do mesmo lote de CB purificada, o aumento da razão O/C em relação à CB não oxidada é devido ao tratamento químico e as várias lavagens em água destilada pelos quais passam as membranas. Esse tratamento permite finalizar a retirada de contaminantes proteicos que restaram após a purificação. Topalovic *et al.* (135) estabeleceram que o método de purificação influencia o valor da razão atômica e Li *et al.* (111) reportaram valores semelhantes

aos apresentados aqui devido à modificação química por periodato de sódio - 0,6 para a CB e 0,73 para sua amostra oxidada.

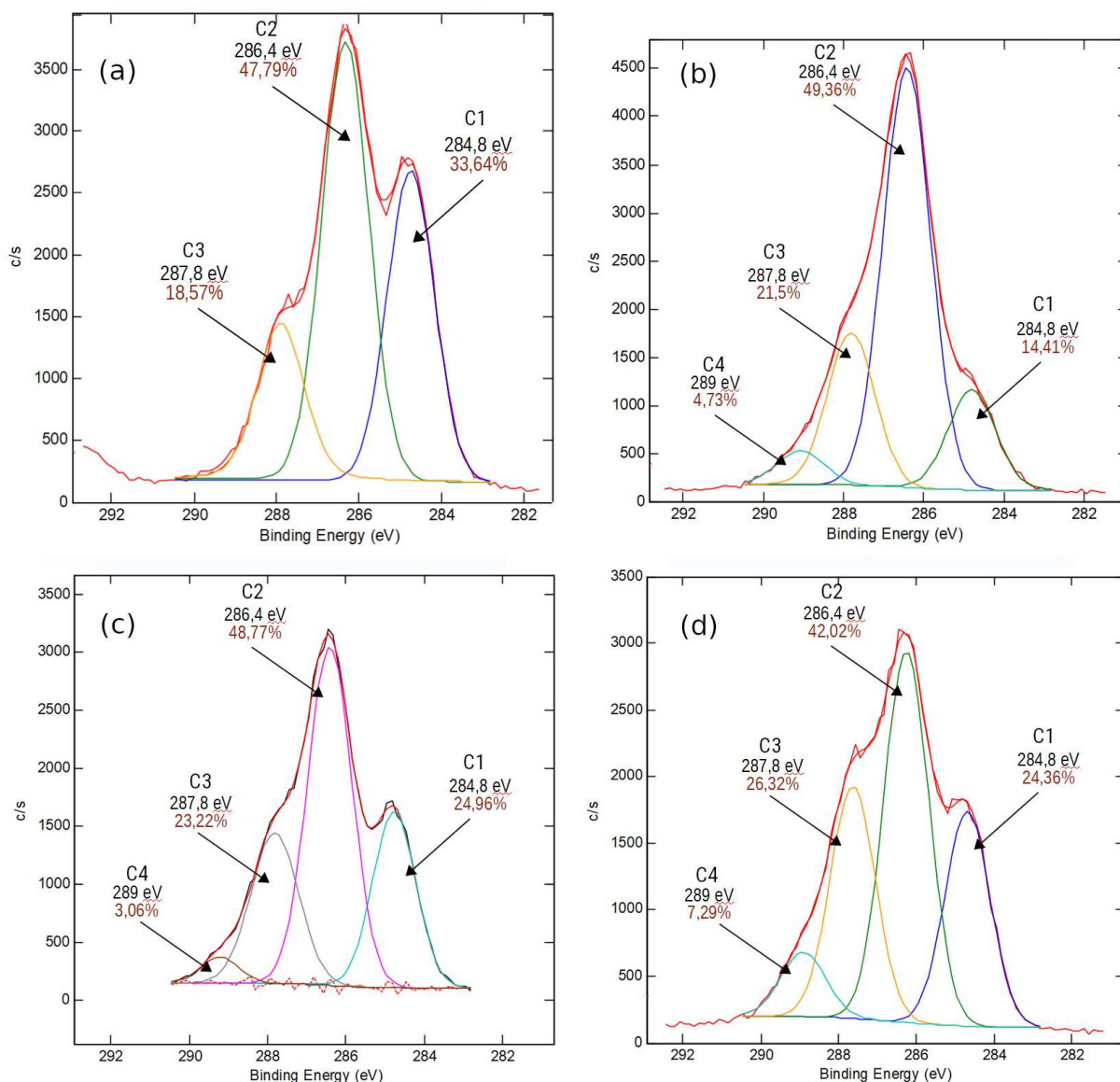
Na produção de DAC não ocorre a inserção de átomos de oxigênio, somente a mudança das ligações e estados de valência dos átomos. Assim, não se espera mudança na razão O/C entre amostras oxidadas em diferentes condições. Porém, a queda do valor de acordo com o aumento do grau de oxidação é evidente. Possivelmente, esse comportamento é devido à degradação do material. A produção de DAC requer a quebra do anel de glicopirranose e ocorre em meio ácido, dois fatores que promovem a hidrólise das fibrilas. O encurtamento das fibras de CB pode também levar a perda de átomos de oxigênio (112). Essa hipótese condiz com as micrografias apresentadas nas Figuras 16 e 17 que mostram um encurtamento significativo das fibras da superfície do material oxidado. Li *et al.* (111) reportaram a queda da razão O/C em membranas que foram degradadas em tampões fisiológicos, sugerindo que tal comportamento é diretamente ligado à degradação física da superfície do material.

A deconvolução do espectro C1s, o espectro de energia de ligação dos carbonos, de cada amostra permite um estudo mais detalhado dos estados químicos do carbono que compõem as superfícies das membranas. Os espectros foram deconvoluídos em três ou quatro contribuições, nomeadas C1, C2, C3 e C4. A primeira contribuição (C1) ocorre em 284,8 eV e representa carbonos possuindo ligações carbono-carbono (C–C) ou carbono-hidrogênio (C–H). Esse pico representa os carbonos envolvidos na construção das glicopirranoses que compõem a celulose, incluindo a ligação entre os carbonos 2 e 3 que é quebrada durante a oxidação, mas também inclui o carbono adventício. O carbono adventício refere-se à contaminação acidental que ocorre quando um material tem contato com o ar. Ele se apresenta como uma fina camada de material carbonáceo composto de hidrocarbonetos simples ou originado da interação de CO₂ com o material (138). Desta maneira, C1 é usado como referência de energia de ligação na qual se baseia a deconvolução dos outros picos mas, devido a natureza do carbono adventício, não deve ser considerado para tirar conclusões.

Para os fins desse trabalho, as próximas contribuições do C1s são explicadas conforme a relação do carbono com oxigênio. A segunda contribuição (C2) ocorre em 286,4 eV e representa os carbonos possuindo uma ligação covalente com oxigênio (C–O). Nessa contribuição encontra-se a estrutura natural da celulose, pois cinco dos seis carbonos que compõe a glicopirranose estão ligados a um único átomo de oxigênio. A terceira (C3) e quarta (C4) contribuições encontram-se em energias de ligações mais altas – 287,8 eV e 289,0 eV – e incorporam

os carbonos que possuem, respectivamente, duas ($\text{C}=\text{O}$ e $\text{O}-\text{C}-\text{O}$) ou três ($\text{O}-\text{C}=\text{O}$) ligações covalentes com oxigênio. Dado a natureza da reação de oxidação com periodato, espera-se encontrar uma queda na contribuição do C2 e um aumento na contribuição do C3, representando a mudança do carbono a um estado de oxidação maior.

Figura 18 – Deconvolução dos espectros C1s para as membranas (a) CB sem modificação química, (b) CBOx-30-Conv-0,75%, (c) CBOx-30-MO-0,75% e (d) CBOx-30-MO-1%. Em cada figura, C1 representa a contribuição das ligações $\text{C}-\text{C}$ e $\text{C}-\text{H}$, C2 representa a contribuição de $\text{C}-\text{O}$, C3 representa $\text{C}=\text{O}$ e $\text{O}-\text{C}-\text{O}$ e C4, $\text{O}-\text{C}=\text{O}$.



Fonte: Elaborado pela autora

As deconvoluções podem ser verificadas nas figuras 18(a – d) juntamente com os devidos valores de área da curva para cada contribuição. Percebe-se que, entre o espectro da CB, Figura 18(a), e os espectros das CBOx, há uma queda significativa da intensidade do pico

C1. É possível que essa queda esteja diretamente associada à quebra dos anéis de glicopiranosose e ao encurtamento das fibrilas devido a degradação. Porém, deve-se lembrar que o pico C1 é influenciado pela presença de carbono adventício e os valores atribuídos a esse pico não são perfeitamente confiáveis.

Vê-se uma modificação súbita na intensidade do pico C2 nos espectros de CBOx-30-Conv-0,75% e CBOx-30-MO-0,75% e uma redução mais acentuada na amostra mais oxidada, CBOx-30-MO-1%. Percebe-se um aumento considerável da contribuição de C3 em todas as amostras oxidadas que é atribuída a formação do aldeído ($\text{C}=\text{O}$) e da estrutura secundária hemiacetal ($\text{O}-\text{C}-\text{O}$). O pico C4 não está presente no espectro da CB mas está presente em todas as três amostras oxidadas, e pode ser um indicativo de que houve uma segunda oxidação na qual aldeídos foram oxidados a grupos carboxílicos ($\text{O}-\text{C}=\text{O}$). Essa estrutura não foi determinada no FTIR pois sua concentração relativa é baixa e as ligações características de ácido carboxílicos – hidróxido (banda em 3000 cm^{-1}) e carbonila (banda em 1760 cm^{-1}) – são mascarados pelas bandas dos álcoois e aldeídos nas mesmas regiões. A presença de ácidos carboxílicos após pouco tempo de reação não é comum e provavelmente é resultado da alta temperatura (94).

As devidas áreas relativas de cada pico foram aplicadas na Equação (4.2) e os valores obtidos estão descritos na Tabela 7. Esses valores descrevem a razão entre o C2 e os picos C3 e C4. A tabela evidencia o aumento dessa razão, o que significa que os carbonos em maior estado de oxidação, que representam os produtos oxidados desejados, ganham importância em relação ao carbono típico da glicose. O aumento progressivo desses valores refletem o aumento dos GOx nas dadas condições e confirmam mais uma vez a modificação química.

6 CONCLUSÕES

Esse trabalho descreveu uma metodologia para oxidação de membrana de celulose bacteriana com periodato de sódio assistida por micro-ondas e caracterizou o material funcionalizado por métodos químicos e físicos. O material oxidado em micro-ondas foi discutido frente a CB oxidada com aquecimento convectivo para determinar se o micro-ondas pode ser implementado como uma alternativa aos métodos convencionais.

Dado um intervalo de tempo fixo, o uso do micro-ondas permitiu converter a CB em DAC em taxas maiores que o método convencional sob as mesmas condições de temperatura e concentração de reagente. No intervalo de 30 minutos, temperatura de 90 °C e uma concentração inicial de 1% de periodato o micro-ondas gerou um material 73,6% oxidado enquanto o aquecimento convencional levou a uma oxidação de somente 36,0%. Também foi possível concluir que, devido à razão área-volume muito pequena da membrana de celulose, a concentração inicial de periodato teve menor influência sobre o grau de oxidação à medida que se aumenta o tempo disponível. Assim, é possível determinar o melhor investimento de reagentes e tempo para fins de obter um resultado desejado.

FTIR e XPS comprovaram a inserção de aldeídos na estrutura da celulose e XPS mostrou uma segunda oxidação resultando na formação de ácidos carboxílicos devido ao uso de temperaturas altas. A morfologia das CBOx indicou que o método por micro-ondas causa menor dano à microestrutura que os métodos convencionais, comportamento especialmente valioso quando se busca níveis de oxidação altos. A avaliação da estabilidade térmica também indica que os efeitos do micro-ondas na morfologia são refletidas sobre a cristalinidade do material.

7 TRABALHOS FUTUROS

Um complemento importante é a confirmação direta dos efeitos na cristalografia por meio de difração de raio-X. A diversidade de aplicações da CB é devida às particularidades da sua estrutura, logo um método que minimize a perda dessas características pode ser uma importante ferramenta.

Outros ensaios interessantes para complementar o conhecimento sobre o método são os de entumescimento e degradabilidade no tempo. Sabe-se que a degradabilidade é função do teor de oxidação, então será interessante obter um conhecimento mais completo quanto à forma que os parâmetros do processo e suas variações podem ser usados para controlar a degradabilidade do produto. Também será interessante determinar como o grau de oxidação se comporta em relação ao tempo com o uso do micro-ondas. Esses ensaios todos vão permitir um controle mais fino do processo de oxidação e das características dadas ao material.

Tendo agora uma boa compreensão sobre como o micro-ondas pode ser usado para otimizar a produção de 2,3-dialdeído celulose, esse método pode ser aplicado no desenvolvimento de materiais à base de celulose oxidada. Como continuação direta desse trabalho, CB oxidada com micro-ondas será usada na produção de um *scaffold* biodegradável para regeneração de tecido ósseo dentário funcionalizado com alendronato de sódio.

REFERÊNCIAS

- 1 AZEREDO, H. M. C. *et al.* Bacterial cellulose as a raw material for food and food packaging applications. **Frontiers in Sustainable Food Systems**, 2019.
- 2 UL-ISLAM, M. *et al.* Bacterial cellulose composites: Synthetic strategies and multiple applications in bio-medical and electro-conductive fields. **Biotechnology Journal**, v. 10, n. 12, p. 1847–1861, 2015.
- 3 CHARREAU, H. *et al.* Nanocellulose patents trends: A comprehensive review on patents on cellulose nanocrystals, microfibrillated and bacterial cellulose. **Recent Patents on Nanotechnology**, v. 7, n. 1, p. 56–80, 2013.
- 4 PICHETH, G. F. *et al.* Bacterial cellulose in biomedical applications: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 104A, p. 97–106, 2017.
- 5 MÜNSTER, L. **Dialdehyde cellulose preparation, characterization and utilization as crosslinking agent for PVA**. Tese (Doctorate in Chemistry and Materials Technology) — Tomas Bata University, Zlin, 2018.
- 6 NÜCHTER, M. *et al.* Microwave assisted synthesis: A critical technology overview. **Green Chemistry**, v. 6, n. 3, p. 128–141, 2004.
- 7 ZHAO, Y.; LI, J. Excellent chemical and material cellulose from tunicates: diversity in cellulose production yield and chemical and morphological structures from different tunicate species. **Cellulose**, v. 21, p. 3427–3441, 2014.
- 8 KLEMM, D. *et al.* Cellulose: Fascinating biopolymer and sustainable raw material. **Angewandte Chemie International**, v. 44, n. 22, p. 3358–3393, 2005.
- 9 DUFRESNE, A. **Nanocellulose: From Nature to High Performance Tailored Materials**. New York: [s.n.], 2012.
- 10 WERTZ, J.-L. *et al.* **Cellulose science and technology**. Lausanne: [s.n.], 2010.
- 11 BROWN, A. J. On an acetic ferment which forms cellulose. **Journal of the Chemical Society, Transactions**, v. 49, p. 432–439, 1886.
- 12 WANG, J. *et al.* Bacterial cellulose production, properties and applications with different culture methods – a review. **Carbohydrate Polymers**, v. 219, p. 63–76, 2019.
- 13 WILLIAMS, W. S.; CANNON, R. E. Alternative environmental roles for cellulose produced by acetobacter xylinum. **General Microbial Ecology**, v. 55, n. 10, p. 2448–2452, 1989.
- 14 GAMA, M. *et al.* **Bacterial Nanocellulose: From Biotechnology to Bio-Economy**. [S.l.: s.n.], 2016.
- 15 ROSS, P. *et al.* Cellulose biosynthesis and function in bacteria. **Microbiology Review**, v. 55, n. 1, p. 35–58.
- 16 WANG, S. S. *et al.* Insights into bacterial cellulose biosynthesis from different carbon sources and the associated biochemical transformation pathways in *Komagataeibacter sp.* **Polymers**, v. 10, n. 9, p. 963, 2018.

- 17 HIRAI, A. *et al.* Tem study of band-like cellulose assemblies produced by *Acetobacter xylinum* at 4°C. **Cellulose**, v. 9, p. 105–113, 2002.
- 18 BASU, A. *et al.* A novel platform for evaluating the environmental impacts on bacterial cellulose production. **Scientific Reports**, v. 8, p. 5780, 2018.
- 19 YAMADA, Y. *et al.* Description of *Komagataeibacter* gen. nov., with proposals of new combinations (*Acetobacteraceae*). **Journal of General and Applied Microbiology**, v. 58, n. 5, p. 397–404, 2012.
- 20 IGUCHI, M. *et al.* Bacterial cellulose - a masterpiece of nature's arts. **Journal of Materials Science**, v. 35, n. 2, p. 261–270, 2000.
- 21 CZAJA, W. *et al.* Structural investigations of microbial cellulose produced in stationary and agitated culture. **Cellulose**, v. 11, p. 403–411, 2004.
- 22 KHAN, T. *et al.* Functional biopolymers produced by biochemical technology considering applications in food engineering. **Korean Journal of Chemical Engineering**, v. 24, n. 5, p. 816–826, 2007.
- 23 REBELO, A. R. *et al.* Dehydration of bacterial cellulose and the water content effects on its viscoelastic and electrochemical properties. **Science and Technology of Advanced Materials**, v. 19, n. 1, p. 203–211, 2018.
- 24 YAMANAKA, S. *et al.* The structure and mechanical properties of sheets prepared from bacterial cellulose. **Journal of Materials Science**, v. 24(9), p. 3141–3145, 1989.
- 25 NISHI, Y. *et al.* The structure and mechanical properties of sheets prepared from bacterial cellulose - part 2 improvement of the mechanical properties of sheets and their applicability to diaphragms of electroacoustic transducers. **Journal of Materials Science**, v. 25, n. 6, p. 2997–3001, 1990.
- 26 MOHITE, B. V.; PATIL, S. V. A novel biomaterial: Bacterial cellulose and its new era applications. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 61, n. 2, p. 101–110, 2014.
- 27 MENG, C. *et al.* Controllable synthesis uniform spherical bacterial cellulose and their applications. **Cellulose**, v. 26, p. 8325–8336, 2019.
- 28 HESTRIN, S.; SCHRAMM, M. Synthesis of cellulose by *Acetobacter xylinum*. **Biochemistry Journal**, v. 58, n. 2, p. 345–352, 1954.
- 29 VAZQUEZ, A. *et al.* Bacterial cellulose from simple and low cost production media by *Gluconacetobacter xylinus*. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 21, p. 545–554, 2013.
- 30 CHEN, L. *et al.* Biotransformation of wheat straw to bacterial cellulose and its mechanism. **Bioresource Technology**, v. 135, p. 464–468, 2013.
- 31 KUROSUMI, A. *et al.* Utilization of various fruit juices as carbon source for production of bacterial cellulose by *acetobacter xylinum* nbrc 13693. **Carbohydrate Polymers**, v. 76, n. 2, p. 333–335, 2009.
- 32 UHLIN, K. *et al.* Influence of hemicelluloses on the aggregation patters of bacterial cellulose. **Cellulose**, v. 2, n. 2, p. 129–144, 1995.

- 33 URBINA, L. *et al.* Design of reusable novel membranes based on bacterial cellulose and chitosan for the filtration of copper in wastewaters. **Carbohydrate Polymers**, v. 193, p. 362–372, 2018.
- 34 JIA, Y. *et al.* Preparation and characterization of a novel bacterial cellulose/chitosan bio-hydrogel. **Nanomaterials and Nanotechnology**, v. 7, p. 1–8, 2017.
- 35 SEIFERT, M. *et al.* Controlling the water content of never dried and reswollen bacterial cellulose by the addition of water-soluble polymers to the culture medium. **Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry**, v. 42, n. 3, p. 463–470, 2004.
- 36 GEA, S. *et al.* Bacterial cellulose-poly(vinyl alcohol) nanocomposites prepared by an in-situ process. **Materials Letters**, v. 64, n. 8, p. 901–904, 2010.
- 37 BROWN, E.; LABORIE, M. Bioengineering bacterial cellulose/poly(ethylene oxide) nanocomposite. **Biomacromolecules**, v. 8, n. 10, p. 3074–3081, 2007.
- 38 LEE, K.-Y. **Nanocellulose and Sustainability: Production, Properties, Applications and Case Studies**. [S.l.: s.n.], 2018.
- 39 DOURADO, F. *et al.* A review on the toxicology and dietetic role of bacterial cellulose. **Toxicology Reports**, v. 4, p. 543–553, 2017.
- 40 NSOR-ATINDANA, J. *et al.* Functionality and nutritional aspects of microcrystalline cellulose in food. **Carbohydrate Polymers**, v. 172, p. 159, 2017.
- 41 SHI, Z. *et al.* Utilization of bacterial cellulose in food. **Food Hydrocolloid**, v. 35, p. 539–545, 2014.
- 42 ULLAH, H. *et al.* Applications of bacterial cellulose in food, cosmetics and drug delivery. **Cellulose**, v. 23, p. 2291–2314, 2016.
- 43 NG, C.; SHYU, Y. Development and production of cholesterol-lowering *Monascus-nata* complex. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 20, p. 875–879, 2004.
- 44 LIN, S.-B. *et al.* Physical characteristics of surimi and bacterial cellulose composite gel. **Journal of Food Process Engineering**, v. 34, p. 1363–1379, 2011.
- 45 LIN, K. W.; LIN, H. Y. Quality characteristics of chinese-style meatball containing bacterial cellulose. **Journal of Food Science**, v. 69, n. 3, p. SNQ107–SNQ111, 2006.
- 46 LIU, X.; YU, W. Evaluating the thermal stability of high performance fibers by TGA. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 99, p. 937–944, 2006.
- 47 PADRÃO, J. *et al.* Bacterial cellulose-lactoferrin as an antimicrobial edible packaging. **Food Hydrocolloids**, v. 58, n. 7, p. 126–140, 2016.
- 48 ZHU, H. *et al.* Characterization of bacteriostatic sausage casing: A composite of bacterial cellulose embedded with ϵ -polylysine. **Food Science and Biotechnology**, v. 19, p. 1479–1484, 2010.
- 49 WAN, Y. *et al.* Biofabrication of a novel bacteria/bacterial cellulose composite for improved adsorption capacity. **Composites Part A: Applied Science and Manufacturing**, v. 125, n. 105560, 2019.

- 50 SUN, D. *et al.* Novel pd-cu/bacterial cellulose nanofibers: Preparation and excellent performance in catalytic denitrification. **Applied Surface Science**, v. 256, n. 7, p. 2241–2244, 2010.
- 51 BRANDES, R. *et al.* Spherical bacterial cellulose/TiO₂ nanocomposite with potential application in contaminants removal from wastewater by photocatalysis. **Fibers and Polymers**, v. 19, n. 9, p. 1861–1868, 2018.
- 52 MOHITE, B. V.; PATIL, S. V. Bacterial cellulose of gluconoacetobacter hansenii as a potential bioadsorption agent for its green environment applications. **Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition**, v. 25, n. 18, p. 2053–2065, 2014.
- 53 RUAN, C. Q. *et al.* Preparation of porous 2,3-dialdehyde cellulose beads crosslinked with chitosan and their application in adsorption of congo red dye. **Carbohydrate Polymers**, v. 181, p. 200–207, 2018.
- 54 REZAEI, A. *et al.* Removal of arsenic using acetobacter xylinum cellulose. **Journal of Biological Sciences**, v. 8, n. 1, p. 209–212, 2008.
- 55 LU, M. *et al.* Characteristic and mechanism of Cr(VI) adsorption by ammonium sulfamate-bacterial cellulose in aqueous solutions. **Chinese Chemical Letters**, v. 24, n. 3, p. 253–256, 2013.
- 56 PATIL, S. V. *et al.* Studies on characterization of bioflocculant exopolysaccharide of azotobacter indicus and its potential for wastewater treatment. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 163, p. 463–472, 2010.
- 57 JIN, X. *et al.* Polyethyleneimine-bacterial cellulose bioadsorbent for effective removal of copper and lead ions from aqueous solution. **Bioresource Technology**, v. 244, n. 8, p. 844–849, 2017.
- 58 SIRVIÖ, J. A. *et al.* Bisphosphonate nanocellulose in the removal of vanadium (V) from water. **Cellulose**, v. 23, n. 1, p. 689–697, 2016.
- 59 ZHANG, T. *et al.* Gas phase synthesis of aminated nanocellulose aerogel for carbon dioxide adsorption. **Cellulose**, v. 27, p. 2953–2958, 2020.
- 60 AMNUAIKIT, T. *et al.* Effects of a cellulose mask synthesized by a bacterium on facial skin characteristics and user satisfaction. **Medical Devices: Evidence and Research**, v. 4, p. 77–81, 2011.
- 61 JOHNSON; INC, J. P. **Liquid loaded pad for medical applications**. US Patent and Trademark Office, 1982. US4588400A. Disponível em: <<https://patents.google.com/patent/US4588400A/en>>.
- 62 CORP, N. I. **Bacterial cellulose film and uses thereof**. US Patent and Trademark Office, 2011. US8772003B2. Disponível em: <<https://patents.google.com/patent/US8772003B2/en>>.
- 63 SULAEVA, I. *et al.* Bacterial cellulose as a material for wound treatment: Properties and modifications. a review. **Biotechnology Advances**, v. 33(8), p. 1547–71, 2015.
- 64 FU, L. *et al.* Present status and applications of bacterial cellulose-based materials for skin tissue repair. **Carbohydrate Polymers**, v. 92, n. 2, p. 1432–1442, 2013.

- 65 SCHMITZ, M. *et al.* Wound treatment costs comparing a bio-cellulose dressing with moist wound healing dressings and conventional dressings. **Wound Medicine**, v. 6, p. 11–14, 2014.
- 66 PORTELA, R. *et al.* Bacterial cellulose: a versatile biopolymer for wound dressing applications. **Microbial Biotechnology**, v. 12, n. 4, p. 586–610, 2019.
- 67 SOLWAY, D. R. *et al.* A parallel open-label trial to evaluate microbial cellulose wound dressing in the treatment of diabetic foot ulcers. **International Wound Journal**, v. 8, n. 1, 2010.
- 68 SAJJAD, W. *et al.* Development of modified montmorillonite-bacterial cellulose nanocomposites as a novel substitute for burn skin and tissue regeneration. **Carbohydrate Polymers**, v. 206, p. 548–556, 2019.
- 69 HU, Y. *et al.* Surface engineering of spongy bacterial cellulose via constructing crossed groove/column micropattern by low-energy CO₂ laser photolithography toward scar-free wound healing. **Materials Science and Engineering C**, v. 99, p. 333–343, 2019.
- 70 VASCONCELOS, N. F. *et al.* Oxidized bacterial cellulose membrane as support for enzyme immobilization: properties and morphological features. **Cellulose**, v. 27, n. 5, p. 3055–2083, 2020.
- 71 LOH, E. Y. X. *et al.* Development of a bacterial cellulose-based hydrogel cell carrier containing keratinocytes and fibroblasts for full-thickness wound healing. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 2875, 2018.
- 72 HODEL, K. V. S. *et al.* Evaluation of different methods for cultivating *Gluconacetobacter hansenii* for bacterial cellulose and montmorillonite biocomposite production: Wound-dressing applications. **Polymers**, v. 12, n. 2, p. 267, 2020.
- 73 BAYAZIDI, P. *et al.* Immobilization of lysozyme on bacterial cellulose nanofibers: Characteristics, antimicrobial activity and morphological properties. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 107, p. 2544–2551, 2018.
- 74 KIM, H. *et al.* Bacterial cellulose-chitosan composite hydrogel beads for enzyme immobilization. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 22, p. 89–94, 2017.
- 75 BADSHAH, M. *et al.* Surface modification and evaluation of bacterial cellulose for drug delivery. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 113, p. 526–533, 2018.
- 76 MISHRA, D. *et al.* Potential of di-aldehyde cellulose for sustained release of oxytetracycline: A pharmacokinetic study. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 136, p. 97–105, 2019.
- 77 WANG, Y. *et al.* Highly transparent, highly flexible composite membrane with multiple antimicrobial effects used for promoting wound healing. **Carbohydrate Polymers**, v. 222, p. 114985, 2019.
- 78 SAÏDI, L. *et al.* Poly(N-methacryloyl glycine)/nanocellulose composites as pH-sensitive systems for controlled release of diclofenac. **Carbohydrate Polymers**, v. 169, p. 357–365, 2017.
- 79 SIANGSANO, C. *et al.* Fabrication and characterization of triple-responsive composite hydrogel for targeted and controlled drug delivery system. **Journal of Molecular Liquids**, v. 256, p. 90–99, 2018.

- 80 CHEN, Q.; THOUAS, G. **Biomaterials: A Basic Introduction**. New York: [s.n.], 2012.
- 81 DIAS, J. G. *et al.* Osseous regeneration in the presence of oxidized cellulose and collagen. **Journal of Material Sciences: Materials in Medicine**, v. 14, n. 9, p. 739–45, 2003.
- 82 MARTÍNEZ, H. *et al.* Mechanical stimulation of fibroblasts in micro-channeled bacterial cellulose scaffolds enhances production of oriented collagen fibers. **Journal of Biomedical Material Research Part A**, v. 100A, p. 948–957, 2012.
- 83 PETERSON, N.; GATENHOLM, P. Bacterial cellulose-based materials and medical devices: current state and perspectives. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 91, n. 5, p. 1277–86, 2011.
- 84 CONCARO, S. *et al.* Bacterial cellulose as a potential material for meniscal tissue engineering. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 15B, p. B75, 2007.
- 85 SAIZ, E. *et al.* Perspectives on the role of nanotechnology in bone tissue engineering. **Dent. Mater.**, v. 29(1), p. 103–115, 2013.
- 86 SCHUMANN, D. A. *et al.* Artificial vascular implants from bacterial cellulose: preliminary results of small arterial substitutes. **Cellulose**, v. 16, p. 877–885, 2009.
- 87 WAN, Y. *et al.* Preparation and characterization of bacterial cellulose/heparin hybrid nanofiber for potential vascular tissue engineering scaffolds. **Polymers for Advanced Technologies**, v. 22, n. 12, 2011.
- 88 WANG, B. *et al.* Urethra-inspired biomimetic scaffold: A therapeutic strategy to promote angiogenesis for urethral regeneration in a rabbit model. **Acta Biomaterialia**, v. 102, n. 1, p. 247–258, 2020.
- 89 LV, X. *et al.* A smart bilayered scaffold supporting keratinocytes and muscle cells in micro/nano-scale for urethral reconstruction. **Theranostics**, v. 8, n. 11, p. 3153–3163, 2018.
- 90 SILVEIRA, F. C. A. *et al.* Treatment of tympanic membrane perforation using bacterial cellulose: a randomized controlled trial. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, v. 82, 2016.
- 91 MANDOUR, Y. M. H. *et al.* Bacterial cellulose graft versus fat graft in closure of tympanic membrane perforation. **American Journal of Otolaryngology**, v. 40, n. 2, p. 168–172, 2019.
- 92 ZHANG, C. *et al.* Biocompatibility evaluation of bacterial cellulose as a scaffold material for tissue-engineered corneal stroma. **Cellulose**, v. 27, p. 2775–2784, 2020.
- 93 HAN, Y. *et al.* Studies on bacterial cellulose/poly vinyl alcohol (BC/PVA) hydrogel composites as tissue-engineered corneal stroma. **Biomedical Materials**, 2019.
- 94 KLEMM, D. *et al.* **Comprehensive Cellulose Chemistry**. Weinheim: [s.n.], 1998. v. 2: Functionalization of Cellulose.
- 95 HONDO, H. *et al.* Preparation of oxidized celluloses in a NaBr/NaClO system using 2-azaadamantane N-oxyl (AZADO) derivatives in water at pH 10. **Cellulose**, v. 26, p. 1479–1487, 2019.

- 96 TAKAICHI, S.; ISOGAI, A. Oxidation of wood cellulose using 2-azaadamantane N-oxyl (AZADO) or 1-methyl-AZADO catalyst in NaBr/NaClO system. **Cellulose**, v. 20, p. 1979–1988, 2013.
- 97 FILIPOVA, I. *et al.* Oxidative treatments for cellulose nanofibers production: a comparative study between TEMPO-mediated and ammonium persulfate oxidation. **Cellulose**, 2020.
- 98 NASCIMENTO, E. S. *et al.* Tempo oxidation and high-speed blending as a combined approach to disassemble bacterial cellulose. **Cellulose**, v. 26, p. 2291–2302, 2019.
- 99 KRISTIANSEN, K. A. *et al.* Periodate oxidation of polysaccharides for modification of chemical and physical properties. **Carbohydrate Research**, v. 345, p. 1264–1271, 2010.
- 100 VARMA, A. J.; KULKARNI, M. P. Oxidation of cellulose under controlled conditions. **Polymer Degradation and Stability**, v. 77, n. 1, p. 25–27, 2002.
- 101 SIRVIÖ, J. *et al.* Periodate oxidation of cellulose at elevated temperatures using metal salts as cellulose activators. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, n. 3, p. 1293–1297, 2011.
- 102 LUCIA, A. *et al.* Resource-saving production of dialdehyde cellulose: Optimization of the process at high pulp consistency. **Chem. Sus. Chem.**, v. 12, n. 20, p. 4679–4684, 2019.
- 103 CALVINI, P. *et al.* Viscometric determination of dialdehyde content in periodate oxycellulose part ii. topochemistry of oxidation. **Cellulose**, v. 13, p. 571–579, 2006.
- 104 KIM, U. J. *et al.* Periodate oxidation of crystalline cellulose. **Biomacromolecules**, v. 1, n. 3, p. 488–492, 2000.
- 105 HURD, C. D. Hemiacetals, aldals and hemialdals. **Journal of Chemical Education**, v. 43, n. 10, p. 527, 1966.
- 106 LEGUY, J. *et al.* Ultrastructural characterization of the core-shell structure of a wide range of periodate-oxidized cellulose from different native sources by solid-state ¹³C CP-MAS NMR. **ACS Sustainable Chemistry Engineering**, v. 7, p. 412–420, 2019.
- 107 FAN, Q. G. *et al.* Characterization of cellulose aldehyde using fourier transform infrared spectroscopy. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 82, n. 5, p. 1195–1202, 2001.
- 108 KIM, U. J.; KUGA, S. Thermal decomposition of dialdehyde cellulose and its nitrogen-containing derivatives. **Thermochimica Acta**, v. 369, p. 79–85, 2001.
- 109 SHARMA, P. R.; VARMA, A. J. Thermal stability of cellulose and their nanoparticles: Effect of incremental increases in carboxyl and aldehyde groups. **Carbohydrate Polymers**, v. 114, p. 339–343, 2014.
- 110 SINGH, M. *et al.* Biodegradation studies on periodate oxidized cellulose. **Biomaterials**, v. 3(1), p. 16–20, 1982.
- 111 LI, J. *et al.* Preparation and characterization of 2,3-dialdehyde bacterial cellulose for potential biodegradable tissue engineering scaffolds. **Materials Science and Engineering C.**, v. 29, n. 5, p. 1635–42, 2009.
- 112 LUZ, E. P. C. G. *et al.* In vitro degradability and bioactivity of oxidized bacterial cellulose-hydroxyapatite composites. **Carbohydrate Polymers**, v. 237, p. 116174, 2020.

- 113 YUE, L. *et al.* Sulfonated bacterial cellulose/polyaniline composite membrane for use as gel polymer electrolyte. **Composites Science and Technology**, v. 145, n. 6, p. 122–131, 2017.
- 114 CHO, H. *et al.* Energy efficiency of heterogeneous catalytic microwave-assisted organic reactions. **Green Chemistry**, v. 16, n. 7, p. 3623–3634, 2014.
- 115 RATHI, A. K. *et al.* Microwave-assisted synthesis: Catalytic applications in aqueous media. **Coordination Chemistry Review**, v. 291, p. 68–94, 2015.
- 116 GE, H.-C.; LUO, D.-K. Preparation of carboxymethyl chitosan in aqueous solution under microwave irradiation. **Carbohydrate Research**, v. 340, n. 7, p. 1351–1356, 2005.
- 117 LUKASIEWICZ, M. *et al.* Environmental friendly polysaccharide modification – microwave-assisted oxidation of starch. **Starch**, v. 63, p. 268–273, 2011.
- 118 BAYRAK, G. K. *et al.* Microwave-induced biomimetic approach for hydroxyapatite coatings of chitosan scaffolds. **Carbohydrate Polymers**, v. 157, p. 803–813, 2017.
- 119 SINGH, V. *et al.* Microwave enhanced synthesis of chitosan-graft-polyacrylamide. **Polymer**, v. 47, n. 1, p. 254–260, 2006.
- 120 AKIN, A.; ISIKLAN, N. Microwave assisted synthesis and characterization of sodium alginate-graft-poly(N,N'-dimethylacrylamide). **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 82, p. 530–540, 2016.
- 121 EL-NEMR, A. *et al.* Testing zinc chloride as a new catalyst for direct synthesis of cellulose di- and tri- acetate in a solvent free system under microwave irradiation. **Carbohydrate Polymers**, v. 151, p. 1058–1067, 2016.
- 122 LI, J. *et al.* Microwave-assisted solvent-free acetylation of cellulose with acetic anhydride in the presence of iodine as a catalyst. **Molecules**, v. 14, n. 9, p. 3551–3566, 2009.
- 123 RAGAB, S.; EL-NEMR, A. Nanofiber cellulose di- and tri-acetate using ferric chloride as a catalyst promoting highly efficient synthesis under microwave irradiation. **Journal of Macromolecular Science, Part A**, v. 55, n. 2, p. 124–134, 2017.
- 124 MISSION, E. G. *et al.* Synergizing graphene oxide with microwave irradiation for efficient cellulose depolymerization into glucose. **Green Chemistry**, v. 19, n. 16, p. 3831–3843, 2017.
- 125 DOS SANTOS, D. M. *et al.* Microwave-assisted carboxymethylation of cellulose extracted from brewer's spent grain. **Carbohydrate Polymers**, v. 131, p. 125–133, 2015.
- 126 LIN, F. *et al.* Microwave-assisted facile synthesis of tempo-oxidized cellulose beads with high adsorption capacity for organic dyes. **Cellulose**, v. 24, p. 5025–5040, 2017.
- 127 DACHAVARAM, S. S. *et al.* A facile microwave assisted TEMPO/NaOCl/Oxone (KHSO₅) mediated micron cellulose oxidation procedure: Preparation of two nano TEMPO-cellulose forms. **Starch**, v. 72, n. 1, p. 1900213, 2020.
- 128 LU, Q. *et al.* High-yield synthesis of functionalized cellulose nanocrystals for nano-biocomposites. **Applied Nanomaterials**, v. 2, p. 2036–2043, 2019.
- 129 MOHAMMADI, A. M. S. *et al.* Oxidation of phenol from synthetic wastewater by a novel advance oxidation process: Microwave-assisted periodate. **Journal of Scientific and Industrial Research**, v. 75, p. 267–272, 2016.

- 130 SILLER, M. *et al.* Effects of periodate oxidation on cellulose polymorphs. **Cellulose**, v. 22, n. 4, p. 2245–2261, 2015.
- 131 SATGÉ, C. *et al.* Rapid homogeneous esterification of cellulose induced by microwave irradiation. **Carbohydrate Polymers**, v. 49, n. 3, p. 373–376, 2002.
- 132 MAEKAWA, E.; KOSHIJIMA, T. Properties of 2,3-dicarboxy cellulose combined with various metallic ions. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 29, n. 7, p. 2289–2297, 1984.
- 133 AGUSTIN, M. B. *et al.* The thermal stability of nanocellulose and its acetates with different degree of polymerization. **Cellulose**, v. 23, n. 1, p. 451–464, 2016.
- 134 SHAO, W. *et al.* Novel bioactive surface functionalization of bacterial cellulose membrane. **Carbohydrate Polymers**, v. 178, p. 270–276, 2017.
- 135 TOPALOVIC, T. *et al.* XPS and contact angle study of cotton surface oxidation by catalytic bleaching. **Colloids and Surfaces A**, v. 296, n. 1, p. 76–85, 2007.
- 136 MATUANA, L. M. *et al.* Surface characterization of esterified cellulosic fibers by XPS and FTIR spectroscopy. **Wood Science and Technology**, v. 35, n. 3, p. 191–201, 2001.
- 137 FRAS, L. *et al.* Analysis of the oxidation of cellulose fibres by titration and XPS. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 260, p. 101–108, 2005.
- 138 MILLER, D. J. *et al.* Interactions of CO₂ and CO at fractional atmosphere pressures with iron and iron oxide surfaces: one possible mechanism for surface contamination? **Surface and Interface Analysis**, v. 33, p. 299–305, 2002.