



Universidade do Minho
Escola de Engenharia

Margarida Peixoto Pinheiro

**Extração de nanocelulose a partir de
resíduos têxteis industriais:
exploração do seu uso em
nanocompósitos avançados**



Universidade do Minho

Escola de Engenharia

Margarida Peixoto Pinheiro

**Extração de nanocelulose a partir de
resíduos têxteis industriais: exploração do
seu uso em nanocompósitos avançados**

Dissertação de Mestrado

Mestrado em Engenharia Biomédica

Ramo de Especialização em Biomateriais, Reabilitação e
Biomecânica

Trabalho efetuado sob a orientação de

Doutora Diana Sara Pereira Ferreira

**Professor Doutor Raul Manuel Esteves Sousa
Fangueiro**

DIREITOS DE AUTOR E CONDIÇÕES DE UTILIZAÇÃO POR TERCEIROS

Este é um trabalho académico que pode ser utilizado por terceiros desde que respeitadas as regras e boas práticas internacionalmente aceites, no que concerne aos direitos de autor e direitos conexos.

Assim, o presente trabalho pode ser utilizado nos termos previstos na licença abaixo indicada.

Caso o utilizador necessite de permissão para poder fazer um uso do trabalho em condições não previstas no licenciamento indicado, deverá contactar o autor, através do RepositóriUM da Universidade do Minho.

Licença concedida aos utilizadores deste trabalho



Atribuição-NãoComercial-SemDerivações

CC BY-NC-ND

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

AGRADECIMENTOS

Com o terminar desta dissertação, chega ao fim a etapa mais desafiante do meu percurso académico e, por isso, não posso deixar de agradecer a todos aqueles que de alguma forma marcaram esta caminhada e fizeram com que fosse possível a sua concretização. Este foi, sem dúvida, um ano de muito trabalho e esforço, mas também um ano de crescimento pessoal e profissional.

Antes de mais quero agradecer aos meus orientadores, ao Professor Raul Figueiro por disponibilizar todas as condições para que fosse possível a realização desta dissertação e, claro, à Doutora Diana Ferreira pela orientação, disponibilidade e por ter guiado sempre este trabalho com rigor.

Quero agradecer, também, a todas as pessoas do 2C2T e da Fibrenamics que, de alguma forma, marcaram este percurso e ajudaram a concretizá-lo, sempre com um sentimento de entreatuda e disponibilidade. Em particular, à Marta, à Sofia e à Joana quero agradecer por todo o apoio, mesmo além das suas responsabilidades, pela disponibilidade, simpatia e partilha de conhecimento.

Aos meus coleguinhas de mestrado, em especial ao Pedro e à Bárbara, por estarem “sempre aqui”, pelos desabafos, companheirismo e por toda a ajuda. Tornaram este ano menos monótono e mais divertido, obrigada pela risota sem fim e por todas as conversas.

Às minhas espanholitas, à Ana e à Vale, obrigada pela amizade nestes anos, por estarem sempre comigo nesta luta. Não tenho palavras para descrever o vosso apoio, são o melhor que a universidade me ofereceu e fico muito agradecida por vos poder levar para a vida! Sem esquecer todos os outros amigos que apareceram ao longo deste percurso e me proporcionaram as melhores memórias.

À minha amiga de sempre, que me tem apoiado em todas as fases da vida e que me compreende como ninguém. Di, obrigada pelos cafés, pelas idas ao mercado, pelas mensagens, obrigada por seres a minha melhor amiga de sempre e para sempre! Obrigada, também aos meus amigos do coração, por nunca deixarem de aparecer nos momentos importantes.

Ao Rodrigo, por toda a paciência, por toda a choradeira que aturou, pelo apoio em todos os momentos e por me incentivar a nunca desistir. Foste o meu pilar nestes meses, obrigada pela compreensão, pela sensibilidade, pelo carinho e pela constante motivação que me ajudou a superar todos os obstáculos e a querer ser sempre melhor.

Por fim, mas nunca menos importante, à minha família, em especial aos meus pais e à minha irmãzinha, por me conhecerem como ninguém e tornarem tudo isto possível. É por vocês e pelo vosso apoio incondicional, que completo mais uma etapa. Obrigada por tudo!

DECLARAÇÃO DE INTEGRIDADE

Declaro ter atuado com integridade na elaboração do presente trabalho académico e confirmo que não recorri à prática de plágio nem a qualquer forma de utilização indevida ou falsificação de informações ou resultados em nenhuma das etapas conducentes à sua elaboração. Mais declaro que conheço e que respeitei o Código de Conduta Ética da Universidade do Minho.

RESUMO

Atualmente, a indústria têxtil é um dos setores económicos mais rentáveis, mas também um dos responsáveis pela maior geração de resíduos, sendo que parte significativa destes acaba por ser incinerado ou depositado em aterros. Assim, devido à sua considerável contribuição para a intensificação da poluição ambiental, juntamente com a já reconhecida escassez de recursos petrolíferos, torna-se essencial encontrar novas formas de reutilização destes resíduos têxteis. Uma metodologia recente para o seu reaproveitamento é a extração de materiais celulósicos, nomeadamente celulose nanocristalina (CNC) e nanofibrilada (CNF). A CNC e a CNF, devido às suas propriedades excecionais de capacidade de retenção de água, biocompatibilidade, biodegradabilidade, excelentes propriedades mecânicas e grande área de superfície têm demonstrado grande aplicabilidade, nomeadamente na área biomédica.

Desta forma, o presente projeto de dissertação visa desenvolver e otimizar diferentes métodos de extração de nanocelulose (NC) a partir de resíduos fornecidos por uma indústria têxtil, utilizando as metodologias já existentes e também processos alternativos com menor impacto ambiental. Com o conceito de economia circular em mente e com a necessidade crescente de novos produtos têxteis de alto valor acrescentado, pretende-se não só extrair NC, mas utilizá-la em nanocompósitos poliméricos com propriedades benéficas para a utilização na prevenção e tratamento de diversas patologias da pele. Assim, diferentes estratégias de extração foram utilizadas incluindo extração mecânica e hidrólise ácida (utilizando ácido sulfúrico, maleico e cítrico). Um processo de hidrólise otimizado foi alcançado com a redução da concentração de ácido sulfúrico de 64 %(m/m) para 55 %(m/m). A NC extraída foi devidamente caracterizada por microscopia ótica, STEM, ATR-FTIR, XRD e TGA. Posteriormente, tendo em vista a aplicação da NC extraída, várias percentagens foram incorporadas em filmes de quitosano e estes caracterizados por ATR-FTIR, TGA e ensaios de tração uniaxial. A adição de NC nos filmes de quitosano permitiu uma ligeira melhoria das suas propriedades térmicas e mecânicas. Por último, realizou-se a incorporação do extrato natural de folhas de *Ziziphus*, conhecido pelas suas propriedades antimicrobianas. O seu perfil de libertação foi traçado através de espectroscopia UV-vis e a sua atividade antibacteriana analisada. Uma libertação contínua do extrato foi verificada pelo menos por 5 h e a sua capacidade bactericida comprovada. Desta forma, o desenvolvimento deste trabalho demonstrou que é possível extrair NC a partir de resíduos têxteis, utilizando processos um pouco mais sustentáveis, e que poderá ser possível a sua aplicação como reforço em nanocompósitos facilmente funcionalizáveis.

Palavras-chave: Extratos naturais, Hidrólise ácida, Nanocelulose, Nanocompósitos, Resíduos têxteis.

ABSTRACT

Nowadays, the textile industry is one of the most important economic sectors, but also one of those responsible for the largest generation of waste, being that a significant part ends up being incinerated or landfilled. Therefore, due to its significant contribution to the intensification of environmental problems, along with the already recognized scarcity of petroleum resources, the use of this type of waste has been appointed as an urgent need. A recent methodology for their reutilization is the extraction of nanocellulosic materials, such as nanocrystalline cellulose (NCC) and nanofibrillated cellulose (NFC). NCC and NFC, due to their exceptional properties of water retention capacity, biocompatibility, biodegradability, excellent mechanical properties, and large surface area, have shown great applicability in different areas, including in the biomedical field.

Therefore, the present dissertation project aims to develop and optimize different methods for extracting nanocellulose (NC) from waste provided by the textile industry, using existing methodologies, but also alternative processes with less environmental impact. With the concept of circular economy in mind and with the growing need for new textile products with high value-added, it is intended not only to extract NC but to apply it in polymeric nanocomposite films with beneficial properties to be used in the prevention and treatment of several skin pathologies. Therefore, different extraction strategies were used, including mechanical extraction and acid hydrolysis (using sulfuric acid, maleic acid, and citric acid). An optimized hydrolysis process was achieved by reducing sulfuric acid concentration from 64 wv% to 55 wv%. The extracted NC was properly characterized by optical microscopy, STEM, ATR-FTIR, XRD, and TGA. Subsequently, various percentages of the extracted NC were incorporated into chitosan-based films and these films were characterized by ATR-FTIR, TGA, and uniaxial tensile tests. The incorporation of NC in chitosan films allowed a slight improvement in their thermal and mechanical properties. Finally, the incorporation of the natural extract of *Ziziphus* leaves, known for its antimicrobial properties, was performed. Its release profile was traced by UV-vis spectroscopy and its antibacterial activity was analysed. A continuous release of the natural extract was verified for at least 5 h and its bactericidal capacity was proved. In this way, the development of this work demonstrated that it is possible to extract NC from textile waste, using slightly more sustainable processes and that it may be possible to apply it as reinforcement in nanocomposites.

Keywords: Natural extracts, Acid hydrolysis, Nanocellulose, Nanocomposite films, Textile wastes.

ÍNDICE

Direitos de Autor e Condições de Utilização por Terceiros.....	v
Agradecimentos.....	vi
Declaração de Integridade	vii
Resumo.....	viii
Abstract.....	ix
Lista de Abreviaturas, Siglas e Acrónimos	xiii
Lista de Figuras.....	xv
Lista de Tabelas	xvii
1. Introdução	1
1.1 Motivação.....	1
1.2 Objetivos	3
1.3 Estrutura da dissertação	4
2. Estado da Arte	6
2.1 Celulose e Nanocelulose	6
2.2 Importância do uso de resíduos têxteis como fonte de NC	9
2.3 Processos de extração de NC a partir de resíduos têxteis.....	10
2.3.1 Pré-tratamentos.....	12
2.3.2 Métodos de extração	15
2.3.3 Métodos de extração de NC a partir de resíduos têxteis.....	19
2.4 Utilização da NC na produção de filmes nanocompósitos para o tratamento local de patologias da pele.....	23
2.4.1 Filmes nanocompósitos.....	24
2.4.2 Matrizes poliméricas.....	25
2.4.3 Filmes de quitosano reforçados com NC.....	26

2.4.4	Incorporação de extratos naturais em filmes nanocompósitos	27
3.	Materiais e Métodos.....	30
3.1	Materiais	30
3.2	Métodos	31
3.2.1	Pré-tratamentos.....	31
3.2.2	Hidrólise com ácidos sólidos.....	32
3.2.3	Método combinado.....	32
3.2.4	Hidrólise com ácido sulfúrico.....	33
3.2.5	Incorporação da NC em filmes de quitosano	35
3.2.6	Incorporação do extrato natural nos filmes nanocompósitos	36
3.3	Métodos de Caracterização	37
3.3.1	Microscópio ótico	37
3.3.2	Microscopia Eletrônica de Transmissão por Varrimento – STEM.....	37
3.3.3	Reflexão Total Atenuada - Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier – ATR-FTIR	38
3.3.4	Difração de Raios-X – XRD.....	38
3.3.5	Análise Termogravimétrica – TGA	39
3.3.6	Espectroscopia do Estado Fundamental por Refletância Difusa – GSDR.....	39
3.4	Avaliação das propriedades dos filmes nanocompósitos	39
3.4.1	Ensaio mecânicos – Testes de tração uniaxial	39
3.4.2	Atividade antibacteriana.....	40
3.4.3	Ensaio de liberação do princípio ativo.....	41
4.	Resultados e Discussão	42
4.1	Caracterização da amostra original e estudo de pré-tratamentos.....	42
4.2	Hidrólise utilizando ácidos sólidos	43

4.3	Método combinado	45
4.4	Extração de NC através de hidrólise com H ₂ SO ₄ e caracterização.....	46
4.4.1	Processo de otimização da hidrólise com H ₂ SO ₄	46
4.4.2	ATR-FTIR	50
4.4.3	XRD	50
4.4.4	TGA.....	52
4.5	Utilização da NC extraída para produção de filmes e caracterização	53
4.5.1	Produção e otimização de filmes de quitosano reforçados com a NC extraída.....	53
4.5.2	ATR-FTIR	53
4.5.3	TGA.....	55
4.5.4	Ensaio mecânico.....	56
4.6	Incorporação do extrato natural nos filmes nanocompósitos	58
4.6.1	ATR-FTIR	58
4.6.2	GSDR.....	60
4.6.3	Atividade antibacteriana do extrato natural	61
4.6.4	Ensaio de liberação do princípio ativo.....	62
5.	Conclusão	65
6.	Trabalhos Futuros.....	67
	Referências	68

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E ACRÓNIMOS

APS – Persulfato de amónio

ATR – Refletância Total Atenuada

CFU – Unidade formadora de colónias

C₄H₄O₄ – Ácido maleico

C₆H₈O₇ – Ácido cítrico

CNC – Celulose nanocristalina

CNF – Celulose nanofibrilada

DMSO – Dimetilsulfóxido

E.coli – *Escherichia coli*

FTIR – Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier

GSDR – Espectroscopia do Estado Fundamental por Refletância Difusa

HCl – Ácido clorídrico

H₂O₂ – Peróxido de hidrogénio

HPH – Homogeneização de Alta Pressão

H₃PO₄ – Ácido fosfórico

H₂SO₄ – Ácido sulfúrico

L. monocytogenes – *Listeria monocytogenes*

MBC – Concentração Bactericida Mínima

MHB – *Mueller Hinton Broth*

MIC – Concentração Mínima Inibitória

NaBr – Brometo de sódio

NaClO – Hipoclorito de sódio

NaOH – Hidróxido de sódio

NC – Nanoceluloses

NCB – Nanocelulose bacteriana

nm – nanómetros

NP – Nanopartícula

PBS – *Phosphate buffered saline*

PEG – Poli(etileno glicol)

PLA – Ácido Polilático

S. aureus – *Staphylococcus aureus*

S. typhimurium – *Salmonella typhimurium*

STEM – Microscópio Eletrônico de Varredura por Transmissão

TEMPO – 2,2,6,6-tetramethylpiperidineoxyl

TGA – Análise Termogravimétrica

TSB – *Tryptic Soy Broth*

UV-Vis – Espectroscopia Ultravioleta-Visível

XRD – Difração de Raios-X

µm – micrómetros

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: A) Imagem TEM de celulose nanofibrilada (CNF), B) imagem SEM de celulose nanocristalina (CNC) e C) imagem SEM de nanocelulose bacteriana (NCB). Imagem retirada da referência [27].	7
Figura 2: Representação esquemática do processo de extração de NC de diferentes biomassas. Imagens TEM da NC extraída por abordagem química (a), biológica (b), mecânica (c) e combinada (d). Imagem adaptada da referência [1].	15
Figura 3: Procedimento convencional para a extração de NC usando a abordagem de hidrólise ácida.	18
Figura 4: Esquema do processo de extração de CNC a partir de resíduos têxteis. Imagem adaptada da referência [10].	20
Figura 5: Amostra têxtil utilizada para extrair a NC A) no seu estado original, B) cortada e C) moída.	30
Figura 6: Montagem utilizada para o estudo da hidrólise utilizando ácido maleico.	32
Figura 7: Montagem utilizada para a execução da hidrólise ácida.	33
Figura 8: Processo de lavagem da solução hidrolisada: A) centrifugação a 4200 rpm por 10 min, B) descarte do sobrenadante e C) lavagem do <i>pellet</i> com água destilada.	34
Figura 9: A) Membranas de diálise em água destilada e B) pH medido com papel indicador no interior das membranas de diálise.	35
Figura 10: Imagens obtidas por microscopia ótica do sobrenadante pós-diálise. Da esquerda para a direita: 20x (100 µm), 10x (200 µm).	35
Figura 11: Extrato natural de folhas de <i>Ziziphus</i> dissolvido em DMSO.	36
Figura 12: Espectros de ATR-FTIR, da amostra original, da amostra submetida ao tratamento de branqueamento e alcalino e da amostra submetida apenas ao tratamento alcalino.	42
Figura 13: Resultados do processo de hidrólise da amostra utilizando A) 90 %(m/v) de $C_4H_6O_4$, a 50 °C e B) 80 %(m/v) de $C_6H_8O_7$, a 90 °C, após 24h.	44
Figura 14: Resultado da aplicação do método combinado, após 24h.	45
Figura 15: A) Mudança de cor da solução resultante do teste A após hidrólise. B) Imagem obtida por microscopia ótica da mesma amostra com ampliação de 20x (100 µm).	47
Figura 16: Imagens obtidas por microscopia ótica das amostras A) C ₁ B) C ₂ C) C ₃ e obtidas por STEM das amostras D) C ₁ E) C ₂ F) C ₃ . Utilizando ampliações de 40x (50 µm), 20x (100 µm), 100 000x (1 µm) e 50 000x (2 µm).	48

Figura 17: Imagens obtidas por STEM da amostra otimizada com ampliações de A) 50 000x (2 µm) e B) 25 000x (4 µm) e os respectivos histogramas da distribuição de tamanhos das NC obtidas, com a respetiva média (M) e moda (MD).	49
Figura 18: Espectro de ATR-FTIR da amostra têxtil original e da NC extraída.	50
Figura 19: Padrão de difração de XRD do pó da NC extraída.....	51
Figura 20: Curvas de A) TGA e B) derivada de primeira ordem das curvas de TGA (DTG) da NC extraída.	52
Figura 21: Filmes de quitosano/10% NC A) otimizado, B) sem homogeneização e C) sem adição de glicerol.	53
Figura 22: Espectros de ATR-FTIR: A) pó de NC extraída e filmes de quitosano/NC (0, 5, 10 e 25%) e B) espectros sobrepostos dos mesmos filmes.....	54
Figura 23: Curvas A) TGA e B) derivada de primeira ordem das curvas de TGA (DTG) dos filmes de quitosano/NC (0, 5, 10 e 25%).	55
Figura 24: Tensão Máxima (MPa), Deformação à Ruptura (%) e Módulo de Young (MPa), obtidos para os filmes de quitosano incorporando diferentes concentrações de NC extraída (0, 5, 10 e 25%).	57
Figura 25: Espectros de ATR-FTIR: A) do extrato natural de folhas de <i>Ziziphus</i> e dos filmes quitosano com extrato (0, 1, 3 e 5 mg/mL) e B) espectros sobrepostos dos mesmos.	59
Figura 26: Espectro GSDR do filme de quitosano não funcionalizado e dos filmes funcionalizados com extrato natural de folhas de <i>Ziziphus</i> em diferentes concentrações (1, 3 e 5 mg/mL).	60
Figura 27: Filmes de quitosano sem extrato (esquerda) e funcionalizado com extrato (direita).	61
Figura 28: Placa de poços para determinação da MIC, após 24 h.....	61
Figura 29: Placas plaquedadas com as diferentes concentrações de extrato de folhas de <i>Ziziphus</i> A) 0,625 mg/mL, B) 0,75 mg/mL, C) 1,25 mg/mL e D) 1,5 mg/mL.	62
Figura 30: Espectro UV-Vis das bandas de absorção características do extrato natural de folhas de <i>Ziziphus</i>	63
Figura 31: Espectros UV-vis do perfil de libertação do extrato <i>Ziziphus</i> presente nos filmes de A) quitosano e B) quitosano/25% NC.....	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Pré-tratamentos de fibras e tecidos têxteis.	14
Tabela 2: Métodos de extração de NC a partir de fibras e tecidos têxteis.	22
Tabela 3: Parâmetros utilizados na realização da hidrólise com ácidos sólidos.	43
Tabela 4: Parâmetros utilizados na realização do método combinado.....	45
Tabela 5: Parâmetros utilizados na realização da hidrólise com ácido sulfúrico.....	46

1. INTRODUÇÃO

1.1 Motivação

Atualmente, com a crescente consciencialização ambiental, há um maior interesse pelo desenvolvimento de materiais verdes e sustentáveis, bem como pelo estudo de formas eficientes de reutilizar e recuperar vários resíduos para a produção de novos produtos de alto valor acrescentado, com baixo impacto ambiental [1].

A indústria têxtil é apontada, globalmente, como sendo um dos setores mais poluentes, não só devido à grande quantidade de resíduos produzidos e à sua eliminação em aterros e incineradores, mas também devido ao cultivo e fabrico de fibras e tecidos, que envolve o consumo de excessivas quantidades de água, pesticidas, fertilizantes e energia [2]. Estima-se que, por ano, se produzam 13 milhões de toneladas de resíduos têxteis em todo mundo. Estes incluem não só excedentes de fábrica, provenientes de processos industriais como o corte e a fição, mas também vestuário e têxteis domésticos que acabam por ser descartados [3]. De acordo com os dados apresentados num relatório oficial da Comissão Europeia em 2021, das 5,8 milhões de toneladas de têxteis que os consumidores da União Europeia descartam todos os anos, apenas um quarto é reciclado [4]. Segundo a associação *Friends of the Earth Europe*, as restantes 4,3 milhões de toneladas são totalmente descartadas em aterros [5]. A nível mundial, a realidade é análoga com 75% dos resíduos têxteis a serem depositados em aterros, enquanto apenas 25% são reciclados ou reutilizados [6,7]. Com a crescente preocupação com o consumo excessivo de água e energia, e a alarmante escassez de recursos naturais, é essencial encontrar um caminho mais sustentável para estes resíduos têxteis [2]. A degradação anaeróbica de algodão nos aterros e as grandes quantidades de dióxido de carbono produzidas durante o processo de incineração, tornam a reciclagem destes resíduos ainda mais urgente. Adicionalmente, os corantes e as tintas presentes nos têxteis são reconhecidamente difíceis de se decompor biologicamente. Estes são libertados no solo aquando da deposição dos têxteis em aterros, contaminando-o, e contribuindo ainda mais para a amplificação de problemas graves de foro ambiental [8,9].

Uma grande maioria dos resíduos têxteis são constituídos por algodão, uma vez que cerca de 24% do mercado têxtil se dedica a esta fibra [10]. No entanto, para o reaproveitamento destes resíduos de algodão, a reciclagem por trituração e a sua reutilização possuem limitações, sendo aplicadas apenas quando possível [11]. Novas estratégias de reciclagem têxtil, pós-consumo, têm surgido quer em âmbito académico como industrial, mas há ainda grandes desafios a ultrapassar que dificultam muito esta

reciclagem. Estes desafios incluem, principalmente, a presença de misturas de fibras, pigmentos e de contaminantes [10,12]. Relativamente à reciclagem de resíduos têxteis provenientes das várias fases de produção, são ainda escassos os estudos publicados [13–15]. Todavia, estes resíduos, provenientes quer das diferentes fases de produção, quer pós-consumo, possuem um enorme potencial que se deve ao seu elevado conteúdo em celulose (superior a 90%) [3]. Aliás, após os tratamentos exigidos no ciclo de produção têxtil, como lavagens específicas com bases e detergentes (o chamado *scouring*) e branqueamentos, este teor de celulose pode, geralmente, atingir os 99% [8].

Portanto, uma forma de ultrapassar os desafios da atual gestão de resíduos, passa por encontrar outras alternativas viáveis para a reutilização e exploração dos resíduos têxteis ricos em celulose. A extração de materiais nanocelulósicos, tais como a celulose nanocristalina (CNC) e celulose nanofibrilada (CNF) a partir destes resíduos, apresenta-se como uma alternativa efetiva e bastante promissora, promovendo a circularidade económica, uma vez que, acrescenta muito valor a este tipo de resíduos [15,16]. A nanocelulose, sendo um biopolímero com extração relativamente simples e características extraordinárias tem captado uma grande atenção para aplicações biomédicas, nomeadamente em formulações passíveis de serem aplicadas no tratamento de patologias de pele [17]. As propriedades excecionais da nanocelulose provêm da combinação de importantes propriedades da celulose: biocompatibilidade, biodegradabilidade, hidrofiliabilidade, estabilidade térmica, excelentes propriedades mecânicas e baixa densidade, com as características específicas conferidas pelo nanoescala como a maior área de superfície [9,18]. A sua excepcional capacidade de retenção de água e grande área superficial têm sido associadas a uma maior adesão e proliferação celular, aumentando a sua aplicabilidade no campo biomédico [19,20]. Nos últimos anos, a nanocelulose tem, também, recebido muita atenção pelo seu potencial de aumentar a performance dos materiais, nomeadamente na capacidade de reforço de filmes poliméricos ao melhorar a sua performance mecânica [7].

Adicionalmente, o uso de extratos naturais bioativos pode adicionar novas propriedades bioativas aos filmes poliméricos reforçados com nanocelulose, ultrapassando algumas desvantagens reconhecidas do uso excessivo de antibióticos e nanopartículas, como a resistência bacteriana e a citotoxicidade. Assim, é possível originar sistemas capazes de entregar localmente agentes antimicrobianos e anti-inflamatórios, excelentes para proteger a pele de ataques microbianos externos, prevenir o aparecimento de infeções e tratar patologias da pele [21].

Neste sentido, a extração de nanocelulose a partir de resíduos têxteis torna-se essencial para um futuro mais sustentável e com menor impacto ambiental. A sua utilização em aplicações de alto valor

acrescentado, contribui para a circularidade económica e para a sustentabilidade económica e ambiental.

1.2 Objetivos

O objetivo principal deste trabalho é reaproveitar e reciclar resíduos têxteis industriais, recolhidos de uma empresa no fim do processo produtivo, sem utilidade final específica. Desta forma, o foco central desta dissertação é a extração de nanocelulose, CNC, CNF ou ambas, a partir desses resíduos e incorporá-la em filmes nanocompósitos, posteriormente, funcionalizados com um agente bioativo, o extrato natural de folhas de *Ziziphus*. Os filmes poliméricos, ao incorporarem este extrato natural têm como objetivo tornarem-se mais eficazes na prevenção ou tratamento de patologias da pele, permitindo dar uma nova vida ao resíduo celulósico, contribuindo, assim, para a economia circular e para a redução do impacto ambiental da indústria têxtil.

Para atingir o objetivo delineado, tornou-se necessário adotar estratégias de trabalho, que passaram pelo/a:

- 1) Estudo da possível necessidade de se aplicar pré-tratamentos na amostra de resíduos têxteis industriais adquiridos, de forma a aumentar o rendimento de extração de nanocelulose.
- 2) Exploração de metodologias ambientalmente mais sustentáveis no processo de extração da nanocelulose, nomeadamente o uso de ácidos sólidos, de possível recuperação, ou pela aplicação de métodos combinados de forma a aumentar a eficácia dos ácidos.
- 3) Otimização do método convencional de extração (64 %(m/m) de ácido sulfúrico a cerca de 55 °C) com o objetivo de diminuir a concentração de ácido, temperatura ou tempo de reação, a fim de tornar o método mais sustentável, tendo sempre em consideração os rendimentos de extração.
- 4) Caracterização das nanoceluloses extraídas recorrendo a várias técnicas, tais como, Microscopia Ótica, Microscopia Eletrónica de Varrimento (SEM), Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier acoplada a um acessório de Reflexão Total Atenuada (ATR-FTIR), Análise Termogravimétrica (TGA) e Difração de Raios-X (XRD).
- 5) Incorporação das nanoceluloses obtidas em filmes nanocompósitos poliméricos, neste caso numa matriz de quitosano, em diferentes percentagens (5, 10 e 25 %(m/m)).
- 6) Avaliação das propriedades dos filmes de quitosano com as diferentes concentrações de nanocelulose extraída através de ATR-FTIR, TGA e ensaios mecânicos, a fim de se analisar qual destas quantidades responderia melhor às exigências requeridas pela aplicação final.

- 7) Modificação dos filmes nanocompósitos produzidos com extrato natural de folhas de *Ziziphus* e posterior caracterização por ATR-FTIR e Espectroscopia do Estado Fundamental por Refletância Difusa (GSDR) para avaliar a sua presença na matriz de quitosano, análise da capacidade antibacteriana do extrato e avaliação do seu perfil de libertação a partir do filme polimérico.

Desta forma, o objetivo final pode ser atingido, obtendo um nanocompósito de base natural, reforçado com nanocelulose extraída a partir de resíduos têxteis celulósicos, com propriedades adequadas para prevenção e tratamento local de patologias da pele.

1.3 Estrutura da dissertação

A presente dissertação foi estruturada em 5 secções: a secção 1 engloba uma breve introdução ao tema em estudo, onde se explica os motivos e o objetivo que levaram à sua escolha; a secção 2 abrange o estado da arte, incluindo uma revisão da literatura relativa aos conceitos, métodos de extração da nanocelulose, bem como uma análise da literatura sobre filmes nanocompósitos reforçados com nanocelulose para possível aplicação na prevenção e tratamento de patologias da pele; a secção 3 inclui todos os materiais e métodos utilizados no desenvolvimento desta dissertação; a secção 4 apresenta o conjunto de resultados obtidos, bem como a discussão dos mesmos; e a secção 5 inclui as conclusões gerais da investigação desenvolvida, apresentando também algumas propostas de trabalhos futuros para se alcançar um conhecimento mais completo sobre o nanocompósito desenvolvido.

Na secção 1, foi realizado um enquadramento do tema e são apresentadas as principais e mais relevantes motivações que estiveram na origem da escolha do tópico, assim como os principais objetivos do trabalho proposto e as estratégias adotadas para alcançar os mesmos. Este capítulo apresenta ainda a organização estrutural da dissertação, com uma breve descrição dos conteúdos de cada uma das secções.

A secção 2 contempla uma revisão bibliográfica aprofundada tendo em conta: 1) a definição minuciosa de cada uma das nanoceluloses; 2) os métodos de extração de nanocelulose explorados até ao momento, enfatizando os estudos que relatam a extração de nanocelulose a partir de resíduos têxteis pré e pós-consumo; 3) filmes nanocompósitos reforçados com nanocelulose já desenvolvidos, modificados com extratos naturais com potencial para prevenção e tratamento de problemas da pele.

Na secção 3, encontram-se apresentados os materiais e métodos que estão na base da execução experimental desta dissertação. Neste capítulo são também descritas as diversas técnicas utilizadas para a caracterização da nanocelulose extraída, bem como dos filmes poliméricos desenvolvidos.

Na secção 4, são apresentados e discutidos os resultados obtidos nas diferentes etapas da atividade experimental. As diferentes etapas de otimização da extração de nanocelulose e formação de filmes nanocompósitos estão descritas, bem como os resultados das análises de caracterização efetuadas na nanocelulose extraída, nos filmes poliméricos reforçados com essa nanocelulose e nos filmes incorporando quer a nanocelulose quer o extrato natural.

Por fim, na secção 5, encontram-se resumidas as conclusões mais relevantes do trabalho e são propostas algumas perspectivas de trabalho futuras tendo em conta a aplicação final de atuar como implante de entrega localizada de agentes bioativos na pele.

2. ESTADO DA ARTE

Como foi referido anteriormente, nesta secção será apresentado os diferentes tipos de nanocelulose (NC), serão descritas as suas diferenças, principais características e as suas possíveis aplicações. Uma revisão bibliográfica relativamente aos métodos de extração de NC a partir de fontes celulósicas será também apresentada. Esta revisão incluirá as várias abordagens de extração da NC, enfatizará os métodos de extração mais comumente aplicados nos têxteis e serão, também, descritas as principais limitações de cada método. Possíveis alternativas a estes métodos convencionais serão também abordadas. Por último, serão apresentados e explorados alguns filmes nanocompósitos já desenvolvidos, que integram NC como material de reforço e extratos naturais, com o objetivo de conferir ao filme propriedades relevantes para prevenir e mesmo tratar localmente diferentes patologias da pele.

2.1 Celulose e Nanocelulose

A celulose é considerada o polímero orgânico mais abundante na Terra, estando amplamente distribuída por uma variedade de fontes. A principal fonte natural de celulose é a biomassa lignocelulósica, particularmente a madeira (40 - 50%). Esta também pode ser isolada de fibras vegetais como o algodão (87 - 90%), linho (70 - 80%) e rami (70 - 75%) e ser produzida a partir de bactérias, algas, fungos e alguns animais (os tunicados) [22–24]. Além disso, novas fontes como resíduos agrícolas e industriais têm vindo a ser exploradas para extrair celulose com propriedades semelhantes à extraída a partir da polpa de madeira (atualmente a fonte convencional), mas com menor impacto ambiental [25].

A celulose é um polissacarídeo linear de alto peso molecular composto por unidades de glucose organizadas sob a forma de anéis com 6 átomos de carbono, designados por piranoses. Estes anéis encontram-se ligados por ligações glicosídicas, dando-se ao conjunto de duas unidades estruturais adjacentes a designação de celobiose [26]. Considera-se um biopolímero semicristalino por apresentar segmentos altamente organizados, as zonas cristalinas, e regiões com arranjo irregular, as zonas amorfas [27]. A região cristalina, com elevada organização molecular, promove uma elevada rigidez e resistência à celulose. Por outro lado, a parte amorfa proporciona flexibilidade ao material [28].

Nos últimos anos, o aumento de interesse pela nanotecnologia elevou a nanocelulose (NC) a um dos materiais renováveis mais atrativos para aplicações biomédicas. A NC é um importante derivado da celulose, com pelo menos uma dimensão na escala nanométrica (< 100 nm) [1]. É um material biodegradável, biocompatível, com baixa densidade, elevada área superficial e boas propriedades

mecânicas e de barreira. Além disso, a sua transparência e fácil funcionalização, devido aos grupos hidroxilos na sua superfície, tornam a NC um excelente material para ser utilizado em aplicações biomédicas, como por exemplo, membranas para hemodiálise, enxertos vasculares, sistemas de administração de medicamentos e pensos para feridas [19,29,30].

Com base nos métodos de preparação, os materiais nanocelulósicos podem ser categorizados em três tipos principais: (1) celulose nanocristalina (CNC), também designada por nanocristais de celulose (NCC) ou *nanowhiskers* de celulose (NWC); (2) nanofibras de celulose (NFC), também conhecida por celulose nanofibrilada (CNF); e (3) celulose bacteriana (CB) ou, também designada, nanocelulose bacteriana (NCB), com mostra a Figura 1 [31,32]. Embora estes três tipos de NC tenham composições químicas análogas, exibem características físicas diferentes, como tamanho das partículas, morfologia e cristalinidade. Por conseguinte, o método de extração, as condições de processamento e a fonte de celulose determinam a sua estrutura, dimensões e propriedades [33,34].

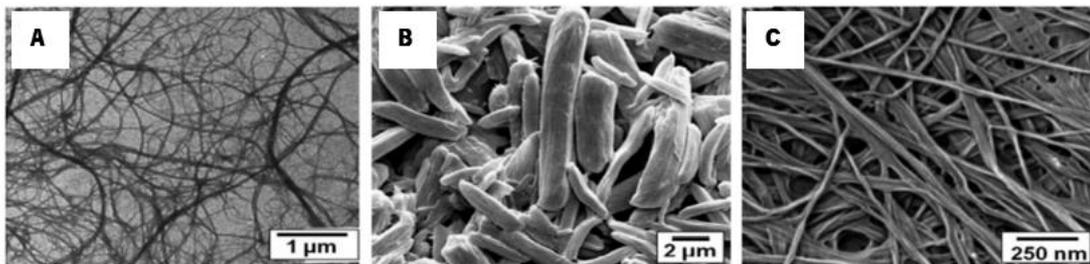


Figura 1: **A)** Imagem TEM de celulose nanofibrilada (CNF), **B)** imagem SEM de celulose nanocristalina (CNC) e **C)** imagem SEM de nanocelulose bacteriana (NCB). Imagem retirada da referência [27].

A principal distinção entre a CNC e a CNF reside na sua dimensão e estrutura cristalina. Enquanto a CNC tem o comprimento e o diâmetro na nanoescala, a CNF tem comprimentos na microescala e diâmetros na nanoescala. A CNC tem uma morfologia em nanocristal, com um formato fino e alongado, similar a agulhas, com comprimentos entre 100 e 500 nm e diâmetros de poucos nanómetros, indicados como inferiores a 10 nm por uns autores [35,36] e inferiores a 30 nm por outros [37,38]. Por outro lado, a CNF consiste em nanofibras de celulose longas e emaranhadas com comprimentos de alguns micrómetros e com diâmetros que podem variar entre os 3 e os 50 nm [37,39]. Quanto à cristalinidade, a CNC é composta, predominantemente, por celulose cristalina pura, apresentando uma cristalinidade entre 60 e 90% [40]. Quando utilizada como reforço em filmes nanocompósitos, a alta cristalinidade da CNC melhora as propriedades mecânicas e térmicas dos filmes

[41]. Já a CNF contém regiões cristalinas e regiões amorfas, com cristalinidade entre 40 e 70%, em que os domínios amorfos proporcionam um certo grau de flexibilidade [40].

Os métodos utilizados para a sua extração e o material de origem têm um impacto na estrutura cristalina da CNC e da CNF. A CNC tem sido produzida, principalmente, por tratamentos químicos, geralmente por hidrólise ácida, em que as zonas cristalinas da celulose são isoladas e preservadas, enquanto as amorfas são removidas. Esta possui propriedades desejáveis, como grande área de superfície, alta resistência à tração, rigidez e excelente estabilidade coloidal [42]. Por outro lado, a produção de CNF ocorre geralmente através de desintegração mecânica. Estes métodos mecânicos promovem a ruptura da parede celular e a subsequente exposição das fibrilas e microfibrilas, que estavam anteriormente localizadas no interior das fibras celulósicas, resultando em partículas com regiões cristalinas e amorfas [43].

Em comparação com os outros tipos de nanocelulose, a NCB tem características únicas nomeadamente propriedades de excelente pureza (adquirida pela ausência de outros componentes amorfos como a lignina, hemicelulose ou pectina) e alta capacidade de retenção de água. Normalmente, o seu comprimento encontra-se de 100 a 1000 nm e o seu diâmetro entre 20 e 100 nm, com uma cristalinidade de 50 a 60% [44]. Enquanto a CNC e a CNF são preparadas por um processo *top-down*, baseado na desintegração das fibras de celulose, a NCB é produzida por um processo *bottom-up* em que nanofibras são produzidas por bactérias, a partir de açúcares de baixo peso molecular [23].

A NCB é um polímero linear e altamente cristalino de glucose, sintetizado principalmente por espécies Gram-negativas dos géneros *Komagataeibacter*, *Acetobacter*, *Rhizobium*, *Agrobacterium*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Alcaligenes*, e apenas um género bacteriano Gram-positivo, *Sarcina* [45,46]. As diferenças na morfologia, estrutura, propriedades e rendimentos estão associadas às diferentes bactérias utilizadas na sua produção [47]. Contudo, a sua produção em grande escala está ainda em desenvolvimento devido ao elevado custo de manutenção do crescimento das bactérias [48]. Além disso, há necessidade de utilizar reatores avançados, sistemas de monitorização rigorosos e meios de cultura complexos para aprimorar a produção de NCB [49]. Outra dificuldade reside no baixo rendimento da produção de NCB. Para superar esta dificuldade, são necessárias melhores estirpes, isoladas da natureza ou modificadas por técnicas de engenharia genética [50]. Assim, a atual produção de NCB está ainda confinada a unidades de produção de pequena escala [45].

Todos os materiais nanocelulósicos apresentam inúmeras potencialidades para aplicações biomédicas devido às excelentes propriedades que lhe são características, principalmente, a sua

dimensão nanométrica e biocompatibilidade, no entanto, apenas a CNC e a CNF serão o foco deste estudo por serem as possíveis de extrair a partir de resíduos têxteis.

2.2 Importância do uso de resíduos têxteis como fonte de NC

Os têxteis fazem parte da nossa vida cotidiana, podendo ser categorizados como têxteis industriais, têxteis médicos, agro-têxteis, geotêxteis, têxteis decorativos, vestuário, vestuário de proteção, entre outros [51]. Contudo, como já mencionado, graves problemas ambientais estão associados à sua produção e eliminação [6,52]. Este setor industrial é responsável por mais de 10% do total de emissões de carbono, tendo sido identificado como um dos maiores contribuidores para as emissões de carbono e gases com efeito de estufa [53]. A quantidade de energia e água consumida é colossal devido aos processos de pré-tratamento, branqueamento, tingimento, lavagem e processos de acabamento necessários na sua produção em grande escala [54]. Além disso, os corantes, químicos e detergentes utilizados durante estes procedimentos são responsáveis por cerca de 20% da poluição da água potável à escala mundial [52].

Nas últimas décadas, o consumo global de têxteis aumentou consideravelmente com a criação do vestuário barato e acessível, conhecido como "*fast fashion*" e, conseqüentemente, a produção em massa de materiais têxteis aumentou de forma abrupta [55]. Nos últimos 20 anos, a produção global de fibras têxteis quase duplicou, passando de 58 milhões de toneladas, em 2000, para 109 milhões de toneladas, em 2020, estimando-se ainda que aumente mais de 30% nos próximos 10 anos [7]. Como consequência desta tendência, a quantidade de resíduos de roupas tem aumentado. Números de 2020 apontam que cerca de 75% destes resíduos acaba em aterros, apenas 25% é reciclado ou reutilizado e menos de 1% é reciclado novamente em vestuário [6,53].

A reutilização e reciclagem dos têxteis poderia reduzir o impacto ambiental da indústria. A reciclagem mecânica e a reciclagem química têm se apresentado como as duas estratégias de reciclagem têxtil mais comumente usadas [11]. A reciclagem mecânica é ainda a mais utilizada. Esta degrada os materiais têxteis através do corte e trituração, puxando o tecido em fios e fibras, para depois reconstituir em fio reciclado para voltar a ser utilizado em aplicações têxteis [11]. Por outro lado, a reciclagem química envolve processos como a despolimerização (no caso do poliéster, fibra têxtil mais usada) e a dissolução (no caso do algodão e viscose) para se obter novas fibras virgens [53,56]. Atualmente, existem já bons exemplos de algumas empresas e iniciativas focadas na reciclagem têxtil. São exemplos disso, a empresa sueca Renewcell, que produz, a partir de roupas de algodão em fim de

uso, uma nova matéria biodegradável chamada circulose; a Circc que transforma têxteis de misturas de poliéster e algodão nos blocos de construção da matéria-prima; a Recover™ que produz fibras recicladas sustentáveis a partir de resíduos têxteis pós e pré-consumo; e a sul-africana Rewoven, que utiliza métodos de reciclagem mecânica para produzir tecidos a partir de 60% dos resíduos têxteis pré-consumo (excedentes de fábrica, por exemplo) e 40% de resíduos plásticos [10,57]. No entanto, as tecnologias de reciclagem ainda enfrentam alguns desafios. Por exemplo, a reciclagem mecânica pode deformar e deteriorar as fibras causando perda de qualidade e é, também, ineficiente quando se trata de misturas de tecidos [11,56]. A presença de produtos químicos persistentes nos tecidos é outro desafio associado à reciclagem que dificulta, significativamente, este processo [12]. Para superar estes desafios, o desenvolvimento de estratégias e tecnologias eficientes de reciclagem de resíduos têxteis é uma procura emergente e necessária. Esta procura tem sido impulsionada pela cada vez mais exigida responsabilidade pela sustentabilidade ambiental, contrariando a prática atual de eliminação e deposição de resíduos têxteis em aterros e incineradores [52].

As fibras de algodão são apontadas como tendo a maior taxa de consumo, após o poliéster, com uma produção global a rondar os 24% [7,58]. Estes têxteis à base de algodão contêm um teor celulósico superior a 90%, podendo atingir os 99% no final do ciclo produtivo, sendo que a extração de NC pode ser uma solução promissora de reciclagem. Assim, torna possível superar os atuais desafios de gestão de resíduos, reduzir a carga de resíduos depositada em aterros, minimizar a poluição ambiental e utilizar os recursos residuais de forma sustentável [8]. Estes têxteis mostram-se também como uma alternativa promissora às fontes tradicionais de celulose, como a polpa de madeira branqueada e outras biomassas lignocelulósicas. Estas fontes tradicionais, além de conterem um menor teor de celulose e possuírem componentes amorfos como hemicelulose e lignina com necessidade de remoção, têm sido cada vez mais associadas à deflorestação e à ocorrência de catástrofes naturais devido ao seu uso excessivo [3]. Desta forma, a extração de NC a partir dos resíduos têxteis apresenta-se como uma alternativa altamente promissora.

2.3 Processos de extração de NC a partir de resíduos têxteis

Com o desenvolvimento da nanotecnologia, em resposta às exigências de novos e melhores produtos de base natural, a extração e exploração de NC tem se tornado uma área de investigação muito atrativa e em expansão [59]. Até à data, como referido, materiais de fibras de alta qualidade como a madeira (especialmente da pasta de madeira kraft branqueada) têm sido a principal fonte de NC, no

entanto, na última década, com a desflorestação e os problemas de gestão de resíduos, novas fontes alternativas têm sido exploradas, nomeadamente subprodutos e resíduos celulósicos agrícolas, florestais e industriais [1,8]. A gestão sustentável destes resíduos tornou-se uma das principais preocupações deste século. Com o objetivo de reduzir a poluição ambiental e promover a circularidade económica, os resíduos têxteis, altamente disponíveis a um custo reduzido, têm se mostrado como matérias-primas viáveis para a extração de NC [60,61].

De todas as fibras têxteis, as fibras de algodão contêm a maior percentagem de celulose. O teor de celulose em fibras de algodão cru representa cerca de 94%, o que com os processos de rotina a que são submetidas na indústria têxtil, pode chegar aos 99%, transformando o algodão na forma mais pura de celulose na natureza [10]. Pelo contrário, a madeira, fonte tradicional, contém apenas entre 40 e 50% de celulose [3].

Vários estudos sobre o isolamento de CNC e CNF de diferentes resíduos têxteis têm sido realizados [8,9,62,63]. Os resíduos têxteis pré-consumo (fibras, lascas de fios, restos de tecidos de cortes de fábrica e peças de vestuário novas), dependendo da fase de que resultaram, podem conter hemicelulose, lignina, gorduras, pó e outros componentes não conhecidos [15,63]. Também os tecidos de algodão pós-consumo (roupa usada e descartada) contêm múltiplos produtos químicos não mencionados nas suas etiquetas. Além disso, durante o seu ciclo de vida foram expostos a uma variedade de produtos químicos e tensões mecânicas e, normalmente, são produtos de misturas com outras fibras [12]. Estes fatores podem afetar as propriedades e dificultar o processo de extração da NC. Em muitos estudos, a coloração tem sido reconhecida como outra desvantagem e, portanto, a presença de corantes químicos e pigmentos na roupa pode exigir processos de branqueamento como uma etapa de pré-tratamento para purificar as fibras [64,65]. Além disso, a roupa e os tecidos em fim de cadeia têm muitos mais aditivos do que apenas o corante, sendo que um único procedimento pode não ser suficiente para a remoção de todos estes aditivos [66,67].

Dado que a qualidade e a pureza dos produtos afetam fortemente o seu valor comercial e o seu campo de aplicação, diferentes pré-tratamentos têm sido utilizados antes do procedimento de extração, à semelhança do que acontece com a biomassa lignocelulósica. Portanto, a produção de NC é geralmente um processo de duas etapas. Primeiramente, os componentes não celulósicos da matéria-prima são removidos pelo pré-tratamento para o isolamento das fibras de celulose e, depois disso, a NC é extraída das fibrilas de celulose por vários métodos de extração. Ambas as etapas afetam a morfologia, a cristalinidade e a estabilidade térmica da NC obtida, propriedades que são relevantes para a sua posterior aplicação em produtos de alto valor acrescentado [42].

2.3.1 Pré-tratamentos

Tradicionalmente, os pré-tratamentos são realizados com o objetivo principal de remover hemicelulose, lignina e outros conteúdos amorfos que envolvem a celulose, promover a acessibilidade, aumentar a superfície interna, alterar a cristalinidade e romper as ligações de hidrogénio da celulose e, conseqüentemente, aumentar a reatividade das fibras. Por conseguinte, diminuem a necessidade energética e facilitam o processo de produção de NC, aumentando os rendimentos de extração [68].

Abordagens físicas, biológicas e químicas têm sido empregues sendo que a escolha depende da fonte e das características desejadas para proceder à etapa posterior [69]. As abordagens físicas visam fragmentar a biomassa, aumentando a superfície de contacto, com a redução do tamanho do material, através de trituração e moagem. Embora não tenham a capacidade de remover lignina ou hemicelulose, quebram as longas cadeias moleculares facilitando os tratamentos seguintes [69,70]. Os pré-tratamentos biológicos utilizam microrganismos (fungos e enzimas) para transformar a biomassa em compostos mais reativos, geralmente, à hidrólise subsequente [69]. Este tipo de pré-tratamento não utiliza altas temperaturas e é menos prejudicial para o ambiente, uma vez que, não necessita da adição de produtos químicos. No entanto, os longos tempos de tratamento, os baixos rendimentos e o custo são ainda desafios a superar [71]. Finalmente, os pré-tratamentos químicos utilizam reagentes em condições controladas e têm a capacidade de remover os componentes amorfos da celulose. Destaca-se a carboximetilação, o tratamento alcalino e processos de branqueamento como os mais citados na literatura [69].

Embora os pré-tratamentos químicos exijam a utilização de alguns agentes químicos tóxicos, continuam a ser a abordagem mais eficiente e menos dispendiosa e, por conseguinte, a mais utilizada para tratar não só a biomassa lignocelulósica, mas também as fibras têxteis. O tratamento alcalino e o branqueamento são os dois métodos mais utilizados no pré-tratamento de resíduos têxteis, como sumariado na Tabela 1. O tratamento alcalino consiste em utilizar uma solução alcalina, geralmente de hidróxido de sódio (NaOH), que vai solubilizar a hemicelulose e despolimerizar, parcialmente, a lignina. A par desta função, o NaOH é também, frequentemente, utilizado como agente de inchamento de fibras (*swelling agent*), que promove um maior rendimento destes processos [72]. Por sua vez, o branqueamento implica o uso de agentes oxidantes para solubilizar e remover os derivados de lignina e hemicelulose remanescentes, tornando a fibra mais suscetível aos tratamentos posteriores. Clorito de sódio (NaClO₂), hipoclorito de cálcio (CaClO₂), ou uma mistura de hidróxido de sódio (NaOH) e peróxido de hidrogénio (H₂O₂) podem ser utilizados para realizar este branqueamento. Nos têxteis o branqueamento é normalmente aplicado como tratamento descolorante [72]. Normalmente estes dois

métodos químicos aparecem combinados e processam-se de forma semelhante. Fatores como a concentração da solução, proporção fibra/solução, tempo de exposição e temperatura têm elevada influência no produto final obtido [15,73].

Contudo, a necessidade de pré-tratamentos é perspctivada como uma desvantagem, uma vez que estes representam mais de 40% do custo total de processamento e podem afetar negativamente o processo de extração através da geração de resíduos tóxicos perigosos [74]. De forma a ultrapassar estes aspetos menos positivos, há já alguns estudos na literatura que não aplicam qualquer pré-tratamento aos resíduos têxteis, antes da extração da NC, o que é visto como uma vantagem sobre a biomassa lignocelulósica. Como exemplo, T. Zhong *et al.* isolaram CNC de tecidos de ganga tingidos de índigo e demonstraram que a presença desse corante, que persistia no produto final, não tinha qualquer efeito sobre o rendimento, morfologia, tamanho, carga superficial, cristalinidade e propriedades térmicas da CNC obtida [8]. Também Ruiz-Caldas *et al.*, utilizaram tecidos tingidos com diferentes corantes e diferentes composições, tais como algodão, algodão/poliéster e algodão/acrílico, para extrair CNC. Estes realizaram a hidrólise com ácido sulfúrico, sem qualquer pré-tratamento prévio, mostrando que nem as misturas de fibras, nem o tipo de corante aplicado influenciaram o rendimento, as propriedades térmicas, óticas e coloidais da CNC obtida [10].

Apesar destas novas estratégias mais sustentáveis não aplicarem quaisquer pré-tratamentos, há ainda vários estudos na literatura que os aplicam. Na tabela 1 encontra-se sumariado alguns desses estudos.

Tabela 1: Pré-tratamentos de fibras e tecidos têxteis.

Fonte	Pré-tratamento	Produtos químicos/ Equipamento	Condições de tratamento	Resultado	Ref
Resíduos industriais de algodão	Tratamento alcalino + branqueamento	NaOH H ₂ O ₂	(1) Tratamento alcalino: 5% (m/v) NaOH durante 1 h a 70 °C; (2) Branqueamento: solução de 1:1 de 24% (v/v) H ₂ O ₂ e 4% (m/v) NaOH durante 1 h a 50 °C.	Percentagem de remoção lignina: 80,04% Percentagem remoção hemicelulose: 89,8% Superfície irregular Quebra das fibras Descoloração	[15]
Roupa de algodão descartada	Tratamento alcalino + branqueamento	NaOH H ₂ O ₂	(1) Tratamento alcalino: 10% (m/m) NaOH por 2 h a 70 °C; (2) Branqueamento: 1,5% (m/m) H ₂ O ₂ .	Superfície irregular, fissurada e inchada Fibrilas de celulose expostas Cor removida	[3]
Roupa de algodão descartada (recolhida de um aterro)	Tratamento alcalino + Branqueamento	NaOH H ₂ O ₂	(1) Tratamento alcalino: 10% (m/m) NaOH a 80 °C por 3h; (2) Branqueamento: 6% (m/m) H ₂ O ₂ .	Cor e lignina removidas Superfície inchada e irregular Fibrilas de celulose expostas	[75]
Tecido de algodão descartado	Moagem + tratamento alcalino+ branqueamento	NaOH H ₂ O ₂ Estabilizador Detergente	(1) Tratamento mecânico: moagem (2) Tratamento alcalino: 5% (m/v) de NaOH a 80 °C; (2) Branqueamento: 3 mL/L de H ₂ O ₂ , 2 mL/L de NaOH, 1mL/L de estabilizador e 1mL/L de detergente.	Polpa descolorada	[76]
Lençóis de algodão estampados	Trituração+ tratamento alcalino+ branqueamento	Liquidificador (JYL-C91T, Joyoung) NaOH H ₂ O ₂	(1) Lavagem; (2) Trituração (22000 rpm); (3) Tratamento alcalino: 15% (m/m) NaOH a 70 °C por 2h; (4) Branqueamento: 1,5% (m/m) H ₂ O ₂ a 70 °C por 1h.	Polpa descolorada	[16]
Tecido de algodão branqueado e tecido de ganga tingido de índigo	Moagem	Moinho rotativo <i>Contra-Selector</i> (Pallman)		Redução do tamanho das fibras	[8]

Abreviaturas - NaOH: Hidróxido de sódio; H₂O₂: Peróxido de hidrogénio.

2.3.2 Métodos de extração

Várias tecnologias têm sido relatadas na literatura para extração de NC a partir de diversos materiais celulósicos. Dependendo do tipo de NC desejada, a fonte e a aplicação final, rotas mecânicas, biológicas e químicas podem ser aplicadas. Também uma quarta metodologia tem vindo a ser explorada, um método combinado entre os anteriores, por forma a colmatar os defeitos das abordagens anteriores quando realizadas isoladamente [1]. Estes processos de extração encontram-se esquematizados na Figura 2.

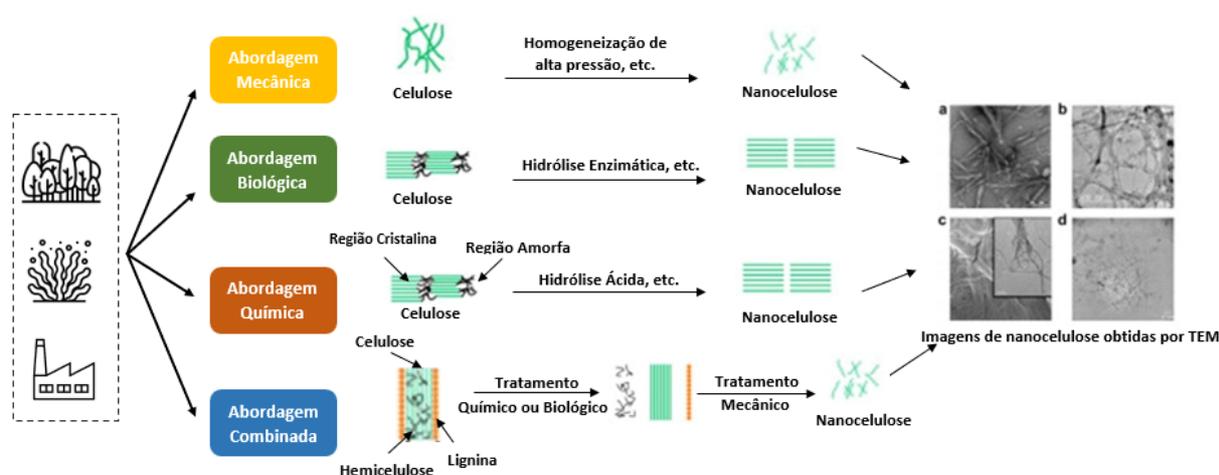


Figura 2: Representação esquemática do processo de extração de NC de diferentes biomassas. Imagens TEM da NC extraída por abordagem química (a), biológica (b), mecânica (c) e combinada (d). Imagem adaptada da referência [1].

Consoante o processo utilizado, a NC extraída possuirá diferentes características, nomeadamente cristalinidade, morfologia e dimensões [1]. Como referido anteriormente, a CNC é usualmente produzida por tratamentos químicos com ácidos inorgânicos concentrados, principalmente ácido sulfúrico (H_2SO_4). Para além da hidrólise química, outros métodos têm sido relatados como a hidrólise enzimática, tratamentos com líquidos iónicos e processos de oxidação. Por outro lado, a produção de CNF ocorre geralmente por desintegração mecânica, resultando em partículas com regiões cristalinas e amorfas. Além dos métodos mecânicos, tratamentos químicos, particularmente a oxidação mediada por TEMPO (2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl radical), e a hidrólise enzimática têm sido aplicadas [77,78].

É de se salientar que, além do tipo de NC obtida, também em termos de rendimento, custos, necessidade energética e impacto ambiental se diferenciam estes métodos de extração [1].

Métodos mecânicos

Os métodos mecânicos têm como principal função a quebra de ligações de hidrogênio entre fibras de celulose, através de uma força de cisalhamento. As abordagens mecânicas mais citadas na literatura para diminuir as fibras celulósicas incluem homogeneização de alta pressão (HPH), moagem e ultrassom de alta intensidade [68].

A exigência de alto consumo de energia é o principal inconveniente para a produção de nanofibras de celulose através dos processos mecânicos [33,79]. Além disso, os materiais e equipamentos usados nos métodos mecânicos são caros, têm menor eficácia e consomem mais energia que os métodos químicos [80]. Deste modo, a pureza dos materiais obtidos será menor e a sua implementação à escala industrial será mais dispendiosa. Normalmente, estas abordagens não são empregues isoladamente, sendo combinadas com pré-tratamentos, químicos ou enzimáticos, ou como auxílio a outro método de extração, reduzindo-se o consumo energético e tornando o processo mais eficiente [68,80].

Contudo, há já estudos que demonstraram a possibilidade de se extrair NC aplicando exclusivamente estes métodos mecânicos, como o estudo desenvolvido por Wu *et al.* que isolaram, com sucesso, NC a partir de okara, resíduo resultante da produção de soja, utilizando apenas métodos mecânicos como a ultra-sonicação e HPH. De todos os tratamentos, a produção de NC usando sonicação a 600 W por 15 min levou ao menor diâmetro de partícula, cerca de 0,22 μm [81]. Também, Ferreira *et al.* utilizaram um método combinado entre a moagem de bolas e a ultra-sonicação de alta intensidade para isolar NC a partir de biomassa de eucalipto. Desta forma conseguiram ultrapassar os desafios apontados à moagem mecânica, sem o uso de reagentes químicos. Pelas dimensões da NC obtida, concluíram que obtiveram CNF, cujas nanofibras possuíam um diâmetro médio de 25 nm e um comprimento de 3 μm [82].

Métodos biológicos

A hidrólise enzimática é um tipo de tratamento biológico que inclui enzimas para digestão ou modificação da fibra de celulose para se obter NC. O mecanismo é complexo, no entanto, a ação da enzima baseia-se na catálise das pontes de hidrogênio entre microfibras de celulose [83]. A eficácia da hidrólise enzimática depende de vários parâmetros como a concentração enzimática, concentração de substrato, o tempo de reação e a adição ou não de surfactantes. Este processo tem como vantagens a segurança, baixa poluição, alta eficiência e baixo consumo de energia [84]. Além disso, os açúcares

presentes nos efluentes resultantes da extração de CNC podem ser reciclados e utilizados como matéria-prima para produzir bioetanol, por exemplo [85,86]. Contudo, não só de aspetos positivos está repleta esta abordagem, as principais desvantagens residem no alto custo das enzimas bem como na necessidade de um tempo de operação muito superior ao dos restantes métodos. Enquanto, a hidrólise ácida tem uma duração na ordem dos minutos, o processo enzimático leva dias a realizar-se, perdendo a sua conveniência para ser aplicada à escala industrial [87].

Métodos químicos

Entre os vários métodos utilizados para a extração de NC, o método químico de hidrólise ácida, aplicando ácidos líquidos fortes inorgânicos, é o mais acessível e eficaz. Atualmente, a hidrólise ácida é o método mais aplicado industrialmente, devido à sua eficácia, baixo custo e permitir que a reação ocorra a temperaturas moderadas num curto período de tempo [26,83]. Várias variáveis estão envolvidas na eficiência deste processo. A matéria-prima celulósica influencia o tipo e a concentração do reagente escolhido. Além disso, também a temperatura e o tempo de hidrólise são aspetos a ter em consideração. Estes fatores podem determinar o tamanho dos nanocristais e o rendimento da CNC obtida [83].

Durante o processo de hidrólise, o ácido causa hidrólise das ligações glicosídicas das secções amorfas da celulose, enquanto as regiões cristalinas permanecem intactas devido à sua resistência superior ao ataque ácido [88,89]. As regiões amorfas são as primeiras a sofrerem o ataque do ácido pois são zonas de acesso mais facilitado, além de possuírem menor densidade e maior área de contato, em relação às regiões cristalinas [33]. Elevadas concentrações de ácido podem aumentar o grau de hidrólise da amostra tanto nas regiões amorfas quanto nas cristalinas. Deste modo, um rigoroso controlo entre a concentração de ácido utilizado e a duração do processo é necessário, no sentido de se evitar uma redução gradual do grau de cristalinidade e do tamanho dos cristalitos obtidos, afetando o rendimento da reação e a estabilidade térmica da NC obtida [18]. Assim, um procedimento típico para a produção de NC através de hidrólise ácida pressupõe as seguintes etapas: hidrólise ácida do material sob condições estritamente controladas de temperatura, tempo, agitação e com controle de outras condições, como natureza e concentração do ácido e a proporção ácido/celulose; diluição da solução hidrolisada com água destilada para interromper a reação; lavagens sucessivas, recorrendo, por exemplo, a centrifugações sucessivas para se atingir um pH neutro; diálise com água destilada para se remover moléculas de ácido livre e eliminar os possíveis iões sulfato; tratamento mecânico, geralmente sonicação, com o objetivo de dispersar os nanocristais e obter uma suspensão estável e uniforme e, por

fim, secagem da suspensão para se obter a NC em pó [15,90]. Este procedimento deve ser adaptado à matéria-prima em uso. Na Figura 3 encontra-se esquematizado o processo anteriormente descrito.



Figura 3: Procedimento convencional para a extração de NC usando a abordagem de hidrólise ácida.

Vários ácidos inorgânicos fortes, tais como ácido sulfúrico (H_2SO_4), ácido clorídrico (HCl) e ácido fosfórico (H_3PO_4), têm sido reconhecidos como eficazes para este fim, ao produzir nanoceluloses com diferentes morfologias e polimorfismos [78]. Deste grupo, o ácido sulfúrico tem sido o mais utilizado para extrair NC de várias fontes. A escolha do ácido sulfúrico deve-se essencialmente à sua eficácia e baixo custo. Este ácido forte permite que a reação ocorra a uma temperatura relativamente baixa e durante um curto período, conferindo às nanoestruturas resultantes uma alta estabilidade, em meio aquoso, devido à elevada carga superficial negativa gerada pelos íons sulfatos presentes nas superfícies dos cristalitos [26].

Todavia, na produção à escala industrial, algumas desvantagens têm sido atribuídas à utilização destes ácidos inorgânicos fortes, incluindo a corrosão de reatores e equipamentos, a necessidade de grandes quantidades de ácido e, conseqüentemente, de água necessária para eliminar a presença de moléculas ácidas residuais, levando à produção de grandes volumes de sais durante a neutralização. Também os grupos sulfato introduzidos na NC durante a hidrólise, aceleram a degradação da celulose, podendo resultar numa estabilidade térmica limitada. Isto tem implicações negativas no papel da NC em várias aplicações, como no reforço de nanocompósitos. Além disso, estes ácidos inorgânicos fortes são reconhecidos como insustentáveis do ponto de vista ambiental devido aos desafios associados à sua eliminação, recuperação, reciclagem e reutilização [75,88].

Por conseguinte, numa visão de sustentabilidade ambiental é necessário explorar novos métodos, com menos inconvenientes em termos de segurança e poluição. Alternativas a estes ácidos fortes têm vindo a ser exploradas. Ácidos sólidos orgânicos, como os ácidos maleico, oxálico e cítrico, são uma aposta ambientalmente mais limpa e sustentável [88,91]. Além de serem mais seguros de armazenar e manipular, terem baixo custo de transporte e serem menos corrosivos para os equipamentos, também podem ser facilmente recuperados e, possivelmente, reutilizados. Graças à baixa solubilidade em água, estes ácidos podem ser recuperados após a reação de hidrólise através de uma

simples recristalização a temperaturas mais baixas. Além disso, também possuem um pKa mais baixo o que previne a despolimerização descontrolada da NC, mais comum aquando da utilização de ácidos minerais fortes [88,92,93].

Por exemplo, Liu Y *et al.* utilizaram a hidrólise ácida com ácido fosfotúngstico (ácido sólido) concentrado para a preparação de CNC a partir de pasta de madeira branqueada. Com uma concentração de 75% de ácido, a 90 °C durante 30 h, obtiveram nanocristais com diâmetros de 15 a 40 nm. Apesar deste extenso tempo de reação, o ácido fosfotúngstico pôde ser prontamente recuperado e apresentou um desempenho consistente nas várias repetições da reação [83].

Contudo, a necessidade de altas temperaturas, um tempo de hidrólise superior, e concentrações de ácido mais elevadas e o baixo rendimento, uma vez que se trata de ácidos mais fracos, são algumas desvantagens [92]. A fim de superar estes inconvenientes, tem sido explorado um método combinado de hidrólise e outro método, normalmente mecânico, por ser uma opção mais verde e mais eficiente. Seta *et al.*, relatam um exemplo bem-sucedido da utilização de um pré-tratamento mecânico, seguido de hidrólise com ácido maleico. O método do moinho de bolas foi realizado nas fibras de polpa de bambu para aumentar o rendimento, obtendo um rendimento de 10,55% a 24,50% consoante o aumento do tempo de moagem. Este rendimento foi superior ao obtido apenas utilizando a hidrólise de ácido maleico (2,80%) [88].

Deste modo, tem-se que a extração de NC a partir de variadas fontes celulósicas tem vindo a sofrer alterações com o objetivo de a tornar mais sustentável e, assim, responder às diretrizes cada vez mais exigidas pela sociedade atual. Os ácidos sólidos e métodos mecânicos mostram-se como uma proposta promissora para a extração de NC, tendo já sido utilizados na biomassa lignocelulósica. Todavia, a utilização de ácido sulfúrico para realização da hidrólise ainda é o método mais eficaz e, por isso, o mais aplicado.

2.3.3 Métodos de extração de NC a partir de resíduos têxteis

Alguns estudos já relataram com sucesso a extração de NC a partir de resíduos têxteis, como sumariado na Tabela 2. À semelhança do que acontece com a biomassa lignocelulósica, o método mais aplicado para extrair NC a partir de resíduos têxteis, seja pré ou pós-consumo, tem sido a hidrólise ácida, utilizando ácido sulfúrico, em elevadas concentrações. As condições de hidrólise padrão relatadas na literatura são 64 %(m/m) de H₂SO₄ com temperaturas próximas de 55 °C por tempos variáveis na ordem dos 45 a 60 min [92,94]. Contudo, estes parâmetros devem ser estudados e adaptados consoante a matéria-prima em uso. Este é o método mais conveniente e eficaz, aliás, como já explorado, considera-

se o método mais viável economicamente e em termos de rendimento, permitindo que a reação ocorra a temperaturas moderadas num curto período.

Como representado na Figura 4, o ácido sulfúrico é eficaz para extrair CNC tanto de têxteis 100% algodão, como de resíduos têxteis com misturas de fibras, cuja parte sintética pode ser recuperada durante o processo de hidrólise ácida [10].

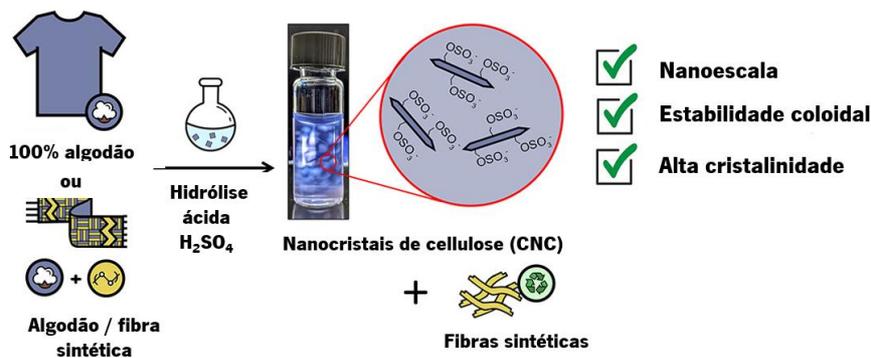


Figura 4: Esquema do processo de extração de CNC a partir de resíduos têxteis. Imagem adaptada da referência [10].

Nos últimos anos, devido aos problemas associados ao uso deste ácido forte, como já descritos no tópico anterior, um esforço crescente tem sido feito para usar outros ácidos de modo a reduzir a concentração ou substituir o ácido sulfúrico no processo de hidrólise. Desta forma, propostas como soluções de misturas de ácidos (H_2SO_4 e HCl, por exemplo) e ácido fosfórico, que é um ácido mineral mais fraco, têm sido exploradas nos resíduos têxteis como alternativas [3,95]. Outros métodos como a oxidação, métodos combinados e hidrólise enzimática têm sido reportados pela comunidade científica como métodos ambientalmente mais sustentáveis [8,13,96].

A Tabela 2 descreve os métodos de extração que têm vindo a ser utilizados para a extração de NC a partir de fibras têxteis e tecidos, as condições de processamento, incluindo as condições ideais de temperatura, concentrações de reagentes e tempo de processamento, os rendimentos de extração obtidos e, por último, as características dos nanomateriais obtidos.

Todavia, há ainda necessidade de explorar métodos mais ecológicos para a extração de NC a partir de resíduos têxteis com o objetivo de valorizar estes resíduos e produzir novos produtos sustentáveis. Algumas soluções já mencionadas, como ácidos sólidos orgânicos, métodos mecânicos e biológicos, são alternativas mais verdes já aplicadas na biomassa lignocelulósica e passíveis de ser exploradas nos têxteis. Por exemplo, Ling C *et al.* reciclaram resíduos têxteis constituídos por poliéster/algodão através de um processo verde onde utilizaram o ácido fosfotúngstico, um

heteropoliácido sólido, para realizar a hidrólise. Com um tempo de reação de 6 h e uma temperatura de 140 °C obtiveram um rendimento de 85,12% de celulose microcristalina [97]. De facto, este é um exemplo da possibilidade de utilizar ácidos sólidos para reciclar resíduos têxteis, no entanto, existe ainda um défice de estudos na literatura que inclua a extração de NC a partir de têxteis utilizando estes ácidos sólidos mais sustentáveis, evidenciando assim, uma oportunidade altamente promissora que carece de desenvolvimento.

Tabela 2: Métodos de extração de NC a partir de fibras e tecidos têxteis.

Tipo	Fonte	Método de extração	Condições de extração	Condições ótimas	Rendimento	Características da NC	Ref	
Combinado	Linter de algodão	Hidrólise com H ₂ SO ₄ + homogeneização	50, 55, 60 e 65 %(m/m) de H ₂ SO ₄ + homogeneização (9000, 10500 e 12000 rpm) durante 3, 5 e 7 min	60% H ₂ SO ₄ , 9000 rpm por 5 min	59–72%	Comprimento: 133 nm Largura: 10 nm Cristalinidade: 82%	[14]	
		Moagem + hidrólise com H ₂ SO ₄	(1) moagem num moinho <i>Wiley</i> (2) 60 %(m/m) H ₂ SO ₄ a 45 °C durante 60 min			Comprimento: 177 nm Largura: 12 nm Cristalinidade: 90,45%	[13]	
Biológico	Polpa de algodão	Hidrólise enzimática utilizando celulase	Solução de celulase (20 µ/ml) a 50 °C durante 5 a 11 h			Comprimento: 250-900 nm Largura: 30-45 nm Cristalinidade: 81,23%	[98]	
Químico	Resíduos industriais de algodão	Hidrólise com H ₂ SO ₄	50, 60 e 64 %(m/m) H ₂ SO ₄ com proporção de 1:20 (g/mL) durante 60 ou 75 min a 50 °C	60% H ₂ SO ₄ por 60 min a 50 °C	52,98-83,03%	Comprimento: 256-263 nm Largura: 16-19 nm Cristalinidade: 75-81%	[15]	
	Roupa de algodão descartada	Hidrólise com HCl/ H ₂ SO ₄	98 %(m/m) H ₂ SO ₄ e 37 %(m/m) HCl numa proporção 3:1:11 a 65 °C durante 5 h num banho de ultrassons (50 W)		55,76%	Comprimento: 28-470 nm Largura: 3-35 nm Cristalinidade: 55,76%	[3]	
	Tecidos 100% algodão, acrílico/algodão e poliéster/algodão	Hidrólise com H ₂ SO ₄	64 %(m/m) H ₂ SO ₄ com proporção de 1:10 (g/mL), a 50 °C			22-61%	Comprimento: 140-153 nm Largura: 11-13 nm Cristalinidade: 87-88%	[10]
	Tecido de ganga tingido com índigo		Hidrólise com H ₂ SO ₄	64 %(m/m) H ₂ SO ₄ a 45 °C por 1h		37,8%	Comprimento: 152,7 nm Largura: 12,5 nm Cristalinidade: 85,6%	[8]
			Oxidação mediada por TEMPO	(1) fibras inchadas em H ₂ O (2) TEMPO (0,064 g), NaBr (0,4 g) e NaClO (23 g) por 6,5 h (3) Etanol para parar a reação		78,9%	Comprimento: 162,3 nm Largura: 9,90 nm Cristalinidade: 66%	
	Resíduos industriais de ganga		Oxidação com APS	1, 1,5 e 2 M de APS a 60 °C durante 5-15 h	1,5 M APS durante 15 h a 60 °C	27,14%	Comprimento: 76,14 nm Largura: 18,10 nm Cristalinidade: 83%	[96]
Fibras de rami		Hidrólise com H ₃ PO ₄	H ₃ PO ₄ (85 %(v/v)) adicionado até à concentração de 14, 15, 16 e 17 M, a 150 °C por 60, 90 e 120 min	16 M H ₃ PO ₄ a 150 °C durante 90 min		Comprimento: 215,4 nm Largura: 21,4 nm Cristalinidade: 89,28%	[95]	

Abreviaturas - H₂SO₄: ácido sulfúrico; TEMPO: 2,2,6,6-tetramethylpiperidineoxyl; HCl: ácido clorídrico; APS: persulfato de amônio; H₃PO₄: ácido fosfórico; NaBr: brometo de sódio.

2.4 Utilização da NC na produção de filmes nanocompósitos para o tratamento local de patologias da pele

A pele é o maior órgão do corpo humano. Este órgão é responsável pela proteção física dos nossos órgãos internos, ajuda na regulação da temperatura corporal, proíbe a desidratação e oferece apoio aos nervos e vasos sanguíneos, desempenhando um importante papel na sensibilidade aos estímulos exteriores. Esta pode, também, exibir funções metabólicas e imunitárias [99]. A pele forma uma barreira externa que impede a entrada de corpos estranhos, como organismos patogénicos e químicos, e a perda extensa de fluidos corporais, devido a agressões ambientais [100]. Quando esta é danificada, as partes internas do corpo são expostas a infeções por microrganismos que causam inflamação, atrasando, significativamente, o processo de cicatrização da pele [101].

Nos últimos anos, vários estudos têm-se centrado no desenvolvimento e otimização de tratamentos para a regeneração da pele, através da síntese e modificação de materiais biocompatíveis e bioativos para acelerar a sua cicatrização [102]. O primeiro penso ativo para feridas foi caracterizado pela sua capacidade de manter um ambiente húmido, absorver fluidos, minimizar infeções e promover a cicatrização da pele [103]. Desde então, a tecnologia de pensos para a pele tem evoluído consideravelmente, explorando novos materiais, não tóxicos, biocompatíveis, biodegradáveis e de base natural, capazes de gerar um ambiente propício à cicatrização cutânea. Para isso estes devem: garantir a respirabilidade, permitindo trocas de oxigénio; assegurar um ambiente húmido equilibrado de modo a evitar a desidratação e morte celular; remover o excesso de exsudato; proteger contra a invasão de microrganismos; e adaptar-se à forma do traumatismo, sem aderir. Devem também possuir boas propriedades mecânicas como flexibilidade e boa resistência [31,104].

Assim, estes pensos ativos podem substituir os pensos convencionais que apenas funcionam como barreira física, cobrindo e protegendo a pele traumatizada do ambiente externo, mas sem promover o seu processo de cicatrização. Além disso, os pensos tradicionais têm a desvantagem de aderirem diretamente à pele, podendo causar nova lesão aquando da sua remoção, retardando a cicatrização ou até agravando a lesão pré-existente [38,105]. Consequentemente, o desenvolvimento de novos materiais com propriedades bioativas que promovam o processo de cicatrização da pele, e não apenas a sua proteção, são essenciais.

Os pensos de proteção ativa têm assumido uma variedade de formas, incluindo filmes, hidrogéis, membranas, espumas, e podem agir localmente, fornecendo agentes terapêuticos no local traumatizado, seja por ferimentos, queimaduras, feridas crónicas, úlceras ou outras doenças de pele [102,103,106].

2.4.1 Filmes nanocompósitos

Os nanocompósitos poliméricos fazem parte do grupo emergente de materiais compostos por uma matriz contínua de base polimérica e um material de reforço, designado por *filler*, que contém pelo menos uma dimensão na escala nanométrica, ou seja, até 100 nm [107].

Devido ao facto do *filler* possuir um tamanho nanométrico, o nanocompósito detém excelentes propriedades que não seriam alcançadas pelos compósitos à escala micro ou macro. O reforço à escala nano dos materiais poliméricos permite alcançar propriedades mecânicas e físicas melhoradas em comparação aos seus homólogos microscópicos, que requerem maior quantidade de *filler* para reforçar eficazmente a matriz polimérica [107,108]. Por conseguinte, algumas das propriedades do polímero da matriz, por exemplo, a densidade, permanecem inalteradas quando *fillers* à escala nanométrica são incorporados nos filmes. As propriedades dos nanocompósitos dependem de três fatores principais, tais como as características da matriz polimérica e do *filler*, a interação interfacial entre os mesmos e a dispersão do nanomaterial na matriz polimérica [108].

Vários métodos de produção de nanocompósitos poliméricos têm sido aplicados. Destes, destacam-se os métodos físicos de *solvent casting*, *melt mixing*, *spin coating* e *eletrospinning* e o método químico de polimerização *in situ* [108–110]. Entre as várias técnicas de produção de filmes, o método *solvent casting* destaca-se pela sua elevada simplicidade, versatilidade e possibilidade de ser utilizada a uma escala industrial, sendo uma técnica que tem sido amplamente utilizada [111]. Várias vantagens, tais como melhores propriedades físicas, processamento fácil e de baixo custo, excelente uniformidade de espessura e não haver limitações de materiais a utilizar, permitindo a utilização de diferentes polímeros naturais e sintéticos e a incorporação de substância ativas como extratos naturais [112], torna esta técnica a mais interessante para este projeto. O método *solvent casting* ou evaporação do solvente trata-se, então, de uma técnica em que o solvente de uma suspensão polimérica evapora sob condições definidas de humidade, temperatura e pressão, para se obter filmes finos poliméricos [113]. As propriedades reológicas da mistura polimérica devem ser tidas em conta, uma vez que afetam a taxa de secagem, a espessura e a uniformidade do filme. Após a secagem completa do filme, este pode ser cortado na forma e tamanho pretendidos, uma vez que para além do tipo de material utilizado, o design é um fator igualmente importante no mercado de dispositivos médicos para o tratamento de feridas e lesões na pele [111]. Deste modo, através desta técnica várias matrizes e agentes de reforço podem ser utilizados para formar filmes nanocompósitos com propriedades físico-químicas interessantes para serem utilizados como pensos para os mais diversos problemas na pele.

2.4.2 Matrizes poliméricas

Os filmes nanocompósitos têm sido preparados utilizando matrizes de polímeros não biodegradáveis, como polietileno (PE), polipropileno (PP) ou poliéster e de polímeros biodegradáveis, como o álcool polivinílico (PVA), amido, policaprolactona (PCL), ácido poli (lático-co-glicólico) (PLGA), polietileno glicol (PEG), ácido polilático (PLA) e quitosano [108]. Contudo, tendo em conta quer a aplicação final, quer a exigência que se coloca nos tempos atuais sobre a utilização de recursos sustentáveis, é de extrema importância que a matriz dos filmes nanocompósitos desenvolvidos sejam polímeros biodegradáveis, biocompatíveis e, preferencialmente, de origem natural [114].

Com a crescente consciencialização ambiental, o uso de materiais sustentáveis e o desenvolvimento de sistemas mais ecológicos tem sido cada vez mais exigido [115]. Nesse sentido, os polímeros biodegradáveis, cuja degradação resulta da ação de microrganismos, nomeadamente bactérias e fungos, são uma excelente opção para substituir os polímeros não biodegradáveis, e desta forma, reduzir o impacto ambiental [116].

Os polímeros biodegradáveis podem ser classificados de acordo com a sua origem em naturais ou sintéticos. Os polímeros biodegradáveis sintéticos são sintetizados através da polimerização química e apesar das suas excelentes propriedades mecânicas, estabilidade térmica e produção de relativo baixo custo, só começaram a ser explorados para aplicações biomédicas mais recentemente, devido à falta de biocompatibilidade, capacidade de mimetizar partes do corpo e à sua absorção e permeabilidade baixas [117]. Por outro lado, os polímeros biodegradáveis naturais, originados a partir de fontes naturais como plantas, animais ou microrganismos, apresentam várias vantagens como elevada abundância, versatilidade, elevada biocompatibilidade e baixa toxicidade, que os tornam materiais com elevadas potencialidades para aplicações biomédicas [116,118]. De facto, estes polímeros biodegradáveis, de origem natural com excelentes propriedades biológicas, têm sido empregues em diversos sistemas de tratamento de feridas e regeneração da pele [119–121].

Nos últimos anos, o quitosano tem surgido como um material extremamente atrativo para diversas aplicações devido às suas excelentes características [122]. Este advém da quitina, geralmente, por desacetilação em meio alcalino. A quitina é o segundo biopolímero mais abundante na natureza, e pode ser encontrada na carapaça de crustáceos, no exosqueleto dos insetos e na parede celular de fungos [123,124]. A quitina é uma matéria-prima de fácil extração e com elevadas potencialidades, contudo tem uma aplicação ainda reduzida, principalmente devido ao seu difícil tratamento e baixa solubilidade, resultantes da existência de fortes ligações por pontes de hidrogénio entre as cadeias poliméricas. Desta forma a sua conversão em quitosano representa uma mais-valia [125]. O quitosano,

além da sua origem natural, apresenta diversas propriedades interessantes, como biodegradabilidade, não toxicidade, biocompatibilidade, baixo custo e excelente capacidade de formação de filmes [126,127]. Este biomaterial caracteriza-se também como hemostático e possui propriedades biológicas interessantes como atividade antimicrobiana, anti-inflamatória e propriedades de aceleração do processo de cicatrização, tendo-se provado que é capaz de aumentar a permeabilidade paracelular para criar um ambiente húmido no leito de feridas, melhorando, assim, a penetração de compostos bioativos [124,126]. Existem também estudos que apontam a capacidade do quitosano para controlar a taxa de libertação de fármacos e compostos bioativos em sistemas de administração transdérmicos [102,128]. Adicionalmente, este polímero é muito abundante na natureza, com uma produção de baixo custo e ecologicamente interessante, sendo possível a sua obtenção a partir de resíduos marinhos [129], o que vai de encontro com o conceito de economia circular presente neste trabalho.

2.4.3 Filmes de quitosano reforçados com NC

Nos últimos anos, vários estudos têm sido efetuados para avaliar a possibilidade de incorporar agentes de reforço, à escala nanométrica, em sistemas poliméricos com o objetivo de compensar as fracas propriedades mecânicas intrínsecas de alguns polímeros [125]. A NC, tal como referido anteriormente, tem sido muito explorada como reforço de nanocompósitos devido às suas características como alta resistência mecânica, biodegradabilidade, biocompatibilidade e alta reatividade superficial, inerente da presença dos grupos hidroxilos livres que facilitam a funcionalização da sua superfície [16,109]. Por outro lado, o quitosano, sendo um polímero com uma enorme importância para a aplicação pretendida, apresenta algumas limitações como propriedades mecânicas e de barreira deficientes, baixa resistência à água e pouca capacidade de absorver fluidos corporais. De forma a ultrapassar estes inconvenientes, vários estudos relatam a incorporação de NC nos filmes à base de quitosano tem se mostrado como uma solução efetiva [130–136].

A título de exemplo, Costa *et al.* incorporaram CNC em diferentes concentrações (5, 10, 25 e 50 %(m/m)) em filmes de quitosano, o que resultou numa melhoria das propriedades térmicas, de barreira e mecânicas dos filmes, aliada ao efeito bactericida contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e à atividade fungicida contra *Candida albicans* proveniente do quitosano. Deste modo, destaca o grande potencial dos filmes de base natural com propriedades aprimoradas para serem aplicados como alternativas sustentáveis para embalagens ativas de conservação de alimentos [122]. Também, Dehnad *et al.* desenvolveram nanocompósitos quitosano/NC por *solvent casting* que resultaram numa melhoria das propriedades térmicas dos filmes de quitosano, continuando a oferecer um excelente efeito

inibitório sobre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas [137]. Por fim, *Wu et al.* prepararam nanocompósitos de quitosano reforçados com CNF, por *solvent casting*, e estudaram o seu efeito em ambiente seco e húmido [138]. Destes testes resultou que a adição de CNF melhorou, significativamente, as propriedades mecânicas, especialmente em condições húmidas. Os valores de resistência máxima à tração e de módulo de Young do quitosano aumentaram em 12 e 30 vezes, respetivamente, para o nanocompósito com 32 %(m/m) de CNF. Assim, as suas propriedades mecânicas, que coincidiram com as da pele humana, levaram os autores a concluir que estes nanocompósitos demonstram potencial para aplicações como pele artificial ou pensos para feridas [138].

Desta forma, a incorporação de CNC ou CNF em matrizes biopoliméricas permite a produção de materiais de alto desempenho, sem prejudicar a sua biodegradabilidade, enquanto aumenta a sua resistência mecânica e propriedades térmicas e de barreira [122].

2.4.4 Incorporação de extratos naturais em filmes nanocompósitos

A introdução de agentes bioativos em nanocompósitos poliméricos é altamente benéfica para diversificar o seu uso em diversas aplicações, como sistemas de tratamento para feridas da pele, confeção de embalagens bioativas ou, até mesmo, na indústria têxtil médica para roupas antimicrobianas [122,139]. Desta forma, para aumentar a viabilidade dos filmes poliméricos reforçados com NC para aplicações biomédicas, nomeadamente para o desenvolvimento de sistemas de tratamento de pele inovadores em que a esterilidade é altamente obrigatória, é fundamental introduzir propriedades antimicrobianas [140].

As propriedades antimicrobianas podem ser incorporadas de diversas formas. Em estudos já existentes, os filmes poliméricos com NC têm sido modificados pela incorporação de nanopartículas, tais como nanopartículas de prata [47,141–143], pela adição de biopolímeros com propriedades antimicrobianas como quitosano [144–146] ou por produtos químicos, incluindo sais inorgânicos, grupos aniónicos e aminas, e, por fim, antibióticos [147–150].

No entanto, existem alguns efeitos adversos decorrentes do uso excessivo de nanopartículas e antibióticos. Em concentrações elevadas, as nanopartículas metálicas podem ser tóxicas para as células humanas ao inibir o recrutamento de células imunitárias e o crescimento de células epidérmicas, dificultando, assim, o processo de cicatrização. Além disso, tal como os antibióticos, o tratamento prolongado com iões metálicos, presentes nas nanopartículas, pode resultar no aparecimento de estirpes bacterianas resistentes [31]. Aliás, a multirresistência adquirida pelas bactérias, devido ao uso alargado e indevido de antibióticos, é atualmente um sério desafio para a saúde pública [151]. Como forma de

superar estes inconvenientes, a procura de agentes antimicrobianos derivados de fontes naturais, como extratos naturais, tem recebido especial atenção devido ao seu tratamento efetivo e sem efeitos colaterais. De facto, os extratos derivados de plantas são de fácil obtenção, possuem citotoxicidade negligenciável e degradam-se rapidamente no ambiente, tornando-se uma excelente alternativa aos antibióticos, que podem causar efeitos secundários no ambiente e no sistema biológico [139]. As propriedades antimicrobianas e anti-inflamatórias intrínsecas aos extratos naturais tornam-nos úteis para tratar infeções [139,152].

Estes extratos naturais são extraídos de diferentes plantas utilizando diferentes solventes e métodos de extração [153]. Recentemente, diferentes extratos provenientes de plantas têm sido utilizados como agentes antimicrobianos, sendo os mais conhecidos a aloé vera [154], manjerição [155], própolis [156,157], acácia [123], chá verde [158], entre outros. Estudos sobre extratos naturais retirados do género *Ziziphus Mill.* (família Rhamnaceae) exaltam as suas propriedades antioxidantes, antibacterianas e anti-inflamatórias, mostrando-se com excelentes potencialidades para a utilização no segmento biomédico [159–161]. O género *Ziziphus* compreende cerca de 100 espécies, distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais em todo o mundo, que consistem em árvores, arbustos, trepadeiras e ervas [162,163]. Vários compostos funcionais são reportados no género *Ziziphus* tais como vitamina C, aminoácidos, polissacarídeos, polifenóis, flavonoides, taninos, saponinas, alcaloides e ácidos gordos, que lhe fornecem variadas propriedades bioativas [159,161]. De facto, os flavonoides, taninos, polifenóis e alcaloides, são apontados, em vários estudos, como responsáveis pelas propriedades antimicrobianas das plantas [160,164,165]. Deste modo, embora a atividade antibacteriana de extratos naturais deste género já tenha sido comprovada, ainda existe um défice de informação na literatura quanto aos extratos naturais retirados das folhas de *Ziziphus* e o seu efeito quando incorporados em filmes poliméricos, pelo que seria cientificamente relevante desenvolver a funcionalização dos nanocompósitos celulósicos com o extrato referido.

Assim, a incorporação de extratos naturais em filmes nanocompósitos à base de quitosano pode-lhes conferir novas propriedades, que aliadas às propriedades antibacterianas intrínsecas a este polímero natural, podem melhorar o seu desempenho biológico, reforçando a atividade antibacteriana, essencial para prevenir ou tratar infeções frequentes em traumatismos da pele [166–168].

Por exemplo, Xu Y. *et al.* incorporaram um extrato natural de uva (GPE- *grape pomace extract*), antioxidante e antibacteriano natural, num nanocompósito de quitosano/CNC [169]. Os filmes, preparados por *solvent casting*, com 2 %(m/v) de quitosano, 5 %(m/m) de CNC e 5 %(v/v) de GPE, mostraram-se uma alternativa promissora aos filmes sintéticos utilizados nas embalagens de alimentos

[169]. Também, *Kanatt et al.* incorporaram uma mistura de extratos naturais de menta e casca de romã em filmes à base de quitosano e estudaram o seu efeito nas propriedades físicas, mecânicas, antimicrobianas e antioxidantes dos filmes. Foi observada uma maior proteção contra a luz UV nos filmes com os extratos, bem como uma melhoria na sua resistência à tração ($41,07 \pm 0,88$ MPa). Além disso, os extratos conferiram propriedades antioxidantes aos filmes, que também exibiram atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus* [170]. Por fim, *Altiok et al.* incorporaram extrato de tomilho em filmes de quitosano, preparados por *solvent casting*, para potencial uso em feridas cutâneas. A incorporação do extrato de tomilho aumentou ligeiramente a permeabilidade ao vapor de água e oxigênio dos filmes. A concentração mínima inibitória do extrato foi encontrada a 1,2 % (v/v), mostrando atividade antimicrobiana contra *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* e atividade antioxidante. Assim, os resultados mostraram-se promissores para a obtenção de filmes antibacterianos e permeáveis para possível aplicação em feridas da pele [171].

Como conclusão preliminar do estado da arte acima descrito nas diversas secções, comprova-se que existe ainda uma crescente necessidade de desenvolver e otimizar novos métodos mais sustentáveis para a extração de NC a partir de resíduos têxteis. Para além disso, e tendo em conta todos os artigos mencionados, existem poucos na literatura que relatem o uso desta NC extraída como reforço de filmes de quitosano dopados com extratos naturais de plantas para tratamento de pele. Deste modo, torna-se o foco desta tese, tentar contribuir para a resolução destes dois tópicos relevantes para a comunidade científica.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Neste trabalho foi extraída NC a partir de resíduos têxteis industriais, cujo destino comum seria um aterro ou incinerador. Esta NC extraída foi incorporada, em três diferentes concentrações, em filmes de quitosano e, posteriormente, a combinação que obteve as melhores propriedades para a aplicação final foi modificada com extrato natural de folhas de *Ziziphus*. Nesta seção experimental são apresentados os materiais utilizados, juntamente com as técnicas aplicadas para o processo de extração da NC a partir da amostra de resíduo têxtil, bem como para a sua otimização ao nível dos parâmetros de ácido utilizado, concentração de ácido, temperatura e tempo de reação. Também o processo de formação de filmes de quitosano reforçados com a NC obtida será relatado, assim como, da incorporação de extrato. Todos os métodos de caracterização aplicados quer na NC extraída, quer nos filmes de quitosano, quitosano/NC e quitosano/NC modificados com o extrato natural estão detalhadamente explicados.

3.1 Materiais

A amostra de resíduo têxtil utilizada neste estudo para extrair NC, apresentada na Figura 5, foi gentilmente cedida pela empresa Tintex SA. A amostra, composta por algodão, foi recolhida no fim do processo produtivo e, portanto, já submetida a várias lavagens e ao processo de branqueamento. Esta foi utilizada de duas formas, cortada manualmente (Figura 5B) e submetida a um tratamento mecânico de moagem (Figura 5C). Esta última amostra moída foi utilizada no estudo de uma estratégia mais verde, aquando da aplicação de ácidos sólidos, possibilitando o estudo de uma abordagem que combina um método mecânico e químico, como será explicado devidamente nos tópicos seguintes.

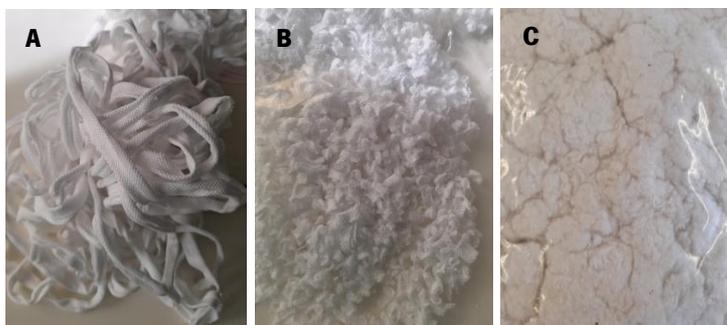


Figura 5: Amostra têxtil utilizada para extrair a NC **A)** no seu estado original, **B)** cortada e **C)** moída.

O hidróxido de sódio (NaOH), peróxido de hidrogénio (H₂O₂), dimetilsulfóxido (DMSO) (anidro ≥ 99.9), ácido maleico (C₄H₄O₄), ácido cítrico (C₆H₈O₇) e ácido sulfúrico (H₂SO₄) foram adquiridos à SigmaAldrich. Estes reagentes foram utilizados como recebidos sem qualquer modificação e apenas diluídos até à concentração pretendida. O quitosano em pó com um peso molecular de 100.000-300.000 g/mol foi obtido da ACROS Organics. Ácido acético glacial 99-100% e glicerol 99% foram obtidos à NORMAX e Scharlau, respetivamente. Por último, o extrato natural de folhas de *Ziziphus* foi extraído pela equipa do Centro de Investigação de Montanha (CIMO), do Instituto Politécnico de Bragança.

3.2 Métodos

3.2.1 Pré-tratamentos

Para se analisar a influência quer do tratamento alcalino, quer do branqueamento na modificação química da amostra de resíduo têxtil fornecida, parte desta foi submetida a pré-tratamentos químicos. Desta forma, dois testes de pré-tratamento foram realizados. Num primeiro teste, uma pequena porção da amostra têxtil original, foi submetida a um processo alcalino. Por outro lado, num segundo teste, uma segunda porção da amostra têxtil original foi submetida a um tratamento alcalino seguido de branqueamento.

O tratamento alcalino, para ambos os testes, foi realizado mergulhando 1 g da amostra têxtil original numa solução de 1 M de NaOH à temperatura ambiente sob agitação constante, utilizando um agitador orbital durante 60 min. Após o tratamento, a amostra foi retirada da solução e lavada várias vezes para remover os resíduos de NaOH.

O processo de branqueamento foi realizado após o tratamento alcalino, apenas no segundo teste. Para tal, 1 g de amostra têxtil original foi submetida a uma solução de H₂O₂ 5 %(v/v) e NaOH 3,8 %(m/v), sob agitação constante durante 60 min à temperatura ambiente e lavada, posteriormente, com água.

No final, as amostras resultantes de ambos os testes de pré-tratamento foram secas na estufa a 50 °C para, posteriormente, serem estudadas no ATR-FTIR e se analisar a necessidade ou não deste tipo de tratamentos por comparação com o espectro da amostra têxtil original, sem pré-tratamento.

3.2.2 Hidrólise com ácidos sólidos

Como explorado até então, há necessidade de estudar métodos mais sustentáveis para extrair NC a partir de resíduos têxteis. Para o efeito, o método de hidrólise ácida, utilizando ácidos sólidos, como o ácido maleico e o ácido cítrico, foi realizada.

Numa primeira fase, uma solução de $C_4H_4O_4$ (80 % (m/v)) foi preparada em 20 mL. De seguida, 0,1 g da amostra têxtil cortada (Figura 5B) foram imersas na solução, sob agitação constante (150 rpm), a 50 °C e a reação monitorizada por 24 h.

Numa segunda fase, duas soluções adicionais de $C_4H_4O_4$ (90 e 100 % (m/v)) foram preparadas. Duas amostras de 0,1 g da amostra têxtil foram submetidas às soluções, sob as mesmas condições de agitação e temperatura do teste anterior. As reações foram, mais uma vez, atentamente monitorizadas por 24 h.

Por fim, uma outra estratégia foi aplicada, envolvendo o aumento de pressão durante a reação. Para tal, recorreu-se à montagem da Figura 6 para mimetizar uma câmara de azoto fechada. De seguida, uma pequena quantidade da amostra têxtil cortada foi colocada no balão esmerilado contendo uma solução de 90 % (m/v) de $C_4H_4O_4$ a 65 °C.

O ácido cítrico foi também testado. Para realização da hidrólise, 0,1 g de amostra têxtil foi imersa numa solução aquosa concentrada de $C_6H_8O_7$ (80 % (m/v)), a 90 °C. A reação foi novamente monitorizada por 24h.

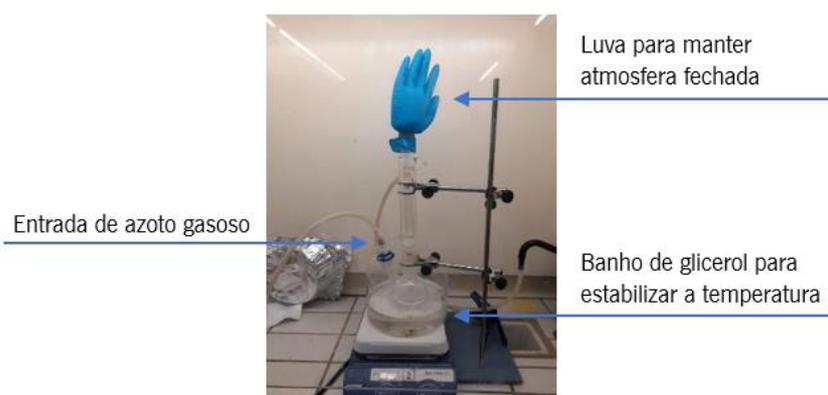


Figura 6: Montagem utilizada para o estudo da hidrólise utilizando ácido maleico.

3.2.3 Método combinado

Este método consistiu na combinação da moagem mecânica com o processo de hidrólise ácida. A amostra têxtil original foi submetida a um processo mecânico de moagem para facilitar a hidrólise da mesma, sendo, posteriormente, aplicado o método químico de hidrólise ácida utilizando o ácido maleico.

Para realização deste ensaio, 0,2 g da amostra têxtil moída (Figura 5C) foi submetida a 20 mL de uma solução aquosa concentrada de $C_4H_4O_4$ (80 % (m/m)), a uma temperatura de 50 °C e agitação mecânica vigorosa. A reação foi atentamente monitorizada e o tempo de reação registrado.

3.2.4 Hidrólise com ácido sulfúrico

A amostra têxtil foi submetida a um processo de hidrólise utilizando ácido sulfúrico, variando as condições de reação de forma a encontrar as condições mais verdes, ou seja, com menor utilização de ácido, temperatura e tempo de reação. Para o efeito, foram preparadas várias soluções de H_2SO_4 com diferentes concentrações (35, 45, 50, 55 e 64 % (m/m)), sujeitas a diferentes temperaturas (40 °C e 50 °C), para se avaliar o papel de cada um dos parâmetros no processo de hidrólise. Estas temperaturas foram minuciosamente controladas com um termómetro e utilizou-se um banho de parafina para que as soluções permanecessem na temperatura pretendida durante todo o processo. O tempo da reação de hidrólise, como foi variável para cada uma das soluções, foi também cuidadosamente monitorizado a partir do momento em que as diferentes quantidades de amostra têxtil cortada entraram em contato com a solução ácida, e será apresentado nos resultados (Tabela 5). Quando a hidrólise da amostra têxtil foi atingida, a reação foi interrompida com adição de um volume de água destilada fria 2x superior ao volume da solução de hidrólise.

A Figura 7 apresenta a montagem que foi realizada para se proceder ao processo de hidrólise ácida em segurança. Após este processo de hidrólise ácida, foram efetuados vários passos explicados abaixo de forma sequencial.

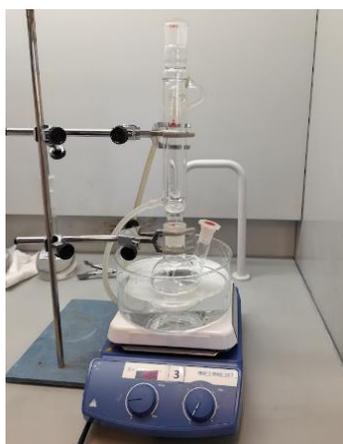


Figura 7: Montagem utilizada para a execução da hidrólise ácida.

Centrifugação

Após o processo de hidrólise, submeteu-se a solução hidrolisada à lavagem, recorrendo à centrifugação, com o objetivo de se remover o ácido livre, ajustar o pH e concentrar a suspensão. A solução hidrolisada diluída em água destilada foi, então, colocada em *falcons* para se efetuar as lavagens.

Centrifugações a 4200 rpm durante 10 min foram feitas, o sobrenadante resultante foi descartado e o *pellet* lavado com água destilada. Este processo, representado na Figura 8, foi repetido até se obter um pH do sobrenadante próximo de 5.

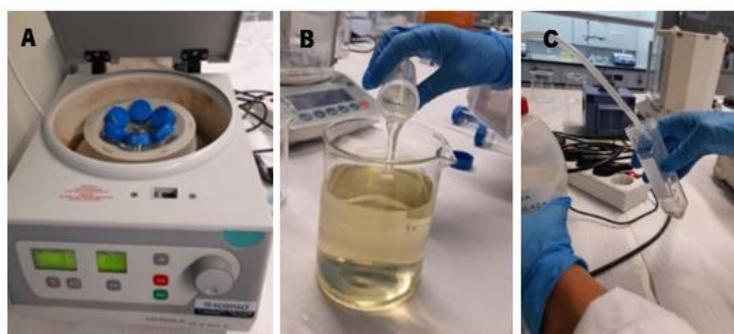


Figura 8: Processo de lavagem da solução hidrolisada: **A)** centrifugação a 4200 rpm por 10 min, **B)** descarte do sobrenadante e **C)** lavagem do *pellet* com água destilada.

Ultrassonicação

O material concentrado durante a centrifugação foi submetido ao banho de ultrassons com o objetivo de se obter uma dispersão uniforme. Este procedimento foi realizado por 30 min, antes e após a diálise.

Diálise

Após o banho de ultrassons, a suspensão foi inserida numa membrana semipermeável de celulose (33 mm x 21 mm MW06245) e colocada num recipiente com água destilada, como mostrado na Figura 9A. A água foi trocada frequentemente ao longo do dia e o pH da solução hidrolisada no interior das membranas foi medido com o papel indicador. Assim que o pH da solução em diálise alcançou um valor neutro, Figura 9B, a diálise foi interrompida. Este processo teve como objetivo neutralizar e eliminar iões sulfato livres resultantes do processo de hidrólise com ácido sulfúrico e teve duração de cerca de 4 dias.

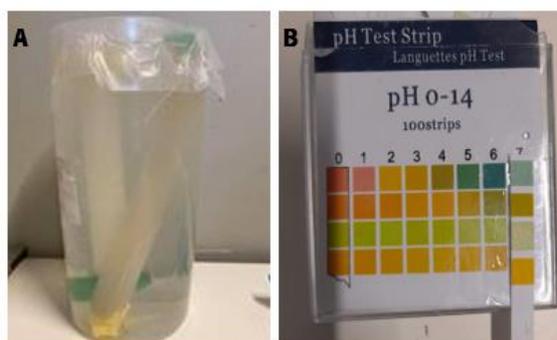


Figura 9: **A)** Membranas de diálise em água destilada e **B)** pH medido com papel indicador no interior das membranas de diálise.

Secagem

Após a diálise, a suspensão obtida foi novamente colocada no banho de ultrassons por 20 min, seguido por centrifugação, novamente a 4200 rpm por 10 min. Como nem em todas as amostras se obteve *pellet*, recorreu-se ao microscópio ótico para se analisar o sobrenadante. Observou-se que algum material celulósico compunha o sobrenadante, como mostrado na Figura 10. Desta forma, quer o sobrenadante, quer o *pellet*, foram submetidos à secagem na estufa a 30 °C durante a noite para evaporação do solvente e posterior trituração para se obter a amostra na forma de pó.

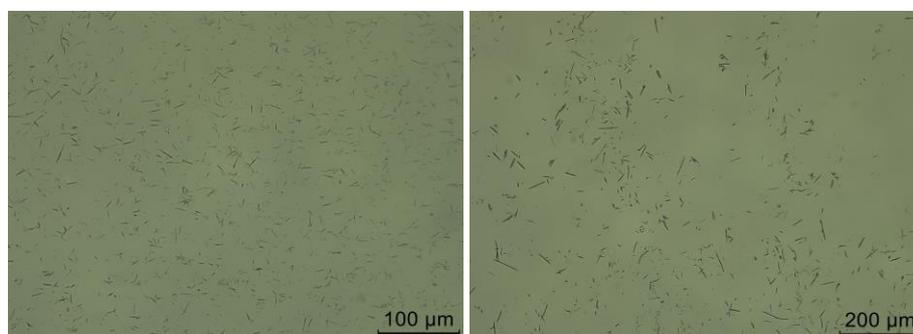


Figura 10: Imagens obtidas por microscopia ótica do sobrenadante pós-diálise. Da esquerda para a direita: 20x (100 µm), 10x (200 µm).

3.2.5 Incorporação da NC em filmes de quitosano

A metodologia de produção de filmes seguiu o protocolo já desenvolvido por S.M. Costa *et al.*, apenas com algumas alterações [122].

Em primeiro lugar, uma solução de 2 %(m/v) de quitosano foi preparada. Para tal, dissolveu-se o quitosano numa solução aquosa de 1 %(v/v) de ácido acético sob agitação vigorosa durante 1 h. Após a dissolução completa do quitosano, a solução foi submetida a um banho de ultrassons por 45 min.

Seguidamente, várias concentrações de NC extraída foram incorporadas na solução de quitosano (0, 5, 10 e 25 %(m/m) em relação ao peso do quitosano). A adição de NC foi realizada lentamente de modo a evitar a formação de agregados. Estas soluções foram deixadas sob agitação constante durante 24 h e, posteriormente, homogeneizadas a 10 300 rpm usando o homogeneizador CAT Unidrive X 1000D. Posteriormente, foi adicionado 1 %(m/v) de glicerol em cada solução e submeteu-se a agitação mecânica por 5 min. Finalmente, as soluções foram colocadas em placas de Petri e secas na estufa a 35 °C durante 24 h para ser possível obter os filmes poliméricos por evaporação do solvente.

3.2.6 Incorporação do extrato natural nos filmes nanocompósitos

Apesar do quitosano por si só já ter propriedades antibacterianas, a adição de um extrato natural poderá tornar a formulação mais eficiente no combate a infeções, assim como, fornecer outras propriedades, como antifúngica e anti-inflamatória, aos filmes.

Primeiramente, o extrato natural escolhido, extraído das folhas de *Ziziphus*, foi dissolvido numa quantidade residual de DMSO (Figura 11) e introduzido numa solução de quitosano em diferentes concentrações: 1, 3 e 5 mg/mL. Após confirmação da boa dissolução e integração no filme, o extrato natural foi adicionado aos filmes de quitosano e quitosano/NC extraída (25 %(m/m)) numa concentração de 5 mg/mL para se proceder ao estudo do seu perfil de libertação.



Figura 11: Extrato natural de folhas de *Ziziphus* dissolvido em DMSO.

3.3 Métodos de Caracterização

3.3.1 Microscópio ótico

O microscópio ótico foi utilizado com o objetivo de se analisar as amostras obtidas após a hidrólise, examinando a sua forma e dimensões, no sentido de se avaliar a eficiência da hidrólise. Este microscópio utiliza a luz visível e um sistema de lentes oculares que formam uma imagem ampliada da amostra em estudo, permitindo observar estruturas dificilmente visíveis a olho nu [172]. Neste estudo, a análise de todas as amostras obtidas no processo de hidrólise ácida foi realizada num Microscópio Leica DM750 M (*bright-field*), constituído por um sistema de duas oculares e quatro objetivas (5x, 10x, 20x e 40x). Para análise das amostras ao microscópio, procedeu-se ao espalhamento de uma gota do hidrolisado, pós lavagem, sob uma lâmina, sobrepondo uma lamela sobre a mesma.

3.3.2 Microscopia Eletrónica de Transmissão por Varrimento – STEM

A Microscopia Eletrónica de Transmissão por Varrimento (do inglês *Scanning Transmission Electron Microscopy* - STEM) foi utilizada de modo a estudar a morfologia e o tamanho resultante das fibras têxteis hidrolisadas. Esta análise permitiu descobrir o tipo de material celulósico obtido pós hidrólise ácida, se constituída por CNC ou CNF ou ambos os tipos de NC.

Este tipo de microscopia combina os princípios da Microscopia Eletrónica de Transmissão (TEM) e Microscopia Eletrónica de Varrimento (SEM). No modo de operação STEM, o feixe de eletrões incidente é altamente focalizado de forma convergente e varre a amostra ponto a ponto sem variação de inclinação. Os feixes emitidos, produto da interação com a amostra, são coletados por detetores especiais, os quais processam a informação para formar a imagem. Interações entre a amostra e o feixe de eletrões ocorrem durante o varrimento da mesma, resultando em diferentes tipos de sinais de eletrões emitidos na superfície da amostra. Estes sinais são recolhidos e processados de modo a formar uma imagem tridimensional, representativa da topografia da superfície [173].

A análise morfológica das amostras hidrolisadas foi, então, realizada num Microscópio Eletrónico de Varrimento por Emissão de Campo de alta resolução (NOVA 200 Nano SEM, FEI Company) com um acessório de transmissão (STEM) a uma aceleração de 10 kV. As amostras foram previamente revestidas com um filme muito fino (10 nm) de Au-Pd (80-20 %(m/v)), utilizando um aparelho de revestimento por pulverização, 208 HR Cressington Company (Watford, Reino Unido), acoplado a um controlador de espessura do revestimento de alta resolução MTM-20 Cressington.

A distribuição dos tamanhos dos materiais obtidos pós-hidrólise foi determinada pela análise das imagens STEM utilizando o software ImageJ® (versão 1.44, National Institutes of Health, EUA).

3.3.3 Reflexão Total Atenuada - Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier – ATR-FTIR

De modo a estudar a estrutura química das amostras, utilizou-se a técnica de ATR-FTIR (do inglês *Attenuated Total Reflectance - Fourier Transform Infrared Spectroscopy* – ATR-FTIR). Além disso, esta técnica foi também utilizada para estudar os filmes e avaliar a interação estrutural entre o quitosano, a NC e, posteriormente, o extrato natural.

Esta é uma técnica de espectroscopia vibracional que utiliza radiação infravermelha para fazer vibrar as ligações moleculares da amostra que as absorve. Através desta técnica é possível obter informação química das amostras analisadas, uma vez que, cada amostra possui ligações moleculares ou grupos químicos característicos [174]. Os espectros de ATR-FTIR foram adquiridos em modo de transmitância num espectrofotômetro IRAffinity-1S, SHIMADZU (Kyoto, Japan), equipado com um acessório de ATR. Cada espectro foi adquirido numa célula ATR de diamante por acumulação de 45 ciclos de varrimento e com uma resolução de 4 cm^{-1} . O equipamento foi programado para ler a transmitância das amostras numa faixa espectral de 400 a 4000 cm^{-1} .

3.3.4 Difração de Raios-X – XRD

A técnica de difração de raios-X (do inglês *X-Ray Diffraction* – XRD) foi utilizada para obter informação acerca da cristalinidade do pó da NC extraída. A difração de raios-X é uma técnica não destrutiva que fornece informação relativamente à estrutura, fase, textura, cristalinidade, entre outras informações estruturais. Os picos de difração de raios-X são originados pela interferência construtiva de um feixe monocromático de raios-X, disperso a ângulos específicos de cada conjunto de planos de uma amostra. A intensidade de cada pico é determinada pela posição atômica dentro destes planos [175].

Este ensaio foi realizado utilizando um difractómetro Bruker D8 Discover, com uma tensão de 40 kV e uma corrente de 40 mA, com radiação Cu-K β . Os dados foram recolhidos para valores de 2θ variando de 5° a 45°. O índice de cristalinidade (I_c) foi calculado de acordo com o método de Segal [176], recorrendo à Equação 1, onde I_{200} é a intensidade do pico do plano cristalino principal (2 0 0) e I_a é a intensidade de pico associada à parte amorfa da celulose (I_{am}):

$$I_c (\%) = \frac{I_{200} - I_{am}}{I_{200}} \times 100\% \quad (1)$$

3.3.5 Análise Termogravimétrica – TGA

A análise termogravimétrica (do inglês *Thermogravimetric analysis* - TGA) foi realizada de modo a verificar a estabilidade térmica da NC extraída e dos filmes poliméricos produzidos. Esta técnica consiste na monitorização das perdas de massa de uma amostra em função do aumento da temperatura, na presença de uma atmosfera controlada [177]. O estudo foi realizado num equipamento STA 700 SCANSCI. As amostras foram aquecidas de 30 °C a 600 °C com uma taxa de aquecimento de 10 °C/min, sob atmosfera de azoto. Para efetuar a análise, as amostras com massa média de 8 mg foram colocadas num cadinho ligado a uma microbalança, o qual foi posteriormente aquecido de maneira controlada e as perdas de massa monitorizadas.

3.3.6 Espectroscopia do Estado Fundamental por Refletância Difusa – GSDR

De forma a estudar a boa incorporação do extrato natural de folhas de *Ziziphus* nos filmes de quitosano, os filmes com diferentes proporções de extrato (1, 3 e 5 mg/mL) foram analisados por espectroscopia do estado fundamental por refletância difusa (do inglês *Ground-state Diffuse Reflectance* - GSDR). Esta técnica permite a determinação da refletância de amostras opacas sólidas em função do comprimento de onda. Uma vez que os filmes têm uma certa transparência, uma folha branca foi utilizada por trás dos filmes para refletir totalmente todos os feixes de luz emitidos.

Os espectros de GSDR dos diferentes filmes foram obtidos utilizando um espectrofotómetro Shimadzu UV 2600, equipado com uma esfera integradora (ISR-2600Plus). Todas as amostras foram registadas na gama de comprimento de onda 200 a 600 nm (resolução de 1 nm). Com a aplicação da teoria de Kubelka-Munk é possível obter o espectro da função de remissão $F(R)$ e, assim, analisar os valores de absorvância dos filmes através da aplicação da equação: $F(R) = (1-R)^2 / 2R$ [178].

3.4 Avaliação das propriedades dos filmes nanocompósitos

3.4.1 Ensaios mecânicos – Testes de tração uniaxial

De forma a avaliar o efeito da incorporação da NC nos filmes de quitosano e estudar a melhor concentração de NC para reforço mecânico dos filmes, foram realizados ensaios de tração uniaxial. O

ensaio de tração uniaxial é um processo destrutivo, durante o qual é medida a força necessária e o grau de alongamento da amostra até ao ponto de rotura [179]. Estes ensaios foram realizados utilizando o equipamento Hounsfield Tinius Olsen, modelo H100KPS com uma célula de carga de 250 N. As amostras foram cortadas em tiras com 10 mm de largura e 80 mm de comprimento. A separação inicial das maxilas foi definida a 30 mm e a velocidade de estiramento a 30 mm/min. A tenção máxima, deformação à rotura e o módulo de Young foram calculados a partir das curvas de tensão-deformação. Cinco réplicas de cada filme de quitosano com 0, 5, 10 e 25 %(m/m) de NC extraída foram testadas.

3.4.2 Atividade antibacteriana

Os testes relativos à determinação da concentração mínima inibitória (do inglês – *Minimum inhibitory concentration* (MIC)) e da concentração bactericida mínima (do inglês – *Minimum bactericidal concentration* (MBC)) do extrato natural de folhas de *Ziziphus*, foram realizados através do método de microdiluição descrita por Wiegand *et al.* [180].

Os inóculos bacterianos foram preparados a partir de uma única colónia de *S. aureus* (ATCC 6538) e incubados durante a noite a 37 °C e 150 rpm, em condições aeróbias, no meio Tryptic *Soy Broth* (TSB). As suspensões de bactérias foram preparadas com uma concentração inicial de $5,0 \times 10^5$ UFC/mL, em *Mueller Hinton Broth* (MHB). Diferentes soluções do extrato (40,960; 36,864; 32,768 e 24,576 mg/mL) foram preparadas, em água destilada, e adicionadas à primeira coluna de placas de 96 poços, num volume de 100 µL. Diluições em série (1:2) foram feitas com MHB nos poços consecutivos, para um volume final de 50 µL. Em seguida, a cada um dos poços, foram adicionados 50 µL das suspensões bacterianas. Suspensões bacterianas sem extrato e o meio de cultura (MHB) foram utilizados como controlo negativo e positivo, respetivamente.

As leituras de absorvância a 600 nm (EZ READ 2000 Microplate Reader, Biochrom, UK) foram feitas antes e depois da incubação da placa por 24 h, a 37 °C e a 150 rpm. Para se proceder à determinação do MIC do extrato analisou-se as diferenças nas leituras de absorvância a 600 nm (entre 0 e 24 h) e tentou-se encontrar a concentração onde houve inibição do crescimento de bactérias. Uma vez que a determinação do MIC foi dificultada pela alteração da cor do extrato durante as 24h de teste, a MBC foi encontrada ao plaquear as suspensões presentes na placa de incubação que não se encontravam turvas (efeito que evidencia a ausência de crescimento de bactérias). Desta forma, encontrou-se a menor concentração de extrato aplicada que não ostentou qualquer formação de colónias. Este procedimento de plaquear consistiu em fazer diluições dos poços que estavam límpidos e pipetar alíquotas de 10 µL de cada uma destas suspensões, em TSA durante 24 h a 37 °C. A ausência de 99,9%

de colónias nas placas de Petri que foram incubadas com a menor concentração de extrato, foi estabelecida como sendo o valor de MBC.

3.4.3 Ensaios de libertação do princípio ativo

Para estudar o perfil de libertação do extrato natural incorporado nos filmes desenvolvidos uma amostra dos filmes quitosano + extrato e quitosano/25% NC + extrato foi colocada numa solução de PBS, com pH de $(8 \pm 0,5)$.

Alíquotas do meio em contacto com os filmes foram monitorizadas por espectroscopia UV-Vis durante 24 horas. Cada filme foi cortado em retângulos pequenos iguais de 1×1 cm e colocado numa placa de 12 poços, previamente preenchidos com 3 mL da solução PBS. De seguida, a placa foi colocada num agitador orbital Shaker Iymen a uma velocidade de 30 rpm e a uma temperatura de 37°C . Em tempos pré-determinados (0, 5 minutos, 10 minutos, 30 minutos, 1 hora, 2 horas, 3 horas, 4 horas, 5 horas e 24 horas) retirou-se uma alíquota para ser analisada por espectroscopia UV-Vis para se monitorizar a libertação do extrato natural para a solução.

Espectroscopia UV-Visível

Um espectrofotómetro UV-Vis (do inglês *Ultraviolet-Visible Spectrophotometer*) foi utilizado de forma a estudar o perfil de libertação do extrato natural incorporado nos filmes nanocompósitos. Num espectrofotómetro UV-Vis, um feixe de luz faz um varrimento de comprimentos de onda na gama do ultravioleta e do visível. Este feixe, atravessa a amostra e é parcialmente absorvido. A radiação não absorvida, é detetada construindo-se, assim, os espectros de absorvância. As bandas de absorvância que aparecem nos espectros obtidos permitem identificar níveis energéticos de determinados estados característicos do material analisado [181].

Os espectros de absorção UV-Vis dos diferentes tempos de ensaio foram obtidos utilizando um espectrofotómetro Shimadzu UV-1800, equipado com cuvettes de quartzo com 1 cm de caminho ótico. Cada espectro foi adquirido num comprimento de onda entre os 200 e os 600 nm. O espectro UV-Vis do extrato foi previamente obtido para avaliação da libertação do princípio ativo. Os filmes encontravam-se imersos na solução PBS e foram recolhidas alíquotas em diferentes períodos ao longo de 24 horas. As diferentes alíquotas foram diluídas (1:60) para evitar o desvio da linearidade da Lei de Beer-Lambert.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Esta secção contempla as principais análises e interpretações obtidas após a fundamentação teórica e a realização da caracterização das amostras.

4.1 Caracterização da amostra original e estudo de pré-tratamentos

De modo a caracterizar a amostra têxtil original, a partir da qual se pretende extrair NC, e estudar a possível necessidade de se aplicar pré-tratamentos à mesma, o espectro de ATR-FTIR da amostra original, bem como os espectros das amostras pré-tratadas com tratamento alcalino e tratamento alcalino seguido de branqueamento, encontram-se apresentados na Figura 12.

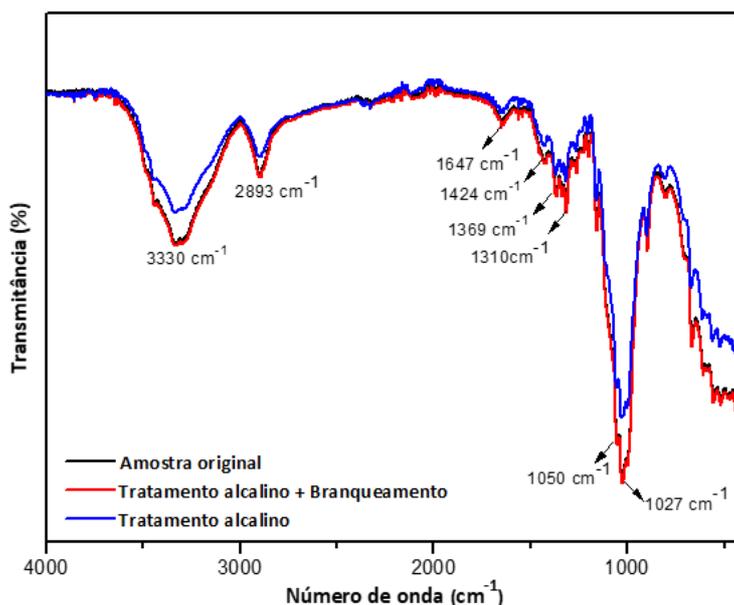


Figura 12: Espectros de ATR-FTIR, da amostra original, da amostra submetida ao tratamento de branqueamento e alcalino e da amostra submetida apenas ao tratamento alcalino.

Como se pode verificar na Figura 12, pela análise do espectro de cada uma das amostras, as bandas características da celulose (componente principal na amostra têxtil de algodão) estão presentes em todos. As bandas por volta dos 3330 cm⁻¹ e dos 2893 cm⁻¹ devem-se ao estiramento dos grupos O-H e C-H da celulose, respetivamente [182]. O pico de absorção a 1647 cm⁻¹ corresponde à vibração do grupo O-H da água absorvida pela amostra. A torção simétrica de CH₂ e a vibração de deformação do CH estão denunciados pelas bandas presentes a 1424 cm⁻¹ e 1369 cm⁻¹, respetivamente. A banda a

1310 cm^{-1} está relacionada com as vibrações C-H e C-O, contidas nos anéis do polissacarídeo [183]. Por fim, a vibração C-O-C no anel de piranose é indicada pelo pico de absorção a 1027 cm^{-1} [182,184].

Portanto, desta análise detalhada, observa-se a ausência de bandas características da lignina e da hemicelulose, tais como em 1252, 1511 e 1738 cm^{-1} , relacionados com a vibração de estiramento C-O do grupo arilo da lignina, estiramento C=C do anel aromático na lignina e estiramento C=O dos grupos carboxílicos de hemicelulose, respetivamente [185]. A ausência destas bandas específicas, mesmo na amostra têxtil original sem qualquer tipo de tratamento, comprova que a amostra cedida pela empresa Tintex SA não continha qualquer tipo de material amorfo, lignina e hemicelulose, comprovando que esta amostra tinha já sido submetida a processos de lavagem e branqueamento no seu processo produtivo. Assim sendo, desta análise assume-se que os tratamentos não contribuíram para qualquer diferença na amostra, evidenciando que a amostra têxtil, com elevado teor em celulose, não necessita de ser submetida a qualquer processo de pré-tratamento antes da extração, podendo ser utilizada como fornecida no processo de extração de NC.

4.2 Hidrólise utilizando ácidos sólidos

Como este trabalho se pautou pela sustentabilidade ambiental e circularidade económica, o estudo contemplou a utilização de ácidos sólidos passíveis de serem recuperados, tais como o ácido maleico ($\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_4$) e ácido cítrico ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$) para se proceder à hidrólise, e assim contribuir para a redução do impacto ambiental, como fundamentado na Secção 2.

Para a avaliação da capacidade hidrolítica dos ácidos sólidos utilizados sob a amostra em análise, os parâmetros apresentados na Tabela 3 foram testados.

Tabela 3: Parâmetros utilizados na realização da hidrólise com ácidos sólidos.

Ácido	Massa da amostra (g)	Volume da solução (mL)	Temperatura de reação ($^{\circ}\text{C}$)	Concentração de ácido (%)	Resultado
$\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_4$	0,1	20	50	80	X
				90	X
				100	X
$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$	0,1	20	60-70 com câmara de azoto	90	X
				80	X

X – Não efetivo

Primeiramente, submeteu-se a amostra têxtil cortada (Figura 5B) a uma solução de ácido maleico (80 % (m/v)) durante 24h, a 50 °C sob agitação, não provocando qualquer mudança estrutural na amostra, demonstrando que a concentração de ácido seria demasiado fraca para a hidrolisar. Posteriormente, submeteu-se a amostra a concentrações superiores de ácido (90 e 100 % (m/v)), como mostrado na Tabela 3. Uma vez mais, estas concentrações mostraram-se ineficazes, ocorrendo mesmo a precipitação do ácido maleico nestas condições, como mostrado na Figura 13A.

Outras abordagens, como a aplicação de outros ácidos sólidos foi também estudada. O ácido cítrico é um ácido sólido cristalino, inodoro e amplamente encontrado em frutas e legumes, especialmente em citrinos, mas também nos ossos e músculos dos animais, tendo apenas um ligeiro impacto na saúde humana e no ambiente [186]. A amostra foi então sujeita a uma solução concentrada de ácido cítrico (80 % (v/v)), a uma temperatura ainda mais elevada (90 °C) que culminou num resultado semelhante: a amostra manteve-se intacta durante as 24h, como se pode ver pela Figura 13B.

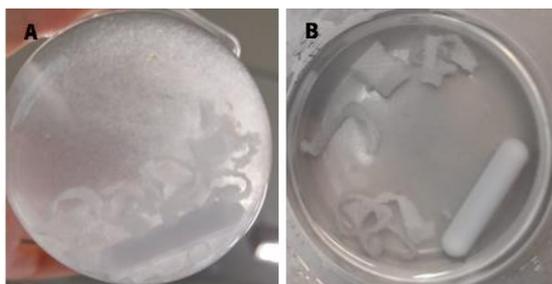


Figura 13: Resultados do processo de hidrólise da amostra utilizando **A)** 90 % (m/v) de $C_4H_4O_4$, a 50 °C e **B)** 80 % (m/v) de $C_6H_8O_7$, a 90 °C, após 24h.

Devido à ineficiência dos processos aplicados com estes ácidos sólidos, outra alternativa foi estudada. Fez-se aumentar a pressão no interior do balão esmerilado durante a reação de hidrólise, com azoto gasoso injetado em circuito fechado (Figura 6), aplicando 90 % (m/v) de $C_4H_4O_4$ na faixa de temperatura de 60 - 70 °C. Desta forma, além da temperatura de reação e da concentração de ácido, também a pressão seria uma condição a ter em conta nesta reação. Contudo, mesmo estas condições neste último processo não provocaram qualquer alteração na amostra, permanecendo estruturalmente intacta. Conclui-se que o ácido mesmo nestas condições não é suficiente forte para degradar a amostra sendo necessário adotar outra estratégia.

4.3 Método combinado

Como explorado na revisão da literatura, um procedimento mecânico, antes do processo de hidrólise, geralmente facilita este último processo. Por exemplo, Ji *et al.* descobriram que com o auxílio de ultrassonicação, poderiam superar as dificuldades do ácido cítrico, causadas pela sua fraca acidez [186]. No entanto, este estudo decorreu utilizando polpa de cana-de-açúcar como matéria-prima, estudos com têxteis não foram encontrados. Então, na tentativa de se alcançar um processo de hidrólise efetivo, procedeu-se à aplicação de uma solução concentrada de ácido maleico na amostra têxtil moída (Figura 5C). As condições de hidrólise aplicadas encontram-se apresentadas na Tabela 4.

Tabela 4: Parâmetros utilizados na realização do método combinado.

Ácido	Massa da amostra moída (g)	Volume da solução (mL)	Temperatura de reação (°C)	Concentração de ácido (%)	Resultado
C ₄ H ₄ O ₄	0,1	20	50	80	X

X - Não efetivo

Como mostrado na Figura 14, mesmo este processo combinado não surtiu qualquer efeito na amostra têxtil.



Figura 14: Resultado da aplicação do método combinado, após 24h.

Portanto, como esta dissertação teve como objetivos encontrar estratégias mais verdes para o tratamento de resíduos têxteis, a fim de se extrair NC, paralelamente às estratégias acima descritas, decidiu-se focar também na otimização do método convencional. Assim, por redução da concentração de ácido sulfúrico geralmente aplicada (64 %(m/m)) e da temperatura de reação (por volta dos 55 °C)

pretende-se tornar a extração de NC a partir destes resíduos têxteis mais sustentável, como o tópico seguinte demonstra.

4.4 Extração de NC através de hidrólise com H₂SO₄ e caracterização

4.4.1 Processo de otimização da hidrólise com H₂SO₄

Para se proceder à otimização da hidrólise com H₂SO₄, estudou-se um conjunto de parâmetros, tais como, concentração de ácido sulfúrico, quantidade de amostra, tempo de hidrólise, temperatura de reação e volume de solução. Os parâmetros utilizados, bem como o respetivo resultado, encontram-se descritos na Tabela 5.

Tabela 5: Parâmetros utilizados na realização da hidrólise com ácido sulfúrico.

Denominação	Massa (g)	Volume (mL)	Rácio (g/mL)	H ₂ SO ₄ (%)	Temperatura (°C)	Tempo de hidrólise (h)	Resultado
A₁	5	100	1:20	64	40	1 h 30 min	✓
A₂	15	150	2: 20	64	40	2 h 20 min	✓
B₁	0,3	20	0,3:20	55	40	1 h 20 min	✓
B₂	0,3	20	0,3:20	50	40	2 h 20 min	X
B₃	0,3	20	0,3:20	45	40	Hidrólise incompleta	X
B₄	0,3	20	0,3:20	35	40	Hidrólise incompleta	X
C₁	0,3	20	0,3:20	55	40	2 h	✓
C₂	0,6	20	0,6:20	55	40	2 h	✓
C₃	0,9	20	0,9:20	55	40	2 h 30 min	✓
Amostra otimizada	3	100	0,6:20	55	40	2 h 30 min	✓
NC	4,5	150	0,6:20	55	50	± 3 h	✓

X - Não efetivo; ✓ - Efetivo

De modo a facilitar a interpretação dos resultados, dividiu-se os experimentos em conjuntos. Os testes com a denominação **A** referem-se aos primeiros testes realizados na amostra têxtil em condições *standard* (64 %(m/m) de ácido, 55 °C por 45-60 min) mas já com redução da temperatura para 40 °C

[92]. Os testes **B** tiveram como objetivo a análise de uma menor quantidade de ácido eficaz na hidrólise da amostra e, portanto, focou-se na variação da concentração de ácido aplicada. Relativamente ao grupo **C**, integra o conjunto de testes que têm como objetivo avaliar a quantidade máxima de amostra suscetível à hidrólise e que, por sua vez, levará a um maior rendimento de extração de NC.

Inicialmente uma reprodução do método convencional foi feita (experiências A₁ e A₂), mas com uma redução de temperatura em 15 °C. A reação foi interrompida assim que não se verificaram, a olho nu, mais resíduos da amostra original. No entanto, uma mudança de cor da mesma ocorreu no decorrer do tempo de reação que se verificou superior ao convencional, descrito na literatura. Este aumento do tempo de reação deveu-se à diminuição da temperatura de reação e a todos os envolventes que o podem influenciar, como a natureza da amostra inicial. Resultados avaliados por microscopia ótica, aliados à mudança de cor da solução, revelaram que a concentração do ácido foi excessiva, como se pode comprovar pela Figura 15.

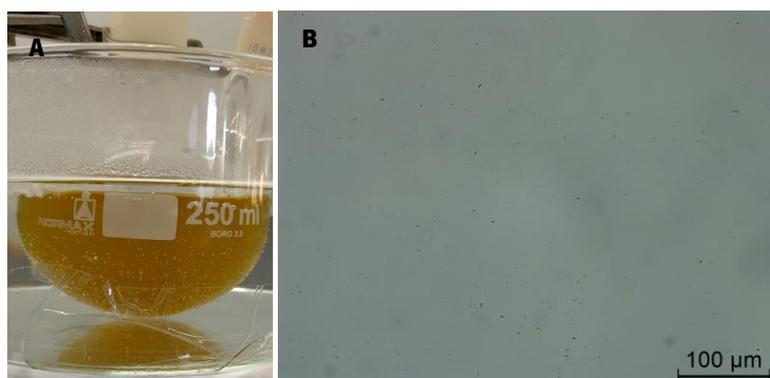


Figura 15: A) Mudança de cor da solução resultante do teste A após hidrólise. **B)** Imagem obtida por microscopia ótica da mesma amostra com ampliação de 20x (100 μm).

Procedeu-se, então, a uma otimização da concentração de ácido sulfúrico de modo a diminuí-la o máximo possível para a realização da hidrólise da amostra têxtil (experimentos **B**). Destas experiências, apenas a B₁, cuja concentração de ácido usada foi de 55 %(m/m) a 40 °C alcançou bons níveis de hidrolisação, mostrando-se ineficientes para o efeito as restantes concentrações aplicadas. É de se salientar que uma redução de apenas 5% na concentração de ácido, de 55% para 50%, resultou num aumento do tempo de hidrólise e que, para as mesmas condições de massa de amostra e temperatura, menores concentrações de ácido não surtiram qualquer efeito, como apresentado na Tabela 5.

Posteriormente, a quantidade de amostra têxtil a hidrolisar também foi avaliada, de modo a descobrir qual a quantidade máxima de massa de amostra para um bom rendimento de hidrólise (experiências **C**). Para a mesma concentração de ácido (55 %(m/m)), as diferentes massas (0,3, 0,6 e

0,9 g) foram passíveis de serem hidrolisadas, como se pode observar pela avaliação das amostras quer pelo microscópio ótico quer por STEM (Figura 16). Contudo, foi no teste onde se aplicou uma quantidade de 0,6 g, que se obtiveram os melhores resultados e a melhor reprodutibilidade.

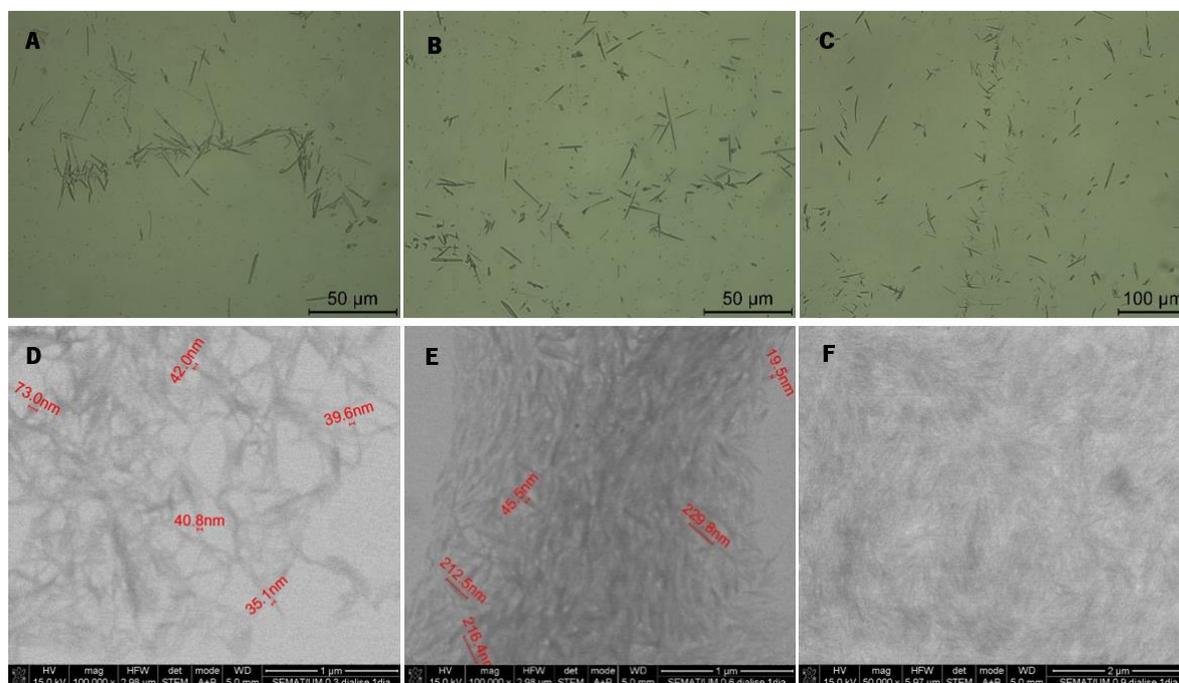


Figura 16: Imagens obtidas por microscopia ótica das amostras **A)** C₁ **B)** C₂ **C)** C₃ e obtidas por STEM das amostras **D)** C₁ **E)** C₂ **F)** C₃. Utilizando ampliações de 40x (50 μm), 20x (100 μm), 100 000x (1 μm) e 50 000x (2 μm).

Pela observação ao microscópio ótico todas as amostras apresentaram morfologias semelhantes, mas pela observação ao STEM os materiais com uma forma mais definida (fina e alongada) são observados nas amostras C₁ e C₂, tendo-se mesmo conseguido obter materiais com comprimentos próximos de 200 nm e diâmetros a rondar os 40 nm, o que vai de encontro à definição de NC [1,33]. Desta forma, selecionou-se a amostra C₂, onde se utilizou 0,6 g de amostra têxtil, tanto pelos resultados de microscopia, quer pela reprodutibilidade que permitirá hidrolisar a maior quantidade de amostra num tempo mais eficiente.

Conclui-se, assim, que os parâmetros do processo de extração otimizado incluem uma concentração 55 %(m/m) de H₂SO₄ e um rácio de 0,6:20 (g/mL), a 40 °C. Conseguiu-se uma redução em 9% da concentração de ácido sulfúrico e em 15 °C da temperatura de reação em comparação com o método convencional mais citado na literatura.

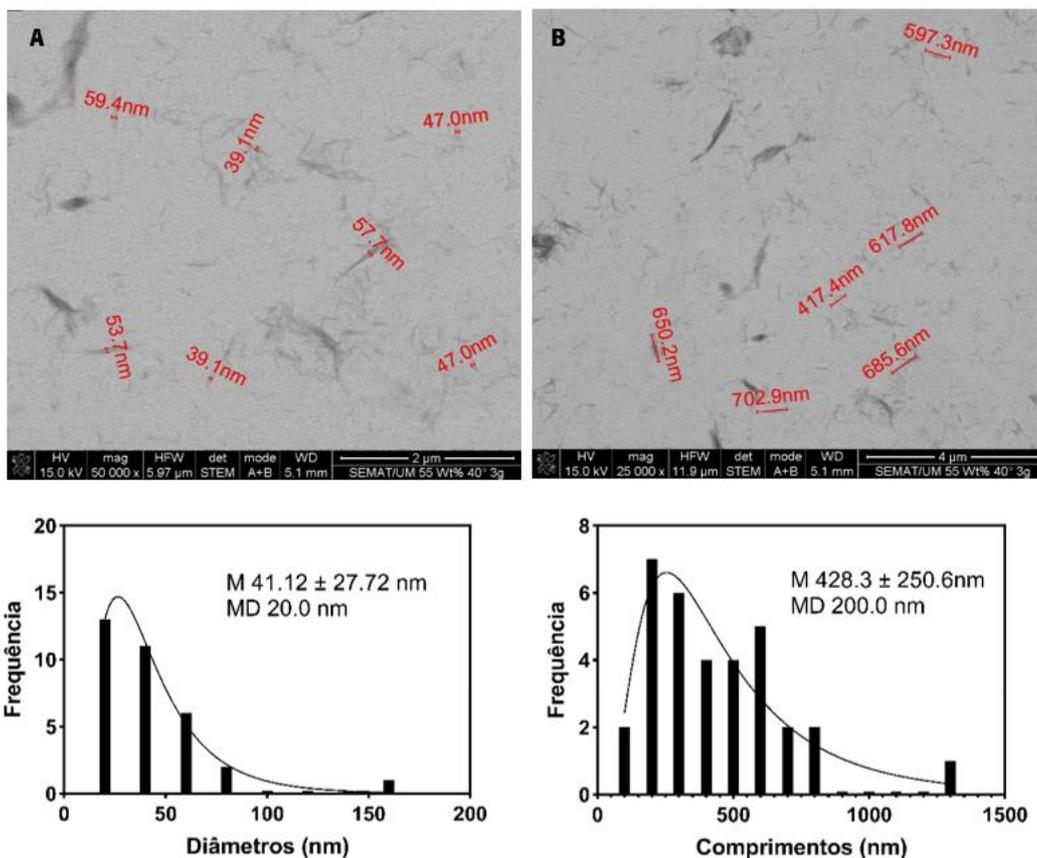


Figura 17: Imagens obtidas por STEM da amostra otimizada com ampliações de **A)** 50 000x (2 μm) e **B)** 25 000x (4 μm) e os respectivos histogramas da distribuição de tamanhos das NC obtidas, com a respetiva média (M) e moda (MD).

Na Figura 17, através da análise das imagens, pode-se constatar que o material obtido através deste processo otimizado (denominado como **amostra otimizada** na Tabela 5), apresenta uma morfologia fina e alongada, com diâmetros e comprimentos na escala nanométrica. Através da análise dos histogramas, o nanomaterial apresenta uma alargada distribuição de tamanhos com um diâmetro médio de cerca de 41 nm e um comprimento médio de 428 nm. Estas variações de dimensões sugerem que tanto CNC como CNF foram obtidas. Uma vez que, na literatura, um diâmetro até 10 nm e comprimentos até 500 nm é usualmente descrito como CNC e diâmetros até 50 nm e comprimentos até poucos micrómetros é descrito como CNF, e estes limites não se encontram bem uniformizados podendo variar consoante o autor, podemos afirmar que se obteve uma mistura dos dois tipos de NC [36,40,48].

Por fim, como apresentado na última linha da Tabela 5, várias repetições em maior escala da hidrólise com os parâmetros otimizados foram realizadas, conseguindo-se prever um tempo médio de hidrólise para este tipo de amostra têxtil de 3 h. As NC obtidas, resultantes dos processos anteriores, foram pesadas após secagem para se calcular o rendimento da reação através da massa inicial e da

massa obtida pós hidrólise, tendo-se obtido um rendimento médio de extração de 66,5%. Em seguida, procedeu-se à caracterização por ATR-FTIR, XRD e TGA da NC extraída, para se obter mais informação sobre este material, e, posteriormente, se introduzir em filmes à base de quitosano e estudar a sua influência nas propriedades dos mesmos.

4.4.2 ATR-FTIR

A Figura 18 apresenta a comparação entre o espectro da NC extraída e o espectro da amostra têxtil original.

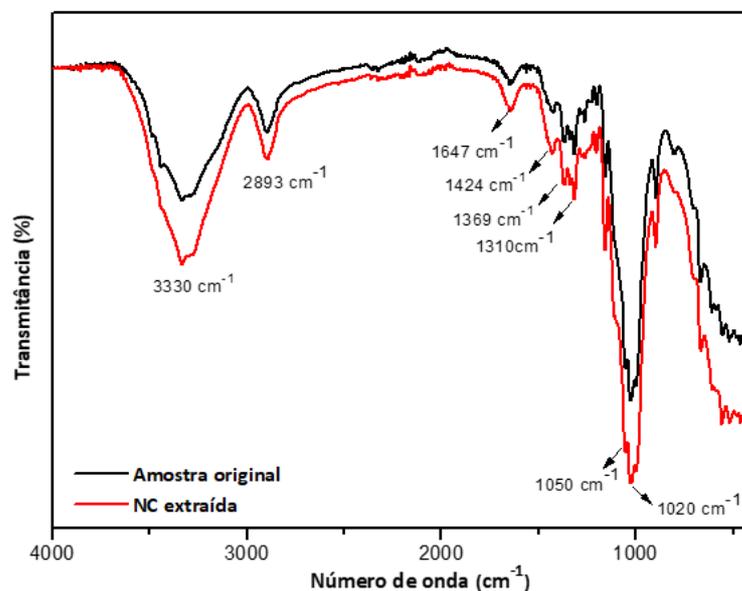


Figura 18: Espectro de ATR-FTIR da amostra têxtil original e da NC extraída.

As duas amostras exibem o espectro típico da celulose, evidenciando os seus principais picos a 3330, 2893, 1647, 1424, 1369 e 1020 cm⁻¹ [182,184]. Comprova-se, assim, que o processo de hidrólise ácida realizado não introduziu qualquer modificação na estrutura química do material de base, sendo que o aumento de intensidade no espectro da NC extraída está relacionado com o aumento da cristalinidade nesta amostra relativamente à amostra original, devido aos processos de purificação química sofridos em âmbito industrial e à hidrólise com ácido sulfúrico a que foi submetida [187].

4.4.3 XRD

As propriedades mecânicas e térmicas da NC são dependentes das características cristalinas do material. Particularmente, a sua capacidade de reforço e resistência mecânica são fatores decisivos para

o seu uso como reforço em filmes poliméricos [188]. O padrão de difração de XRD da NC extraída encontra-se na Figura 19.

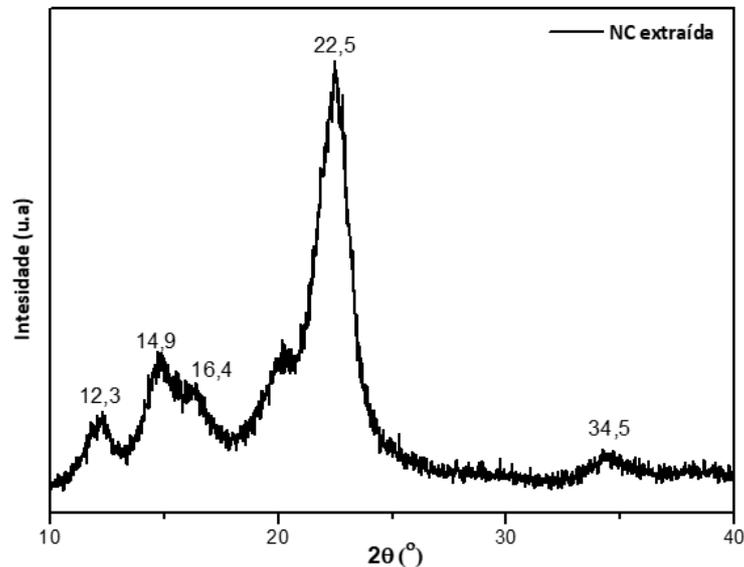


Figura 19: Padrão de difração de XRD do pó da NC extraída.

Os padrões de difração de XRD foram registados a $2\theta = 14,9, 16,4, 22,5,$ e um pico fraco a $34,5^\circ$, que são picos característicos para a celulose tipo I correspondentes aos planos cristalográficos (1 1 0), (1 1 0), (2 0 0) e (0 0 4), de acordo com diferentes estudos [15,16,189]. O pico correspondente a $2\theta = 12,3^\circ$ pode indicar a transformação da celulose nativa da fase α para a β , que são as duas fases distintas da celulose tipo I [3]. O maior pico cristalino foi observado a $22,5^\circ$ com uma intensidade próxima de 100%, o que confirma a presença de celulose cristalina, corroborando os resultados provenientes das análises de ATR- FTIR [188].

O índice de cristalinidade foi também calculado utilizando o método de Segal (Equação 1) obtendo-se um valor de $83,4 \pm 0,86 \%$. O pico do plano cristalino principal (2 0 0) (I_{200}) foi localizado a $22,5^\circ$. A intensidade de pico associada à parte amorfa da celulose (I_{am}) foi observada a $18,0^\circ$ [3]. Este é um valor de cristalinidade típico da CNC, como relatado em vários artigos [10,14,36]. Este valor alto de cristalinidade deve-se, então, à hidrólise causada pela solução ácida que penetrou na região amorfa da celulose da amostra, causando a clivagem das ligações glicosídicas e libertando as zonas mais cristalinas de celulose, obtendo-se assim as nanoceluloses [3].

4.4.4 TGA

O TGA foi realizado para avaliar a estabilidade térmica dos materiais extraídos por hidrólise da amostra têxtil. Deste modo, as curvas obtidas de TG e da sua derivada de primeira ordem (DTG) estão representadas na Figura 20.

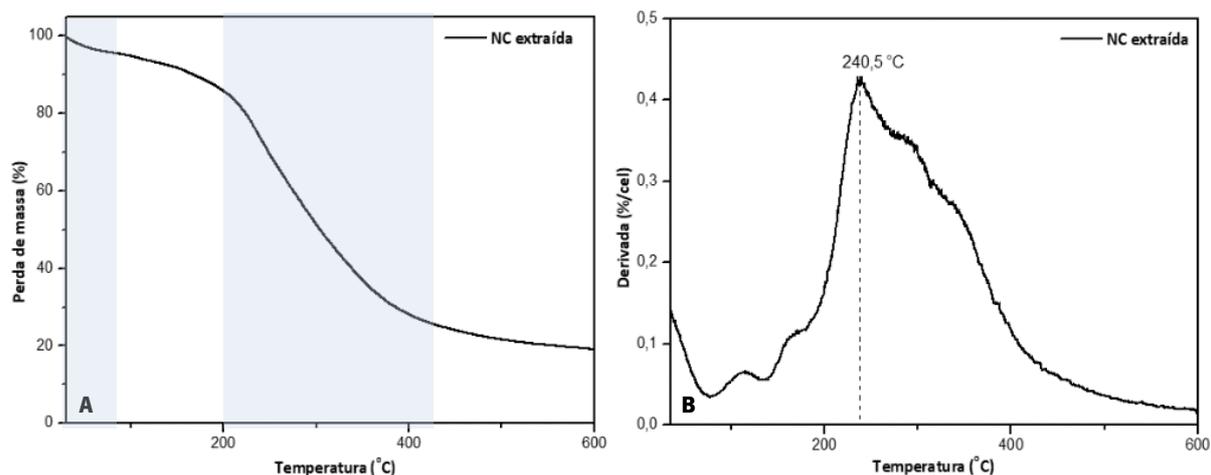


Figura 20: Curvas de **A)** TGA e **B)** derivada de primeira ordem das curvas de TGA (DTG) da NC extraída.

Dois estágios de degradação térmica principais, na forma de perda de massa, foram observados. Um decréscimo de massa inicial de 30 - 96 °C pode ser explicado pela evaporação das moléculas de água e de compostos de baixa massa molecular [188]. A perda de massa mais abrupta, no segundo estágio, de 205 - 420 °C, deve-se à despolimerização, desidratação e decomposição das unidades glicosídicas da celulose [8]. Aproximadamente 65% do peso foi perdido dos 205 aos 420 °C, sendo que uma região linear de perda de peso surgiu a partir de 230 a 320 °C o que vai de encontro à temperatura máxima degradação, a 240,5 °C, registada no gráfico DTG. Todavia, não foram observados picos correspondentes à hemicelulose (150 °C) e lignina (380 - 500 °C), comprovando assim, mais uma vez, a sua ausência [78,183]. Assim, os resultados de TGA confirmam a pureza e boa estabilidade térmica da NC isolada da amostra têxtil.

4.5 Utilização da NC extraída para produção de filmes e caracterização

4.5.1 Produção e otimização de filmes de quitosano reforçados com a NC extraída

Por forma a se obter filmes de quitosano/NC estáveis, uniformes e flexíveis, seguiu-se o protocolo descrito na secção dos materiais e métodos. Às soluções já preparadas de quitosano, juntou-se a NC extraída em diferentes quantidades (5, 10 e 25 %(m/m) em relação ao peso do quitosano).

Neste processo, a utilização de ultrassons durante 45 min e do homogeneizador após adição da NC extraída obteve melhores dispersões de NC na matriz de quitosano, resultando num filme mais homogêneo, como se pode verificar pela comparação entre a Figura 21A e a Figura 21B. Por outro lado, também a adição de glicerol tornou os filmes mais flexíveis e menos quebradiços, contrariamente ao verificado no filme sem glicerol adicionado (Figura 21C).

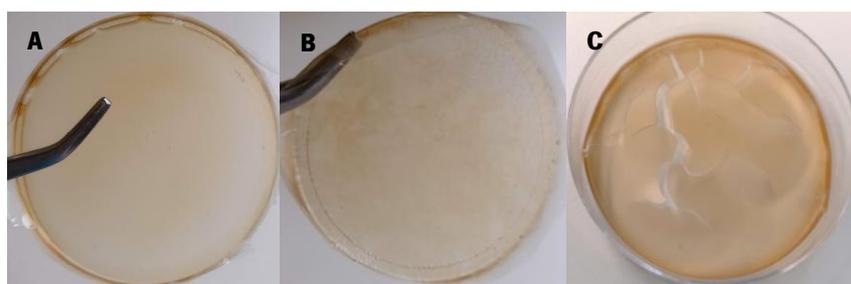


Figura 21: Filmes de quitosano/10% NC **A)** otimizado, **B)** sem homogeneização e **C)** sem adição de glicerol.

4.5.2 ATR-FTIR

A espectroscopia ATR-FTIR foi realizada para caracterizar os filmes de quitosano reforçados com as diferentes quantidades de NC extraída (5, 10 e 25 %(m/m)) e avaliar a interação estrutural entre os polímeros. A Figura 22A mostra o espectro da NC extraída em pó, do filme de quitosano e dos filmes de quitosano contendo as diferentes concentrações de NC extraída. Na Figura 22B encontram-se sobrepostos os mesmos espectros, mas numa gama de número de onda mais limitada entre os 1600 - 600 cm^{-1} , de modo a facilitar a visualização das diferenças entre os espectros na região considerada a impressão digital dos compostos [190]. Algumas das bandas mais importantes dos polímeros em causa encontram-se discriminadas.

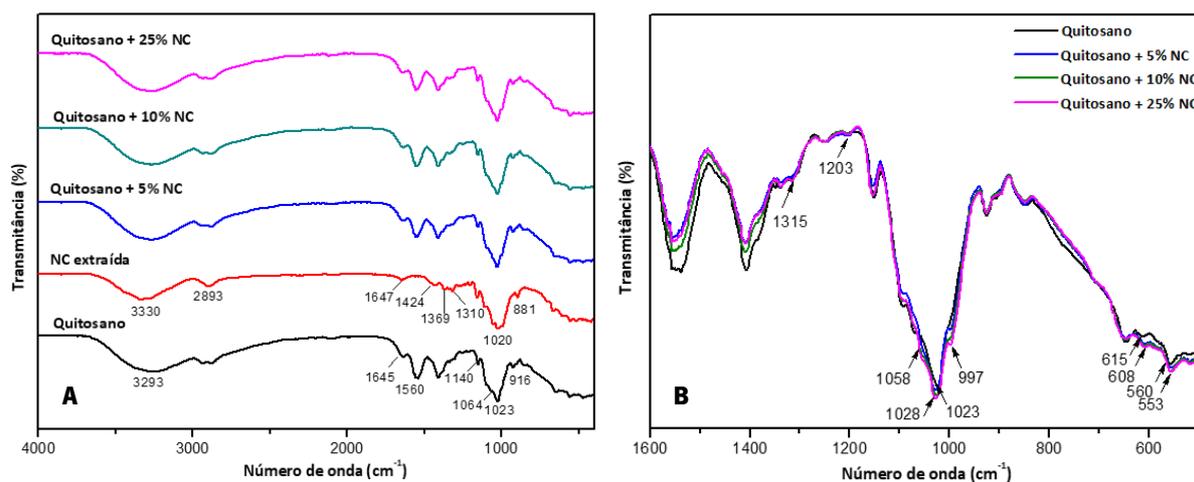


Figura 22: Espectros de ATR-FTIR: **A)** pó de NC extraída e filmes de quitosano/NC (0, 5, 10 e 25%) e **B)** espectros sobrepostos dos mesmos filmes.

O espectro do filme de quitosano exibe as principais bandas características deste biopolímero, incluindo a banda ampla na região de 3200 - 3400 cm⁻¹ que corresponde à vibração de estiramento das ligações N-H e O-H [182,183]. As bandas a 1645 cm⁻¹ e 1560 cm⁻¹ que resultam do estiramento de C=O (amida I) e à torção da ligação NH (amida II), respetivamente [183,191]. As bandas correspondentes à região sacarídea do quitosano também se verificam, nomeadamente a 1140, 1064, 1023 e 916 cm⁻¹, onde a banda mais intensa a 1023 cm⁻¹ indica a vibração de estiramento da ligação C-O [183,192].

Quanto ao espectro da NC extraída, apresenta a banda de absorção típica a 3200 - 3400 cm⁻¹ e o pico a 2893 cm⁻¹, que correspondem a vibrações de estiramento dos grupos O-H e C-H da celulose, respetivamente [154]. As bandas a 1647 e 1424 cm⁻¹ devem-se ao estiramento da ligação O-C-O e à torção simétrica de -CH₂, respetivamente. Além disso, as bandas em 1369 e 1310 cm⁻¹ surgem da vibração de OH e dos grupos C-H e C-O contidos nos anéis dos polissacarídeos, respetivamente. O pico a 1020 cm⁻¹ corresponde à vibração de estiramento da ligação C-O do anel de piranose. E, por fim, o pico a 881 cm⁻¹ deve-se às ligações β-glicosídicas na estrutura da celulose [30,182].

Relativamente aos espectros de ATR-FTIR dos filmes de quitosano/NC é possível observar o aparecimento de novas bandas relacionadas com a NC, nomeadamente a 1315, 1203 e 997 cm⁻¹. Além disso, a banda na região de 3200 - 3400 cm⁻¹ sofreu um ligeiro aumento de intensidade nos filmes quitosano/NC, tornando-se mais pronunciado com o aumento do teor de NC, o que pode ser explicada pela ocorrência de ligações de hidrogénio entre a NC e o quitosano, como relatado por vários autores [193,194]. Além destas observações, registaram-se também alguns desvios de bandas. O pico em 1023, 615 e 559 cm⁻¹ no filme de quitosano sofreu uma mudança para 1028, 609 e 557 cm⁻¹ nos espectros de

quitosano/NC. Assim, o aparecimento de novas bandas relacionadas com a NC, bem como as mudanças de intensidade e os desvios de outras bandas confirmam o sucesso de incorporação da NC na matriz de quitosano.

4.5.3 TGA

A estabilidade térmica dos filmes de quitosano e quitosano/NC foi avaliada através de análise TGA. O perfil de degradação de cada amostra, bem como a sua derivada de primeira ordem (DTG), encontram-se representados na Figura 23.

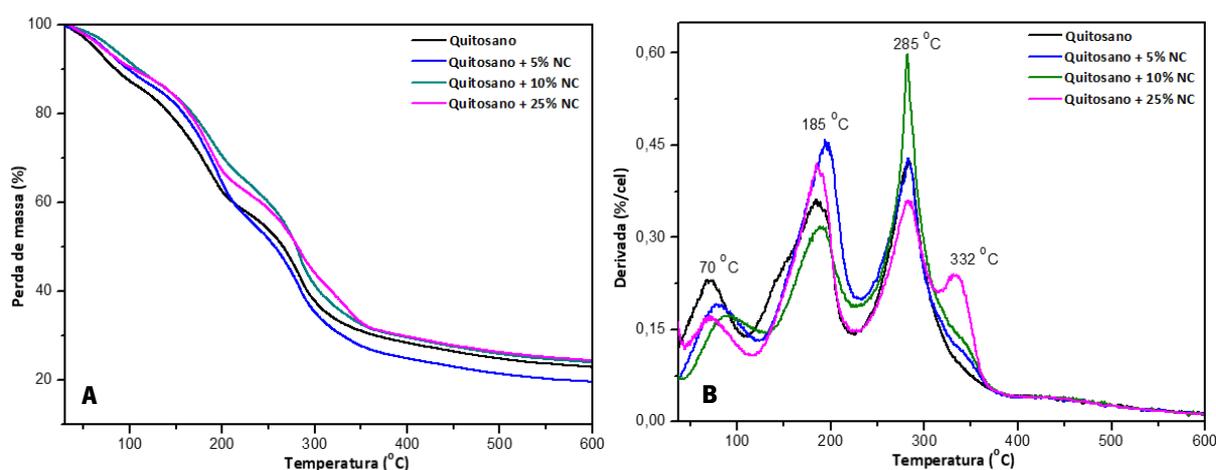


Figura 23: Curvas **A)** TGA e **B)** derivada de primeira ordem das curvas de TGA (DTG) dos filmes de quitosano/NC (0, 5, 10 e 25%).

Nos filmes de quitosano, podem ser observadas três grandes fases de degradação. A primeira foi registada entre os 30 e os 103 °C, a qual é atribuída à evaporação da água e do ácido acético residual. A segunda fase de 103 a 230 °C está relacionada com a degradação do glicerol incorporado nos filmes. Finalmente, a degradação principal ocorreu no intervalo 230 - 370 °C, que corresponde à decomposição e despolimerização do quitosano, com o seu pico máximo de degradação registado a 285 °C [122,195,196].

A incorporação da NC, em diferentes percentagens, nos filmes de quitosano, levou ao aparecimento de um ombro na região entre 310 - 370 °C, que pode estar associado à segunda fase de perda de massa da NC, tornando-se mais pronunciada com o aumento de conteúdo de NC, confirmando a presença deste *nanofiller* na matriz polimérica [197]. Como visto na Figura 20, o pico principal relacionado com a degradação da NC extraída encontra-se por volta dos 240,5 °C, sendo que se sobrepõe à degradação principal do quitosano. Por conseguinte, apenas um pico foi observado na região de 230

a 320 °C, sendo atribuído tanto à degradação do quitosano quanto à degradação da NC extraída. É de se salientar, também, que no filme com maior concentração de NC extraída (25 % (m/m)), o principal pico de degradação na região de 230 a 320 °C é menor que o dos restantes filmes com concentrações inferiores, o que pode ser explicado pela ligação entre a NC e o quitosano, que vai evitar uma maior degradação da estrutura [122].

As curvas de TGA, bem como a análise da derivada de primeira ordem, indicam que a perda de massa das amostras de quitosano/NC foi mais baixa que os filmes de quitosano, exceto para o filme cuja concentração de NC é de 5 % (m/m) [195]. Também, no primeiro pico de degradação, a perda de massa dos filmes quitosano/NC é inferior à dos filmes apenas de quitosano, o que pode indicar que as ligações entre a NC e o quitosano, através de pontes de hidrogénio, evitam a absorção de água ao reduzirem a disponibilidade dos grupos -OH [198]. De facto, até aos 370 °C (temperatura até à qual se regista a maior perda de massa das amostras) os filmes de quitosano exibiram uma perda de peso total de 71%. Por outro lado, o filme de quitosano com a maior concentração de NC (25 % (m/m)) demonstrou uma perda de peso inferior (67%), na mesma gama de temperaturas. Deste modo, estes resultados sugerem que os filmes de quitosano/NC apresentaram uma estabilidade térmica, globalmente, superior em relação aos filmes de controlo apenas de quitosano.

4.5.4 Ensaios mecânicos

Uma das funções dos filmes para aplicação cutânea é proteger a pele das agressões externas. Desta forma, estas estruturas devem manter a sua integridade física ao longo do tempo e exibir boas propriedades mecânicas. No entanto, o quitosano é reconhecido por exibir propriedades mecânicas pobres. Assim, a adição de um *nanofiller*, como a NC, na matriz polimérica, poderá funcionar como reforço mecânico e representar uma abordagem promissora para melhorar essas propriedades [169,199,200].

A fim de avaliar o efeito da incorporação da NC nas propriedades mecânicas dos filmes de quitosano, foram realizados ensaios de tração uniaxial. A tensão máxima (MPa), deformação à rotura (%) e o módulo de Young (MPa), apresentados na Figura 24, foram obtidos a partir das curvas tensão-deformação de cada filme.

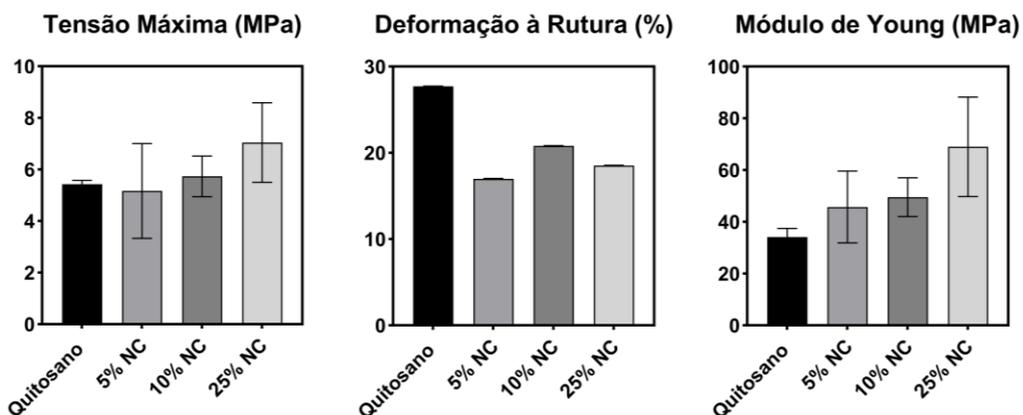


Figura 24: Tensão Máxima (MPa), Deformação à Rotura (%) e Módulo de Young (MPa), obtidos para os filmes de quitosano incorporando diferentes concentrações de NC extraída (0, 5, 10 e 25%).

Os filmes de quitosano sem NC apresentam uma resistência à tração de 5,43 MPa, uma deformação à rotura de 27,8% e um módulo de Young de 34,20 MPa. Com a incorporação da NC no filme, um aumento gradual da tensão máxima para 5,74 e 7,04 MPa foi observado, para as concentrações de NC mais elevadas, 10 e 25 % (m/m), respetivamente. Esta constatação confirmou que com a adição de NC, os filmes de quitosano tornaram-se mais fortes e resistentes, o que pode resultar da forte interação por ligações de hidrogénio entre os *nanofillers* e a matriz de quitosano. Isto deve-se ao facto de quando os *nanofillers* são incorporados nos filmes, tenderem a preencher os espaços livres entre as cadeias do polímero da matriz, aumentando a força de atração intermolecular [169,199]. Estes aumentos proporcionais da resistência à tração com a adição de maiores quantidades de NC nos filmes de quitosano já foi relatado por vários autores [122,198,201–203].

Relativamente à deformação à rotura, notou-se uma redução desta propriedade com a adição de NC. Este efeito indica que a adição de NC, apesar de ter preenchido espaços entre as cadeias e aumentar a resistência dos filmes, pode contribuir também para a interrupção das cadeias de quitosano, levando à redução da capacidade de deformação dos filmes produzidos [138,204].

O módulo de Young, ou módulo de elasticidade como é também designado, é um dos parâmetros mais importantes a avaliar. Este avalia a capacidade elástica do material, ou seja, a capacidade de um material voltar à sua dimensão inicial, após ser submetido a uma tensão. Uma melhoria do módulo de Young foi observado com a incorporação da NC. Os filmes de quitosano mostraram o módulo de Young de 34,14 MPa, que aumentou para 45,74, 49,66 e 69,02 MPa na presença de 5, 10, e 25 % (m/m) de NC, respetivamente. Este aumento pode ser atribuído à elasticidade do filme, melhorada pela

incorporação da NC, que pode ser relacionado com a sua estrutura cristalina. Resultados semelhantes foram descritos por estudos anteriores [122,195,201,205].

Globalmente, estes resultados mostram que a NC extraída atua como um agente de reforço nos filmes de quitosano, em semelhança ao já verificado na literatura, melhorando as suas propriedades mecânicas. Por fim, a concentração de 25 %(m/m) de NC extraída incorporada nos filmes foi a que obteve as melhores propriedades mecânicas globais.

4.6 Incorporação do extrato natural nos filmes nanocompósitos

A incorporação de agentes bioativos em filmes nanocompósitos pode conceder-lhes novas propriedades e, dessa forma, melhorar o seu desempenho biológico ao nível das atividades antimicrobianas e anti-inflamatórias. Estas propriedades são essenciais para prevenir e tratar infeções habitualmente presentes em problemas de pele. Além disso, a incorporação destes agentes em filmes permite uma entrega localizada e contínua dos mesmos, oferecendo uma eficiente via de administração [166,206]. Por sua vez, o extrato de folhas de *Ziziphus* ainda foi pouco estudado pela comunidade científica, mas existem já evidências de que possui propriedades antimicrobianas, muito interessantes para aplicações biomédicas [159–161].

Deste modo, estudou-se o extrato natural utilizado neste estudo, quanto à sua capacidade antibacteriana contra *S. aureus*, de modo a obter mais informações, como a MIC e/ou a MBC. Simultaneamente, com o objetivo de aprimorar as propriedades antibacterianas dos filmes, procedeu-se à incorporação do extrato natural de folhas de *Ziziphus* em diferentes concentrações (1, 3 e 5 mg/mL) nos filmes de quitosano para se avaliar a sua interação com este polímero. Posteriormente, o estudo da sua incorporação nos filmes de quitosano/NC foi iniciada. Utilizou-se para este estudo, o filme de quitosano com maior concentração de NC extraída (25 %), uma vez que demonstrou ter melhores propriedades térmicas e mecânicas e, por isso, ser o mais adequado para a aplicação final. Por fim, traçou-se o perfil de libertação do extrato, incorporado nos filmes desenvolvidos, quando em contacto com uma solução de PBS.

4.6.1 ATR-FTIR

Após se obter filmes estáveis de quitosano e extrato natural de folhas de *Ziziphus*, incorporado com a finalidade de melhorar as propriedades bioativas dos filmes, foi estudada a sua estrutura química por ATR-FTIR. Utilizando o ATR-FTIR, foram identificados e registados os grupos funcionais do extrato de

folhas de *Ziziphus*, assim como as modificações na estrutura química dos filmes aquando da sua incorporação, Figura 25.

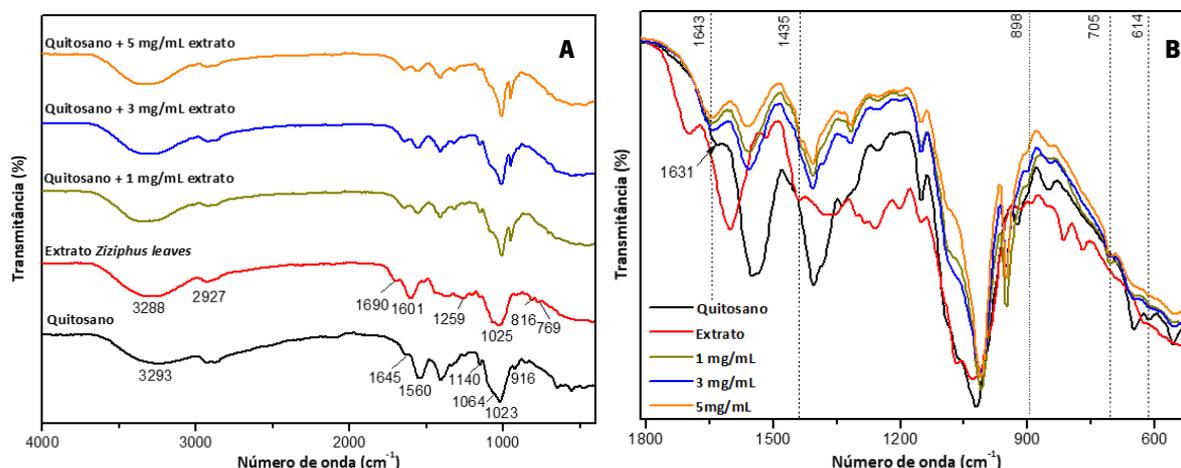


Figura 25: Espectros de ATR-FTIR: **A)** do extrato natural de folhas de *Ziziphus* e dos filmes quitosano com extrato (0, 1, 3 e 5 mg/mL) e **B)** espectros sobrepostos dos mesmos.

O espectro do filme de quitosano mostrou os picos característicos da região sacarídea de 1140 a 916 cm^{-1} , onde a banda mais intensa a 1023 cm^{-1} indica a vibração de estiramento da ligação C-O [183,192]. As principais bandas características deste biopolímero, a 1645 cm^{-1} e 1560 cm^{-1} devem-se ao estiramento de C=O (amida I) e à torção da ligação NH (amida II), respetivamente [183,191].

Relativamente ao espectro do extrato natural em estudo, retirado de folhas de *Ziziphus*, foi possível observar-se um pico intenso a 3288 cm^{-1} , típico de compostos fenólicos, que é atribuído às vibrações de estiramento do grupo OH. O pico a 2927 cm^{-1} deve-se ao estiramento da ligação C-H, normalmente presente em grupos aromáticos de alguns extratos de plantas, podendo indicar também a presença de alcanos ou ácidos carboxílicos [207–209]. Os picos a 1694 e 1601 cm^{-1} estão relacionados com o estiramento do anel aromático, sendo o primeiro pico atribuído aos grupos carboxilo do mesmo, e o pico 1435 cm^{-1} deve-se à vibração da ligação N-H das aminas secundárias [207,208]. Por último, os picos a 1259 e 1025 cm^{-1} estão relacionados com as vibrações de estiramento C-O dos ésters, éters ou hidroxilos fenólicos [210].

Com a incorporação do extrato natural no filme de quitosano, o pico relativo ao estiramento de C=O (amida I) a 1631 cm^{-1} sofreu um deslocamento para 1643 cm^{-1} , como assinalado na Figura 25B, o que poderá estar relacionado com ligações estabelecidas entre o extrato e a matriz polimérica. O aparecimento de novos picos específicos do extrato nos filmes, a 1435, 898 e 705 cm^{-1} , assim como a atenuação da banda a 614 cm^{-1} , comprovam a eficiente incorporação do extrato de *Ziziphus*. Além disso,

a intensidade da banda em torno dos $3300 - 3200 \text{ cm}^{-1}$ foi mais pronunciada nos filmes com extrato, o que pode indicar o estabelecimento de ligações de hidrogénio entre os grupos hidroxilo do extrato e aminas do quitosano (comprimento de onda menor) ou grupos hidroxilos livres (comprimento de onda superior), conseqüentes da incorporação do extrato rico em fenóis no filme [211]. Estas alterações nos espectros, induzidas pela presença do extrato natural nos filmes, comprovam a boa incorporação do extrato de *Ziziphus* nos mesmos.

4.6.2 GSDR

Através da aplicação da teoria de Kubelka-Munk é possível obter o espectro da função de remissão, podendo analisar os valores de absorvância dos filmes de quitosano e quitosano funcionalizado com extrato natural em diferentes concentrações (1, 3 e 5 mg/mL).

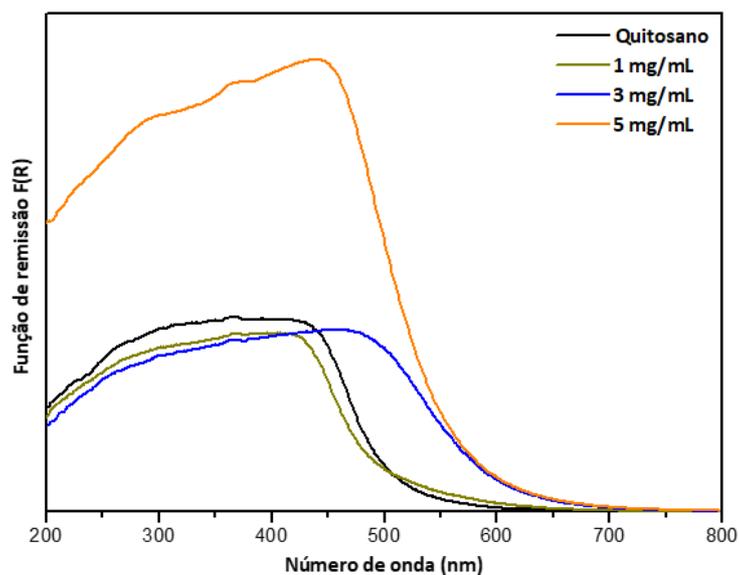


Figura 26: Espectro GSDR do filme de quitosano não funcionalizado e dos filmes funcionalizados com extrato natural de folhas de *Ziziphus* em diferentes concentrações (1, 3 e 5 mg/mL).

Ao analisar para os espectros GSDR dos filmes de quitosano (Figura 26), é possível verificar que com a adição de extrato natural a absorvância aumentou, quando comparado com a do filme de quitosano não funcionalizado. Este fenómeno está relacionado com o facto de o extrato natural fornecer uma coloração mais escura aos filmes, possível de se visualizar a olho nu, como se pode constatar pela observação da Figura 27. De facto, com o aumento de concentração de extrato, a amostra fica com uma coloração progressivamente mais escura, havendo uma maior absorção da radiação e,

consequentemente, uma menor refletância. Assim, apesar de não se observar nenhuma banda de absorção característica do extrato incorporado nos filmes, o aumento da intensidade de absorção dos mesmos, aliado à caracterização por ATR-FTIR, pode comprovar a boa funcionalização dos filmes com o extrato das folhas de *Ziziphus*.

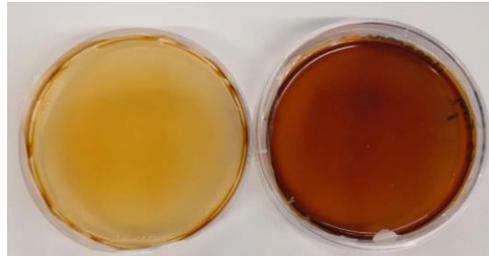


Figura 27: Filmes de quitosano sem extrato (esquerda) e funcionalizado com extrato (direita).

4.6.3 Atividade antibacteriana do extrato natural

Os filmes utilizados para aplicação cutânea devem exibir um excelente efeito antibacteriano de forma a prevenir e tratar infecções recorrentes em patologias da pele e, deste modo, acelerar o processo de cicatrização da mesma. Desta forma, para a avaliar a potencialidade antibacteriana do extrato natural das folhas de *Ziziphus*, primeiramente, procedeu-se à obtenção da concentração mínima inibitória (MIC).

Para este estudo utilizou-se a bactéria gram-positiva *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), uma vez que esta é responsável pela grande maioria das infecções de pele, não só infecções superficiais, como impetigo, mas também infecções mais invasivas como foliculite, abscessos subcutâneos, úlceras e feridas infetadas [212,213]. Todavia, a determinação da MIC foi dificultada pela alteração da cor do extrato durante as 24 h de teste, como se mostra na Figura 28, onde se verifica a intensificação das colorações das soluções nos poços, que impediu, assim, a fiabilidade da medição no espectrofotómetro.



Figura 28: Placa de poços para determinação da MIC, após 24 h.

A determinação da concentração bactericida mínima (MBC) do extrato natural de *Ziziphus* foi determinada a 1,25 mg/mL contra a *S. aureus*. Como se pode verificar na Figura 29, das quatro concentrações plaqueadas (0,625; 0,75; 1,25 e 1,5 mg/mL), ocorreu formação de colónias de bactérias nas placas cuja concentração de extrato era de 0,65 e 0,75 mg/mL, enquanto as placas correspondentes à concentração de extrato de 1,25 e 1,5 mg/mL não registaram qualquer crescimento de *S.aureus*, ficando assim estabelecida a menor concentração como a MBC.

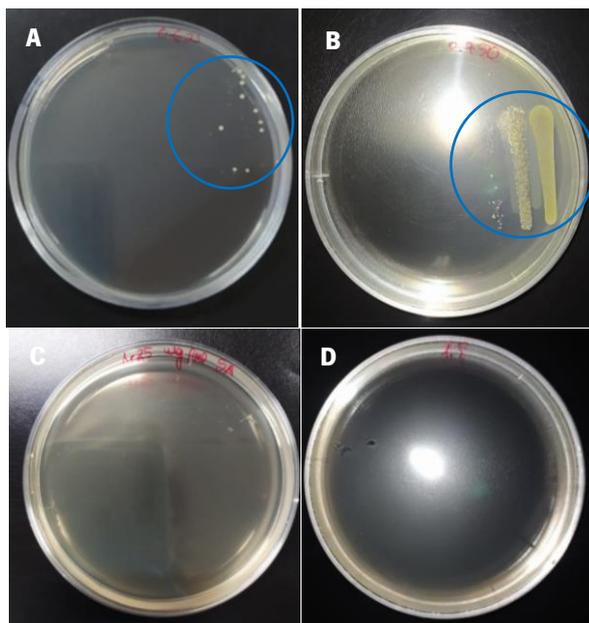


Figura 29: Placas plaqueadas com as diferentes concentrações de extrato de folhas de *Ziziphus* **A)** 0,625 mg/mL, **B)** 0,75 mg/mL, **C)** 1,25 mg/mL e **D)** 1,5 mg/mL.

Assim, este efeito bactericida do extrato proveniente das folhas de *Ziziphus* vai de encontro ao já comprovado no estudo de Yahia *et al.*, onde os testes antimicrobianos com 10 mg/mL de extrato de folhas de duas plantas do género *Ziziphus* exibiram atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas (*S. aureus* e *L. monocytogenes*) e bactérias Gram-negativas (*S. typhimurium* e *E.coli*). Deste estudo resultou ainda que as inibições máximas observadas foram contra as bactérias *S.aureus* [159].

4.6.4 Ensaios de libertação do princípio ativo

A monitorização por espectroscopia de UV-Vis foi útil para a deteção da libertação do extrato dos filmes para o meio utilizado. Inicialmente, de modo a identificar as bandas de absorção características do extrato das folhas de *Ziziphus*, procedeu-se à análise de uma solução de extrato dissolvida em meio PBS (Figura 30). Posteriormente, com o objetivo de verificar a libertação do extrato natural de folhas de

Ziziphus dos filmes para a solução, os filmes quitosano + extrato e quitosano/25% NC + extrato foram imersos na solução de PBS, sob agitação contínua a 37 °C, com o intuito de mimetizar as condições da pele. O perfil de liberação dos filmes foi monitorizado por espectroscopia UV-Vis ao longo de 24 horas, tal como demonstrado na Figura 31.

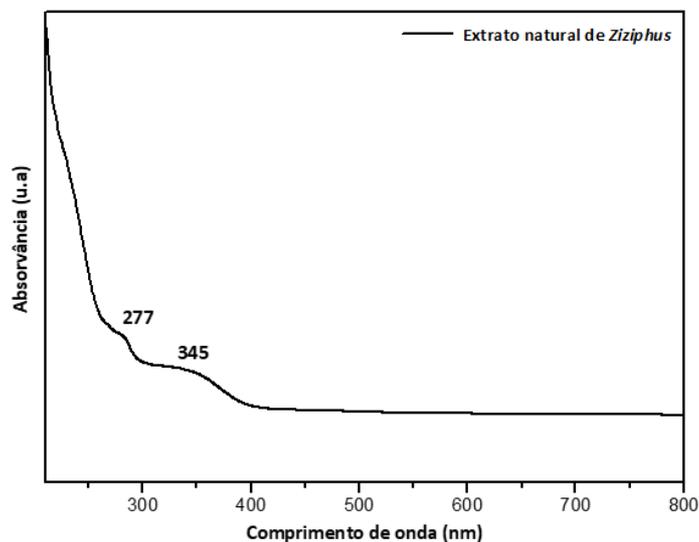


Figura 30: Espectro UV-Vis das bandas de absorção características do extrato natural de folhas de *Ziziphus*.

Os extratos naturais são habitualmente constituídos por alcaloides, taninos, saponinas, flavonoides, glicosídeos, óleos voláteis, entre outros [214]. Extratos do género *Ziziphus* são compostos por uma variedade de compostos funcionais, no entanto ressalta-se os compostos fenólicos como os polifenóis, alcaloides, flavonoides e taninos por estarem associados às suas propriedades antimicrobianas [159,161]. Segundo a literatura, a banda de absorção dos taninos localiza-se aos 280 nm, enquanto os flavonoides apresentam duas bandas características aos 240 - 285 nm e 300 - 385 nm [215,216]. Tendo por base a Figura 30, é possível verificar que o espectro de absorção de *Ziziphus* apresenta duas bandas a 345 e 277 nm, que podem corresponder aos seus constituintes flavonoides e taninos, respetivamente.

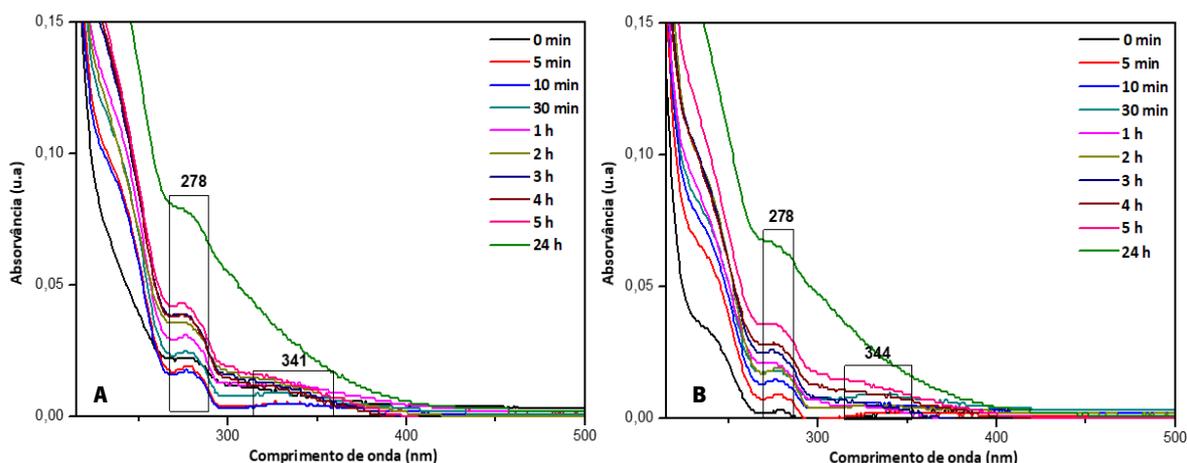


Figura 31: Espectros UV-vis do perfil de libertação do extrato *Ziziphus* presente nos filmes de **A)** quitosano e **B)** quitosano/25% NC.

Relativamente aos perfis de libertação do extrato de *Ziziphus* dos filmes para o meio de PBS (Figura 31), é possível observar o aparecimento imediato de bandas nos comprimentos de onda 343 e 278 nm. Ao longo do tempo, e até às 5 h de imersão de filme no meio, existe uma libertação gradual do extrato para o meio. À medida que o tempo avança, a intensidade das bandas de absorção monitorizadas aumenta, o que indica que a concentração do extrato em solução é superior e, conseqüentemente, comprova uma libertação gradual do mesmo. O espectro correspondente às 24 h apenas apresenta uma banda de absorção por volta dos 278 nm. Possivelmente, pode ter ocorrido alguma degradação do extrato natural que levou ao desaparecimento da banda a cerca de 341 nm e ao aparecimento de uma banda a menores comprimentos de onda correspondente a produtos de degradação. É de notar que ao longo das 24 horas estudadas, o filme não perdeu a sua integridade pois não se encontra nos espectros obtidos nenhuma banda correspondente ao quitosano. Deste modo, com estes ensaios de libertação preliminares, consegue-se comprovar a existência de uma libertação gradual do extrato ao longo do tempo, pelo menos até 5 h em contacto com o meio, não existindo diferenças significativas em relação à capacidade de entrega do princípio ativo entre os dois filmes.

5. CONCLUSÃO

Questões como a poluição ambiental e o desperdício de recursos podem ser minimizadas com a descoberta de formas eficientes de reciclar e reutilizar os resíduos provenientes da indústria têxtil. Estes resíduos, maioritariamente à base de algodão, possuem alto teor de celulose, cuja extração na sua forma nanométrica é fundamental para acrescentar valor a estes resíduos.

Neste trabalho, foram desenvolvidos filmes nanocompósitos à base de quitosano, reforçados com a NC extraída de resíduos têxteis industriais e funcionalizados com um extrato natural retirado das folhas de *Ziziphus*. A extração de NC a partir dos resíduos têxteis industriais foi conseguida através da otimização do método convencional de hidrólise, utilizando ácido sulfúrico, para concentrações de ácido mais compatíveis com o objetivo da sustentabilidade. Assim, parâmetros como o tipo de ácido, a concentração de ácido, temperatura de reação, tempo de reação e proporção quantidade de amostra/volume de solução, foram estudados, avaliados e otimizados. Métodos de extração de NC alternativos foram estudados, nomeadamente a utilização de ácidos sólidos, como o ácido maleico e o ácido cítrico, de fácil recuperação e possível reutilização, para a realização da hidrólise, bem como a aplicação de um método combinado. Como nenhum avanço adveio destes métodos de extração mais verdes, paralelamente, foi estudada a utilização de ácido sulfúrico para realização da hidrólise. Através da redução da concentração de ácido sulfúrico de 64 %(m/m) para 55 %(m/m), da temperatura de reação para 40 °C e da utilização de uma proporção de 0,6:20 (g/mL), obteve-se NC com um rendimento médio de extração de 66,5%. Todos os materiais obtidos foram devidamente caracterizados por diferentes técnicas. A observação por microscopia ótica e STEM revelou uma morfologia alongada e fina e diâmetros variáveis correspondentes tanto a CNC como a CNF, o que evidencia a obtenção de uma mistura de nanoceluloses. A caracterização por ATR-FTIR da NC extraída, em pó, demonstrou os picos característicos da celulose, não apresentando qualquer alteração na sua composição química após o processo de hidrólise, mas aumentando a sua cristalinidade em relação à amostra têxtil original. Os padrões de difração de XRD corroboraram os resultados de ATR-FTIR, obtendo-se um índice de cristalinidade de $83,4 \pm 0,86$ %, indicando a presença de uma significativa quantidade de CNC. Tanto os resultados obtidos por ATR-FTIR como por XRD, indicam que efetivamente o processo resultou. Por fim, os resultados de TGA confirmaram a pureza e boa estabilidade térmica da NC isolada da amostra têxtil.

Seguidamente, a incorporação da NC extraída em filmes à base de quitosano foi bem-sucedida, sendo que estes filmes foram estudados quanto à sua estabilidade térmica e propriedades mecânicas. O aparecimento de novas bandas relacionadas com a NC nos espectros de ATR-FTIR dos filmes, bem

como as mudanças de intensidade de outras bandas, confirmaram o sucesso da incorporação da NC na matriz de quitosano. Os resultados de TGA sugeriram que os filmes de quitosano/NC apresentam uma estabilidade térmica globalmente melhorada em relação aos filmes apenas de quitosano, sendo que o filme com 25% de NC registou a menor perda de massa de todas as amostras. Por fim, os ensaios de tração uniaxial mostraram que a NC extraída atua como um agente de reforço nos filmes de quitosano, melhorando ligeiramente as suas propriedades mecânicas, nomeadamente, aumentando o seu módulo de Young de 34,20 MPa para 69,02 MPa e a tensão máxima de 5,43 para 7,03 MPa na presença de 25% de NC. Exaltando, assim, que o maior reforço mecânico adveio da maior concentração de NC incorporada (25 % (m/m)) na matriz de quitosano.

Por último, o extrato natural de folhas de *Ziziphus*, foi incorporado nos filmes nanocompósitos para potenciar as propriedades antibacterianas do quitosano, demonstrando o seu poder bactericida a partir da concentração de 1,25 mg/mL. O estudo do perfil de libertação do extrato a partir dos filmes, comprovou uma libertação contínua e gradual por pelo menos 5 h e uma estabilidade dos filmes nanocompósitos imersos em meio básico por pelo menos 24 h.

Em jeito de conclusão, os resultados mostram-se promissores para atingir os objetivos propostos, comprovando-se que a NC pode, efetivamente, ser extraída de resíduos têxteis industriais e incorporada em nanocompósitos à base de quitosano, melhorando as suas propriedades térmicas e mecânicas. Assim, uma nova vida útil foi dada a resíduos têxteis cuja finalidade seria um aterro, obtendo-se filmes estáveis, flexíveis, com propriedades mecânicas e térmicas ligeiramente aprimoradas e facilmente funcionalizáveis para poderem serem aplicados em vários problemas de pele e combater possíveis infeções bacterianas.

6. TRABALHOS FUTUROS

Com o fim deste projeto de investigação compreende-se que existem, ainda, procedimentos a efetuar para que se encontrem reunidas todas as condições necessárias para a obtenção de um filme capaz de atuar como um penso ativo para prevenção e tratamento de patologias da pele. Tendo em conta que um dos requisitos essenciais de um penso são as propriedades de barreira, seria importante efetuar ensaios de permeabilidade ao oxigénio e ao vapor de água. Adicionalmente, seria necessário o estudo aprofundado das propriedades do extrato de *Ziziphus*, além do seu efeito bactericida comprovado neste trabalho, também os seus possíveis efeitos antifúngico ou anti-inflamatório poderiam ser avaliados, bem como as propriedades bioativas dos filmes funcionalizados com o mesmo. Estes últimos ensaios foram iniciados, mas os resultados não foram replicáveis, sendo necessária a sua repetição. Também os ensaios de libertação efetuados, foram muito preliminares, sendo necessário perceber como o filme e o extrato se comportariam num maior tempo de exposição a meios que mimetizem diferentes problemas de pele. Além disso, o estudo da citocompatibilidade e citotoxicidade dos filmes são de extrema importância, uma vez que avaliam a biocompatibilidade do material. Estudar o seu comportamento em contacto com a pele é vital para a aplicação pretendida.

No prisma da sustentabilidade, apesar dos esforços feitos para explorar formas alternativas de extrair NC dos resíduos têxteis, é ainda necessário desenvolver uma extração com menor impacto ambiental. Em relação a este tópico, temos evidências que conseguiremos diminuir significativamente a concentração de ácido utilizada, o tempo de reação e a temperatura se utilizarmos previamente um processo mecânico de moagem da amostra. Para além disso, através de alguns estudos preliminares, será possível obter melhores resultados com os ácidos sólidos se utilizarmos reatores apropriados para o efeito.

REFERÊNCIAS

- [1] S. Yu, J. Sun, Y. Shi, Q. Wang, J. Wu, J. Liu, Nanocellulose from various biomass wastes: Its preparation and potential usages towards the high value-added products, *Environmental Science and Ecotechnology*. 5 (2021) 100077. <https://doi.org/10.1016/J.ESE.2020.100077>.
- [2] K. Shirvanimoghaddam, B. Motamed, S. Ramakrishna, M. Naebe, Death by waste: Fashion and textile circular economy case, *Science of the Total Environment*. 718 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137317>.
- [3] Z. Wang, Z.J. Yao, J. Zhou, Y. Zhang, Reuse of waste cotton cloth for the extraction of cellulose nanocrystals, *Carbohydr Polym*. 157 (2017). <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.10.044>.
- [4] Latest trend keeps clothes out of landfill | Research and Innovation, (n.d.). <https://ec.europa.eu/research-and-innovation/en/horizon-magazine/latest-trend-keeps-clothes-out-landfill> (accessed September 26, 2022).
- [5] Less is more Resource efficiency through waste collection, recycling and reuse of aluminium, cotton and lithium in Europe, n.d.
- [6] Dr.S. Herrmann, A new textiles economy: Redesigning fashion's future, Ellen MacArthur Foundation. (2017).
- [7] Textile Exchange, Preferred Fiber & Materials. Market Report 2021, 2021. https://textileexchange.org/wp-content/uploads/2021/08/Textile-Exchange_Preferred-Fiber-and-Materials-Market-Report_2021.pdf (accessed June 28, 2022).
- [8] T. Zhong, R. Dhandapani, D. Liang, J. Wang, M.P. Wolcott, D. van Fossen, H. Liu, Nanocellulose from recycled indigo-dyed denim fabric and its application in composite films, *Carbohydr Polym*. 240 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116283>.
- [9] S. Huang, R. Tao, A. Ismail, Y. Wang, Cellulose nanocrystals derived from textile waste through acid hydrolysis and oxidation as reinforcing agent of soy protein film, *Polymers (Basel)*. 12 (2020). <https://doi.org/10.3390/POLYM12040958>.
- [10] M.X. Ruiz-Caldas, J. Carlsson, I. Sadiqtsis, A. Jaworski, U. Nilsson, A.P. Mathew, Cellulose Nanocrystals from Postconsumer Cotton and Blended Fabrics: A Study on Their Properties, Chemical Composition, and Process Efficiency, *ACS Sustain Chem Eng*. 10 (2022). <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.2c00797>.

- [11] L. v. Haule, C.M. Carr, M. Rigout, Preparation and physical properties of regenerated cellulose fibres from cotton waste garments, *J Clean Prod.* 112 (2016) 4445–4451. <https://doi.org/10.1016/J.JCLEPRO.2015.08.086>.
- [12] W. Shuhua, Y. Xiaoying, C. Xiaogang, H. Wensheng, N. Mei, Recycling of Cotton Fibers Separated from the Waste Blend Fabric, *Journal of Natural Fibers.* 17 (2020). <https://doi.org/10.1080/15440478.2018.1503130>.
- [13] J.P.S. Morais, M.D.F. Rosa, M.D.S.M. de Souza Filho, L.D. Nascimento, D.M. do Nascimento, A.R. Cassales, Extraction and characterization of nanocellulose structures from raw cotton linter, *Carbohydr Polym.* 91 (2013). <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.08.010>.
- [14] F. Hemmati, S.M. Jafari, R.A. Taheri, Optimization of homogenization-sonication technique for the production of cellulose nanocrystals from cotton linter, *Int J Biol Macromol.* 137 (2019). <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.06.241>.
- [15] M.M.Á.D. Maciel, K.C.C. de C. Benini, H.J.C. Voorwald, M.O.H. Cioffi, Obtainment and characterization of nanocellulose from an unwoven industrial textile cotton waste: Effect of acid hydrolysis conditions, *Int J Biol Macromol.* 126 (2019). <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.12.202>.
- [16] Z. Wang, Z. Yao, J. Zhou, M. He, Q. Jiang, A. Li, S. Li, M. Liu, S. Luo, D. Zhang, Improvement of polylactic acid film properties through the addition of cellulose nanocrystals isolated from waste cotton cloth, *Int J Biol Macromol.* 129 (2019). <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.02.021>.
- [17] P. Phanthong, G. Guan, Y. Ma, X. Hao, A. Abudula, Effect of ball milling on the production of nanocellulose using mild acid hydrolysis method, *J Taiwan Inst Chem Eng.* 60 (2016) 617–622. <https://doi.org/10.1016/J.JTICE.2015.11.001>.
- [18] H. Kargarzadeh, M. Mariano, D. Gopakumar, I. Ahmad, S. Thomas, A. Dufresne, J. Huang, N. Lin, Advances in cellulose nanomaterials, *Cellulose.* 25 (2018). <https://doi.org/10.1007/s10570-018-1723-5>.
- [19] R.K. Mishra, A. Sabu, S.K. Tiwari, Materials chemistry and the futurist eco-friendly applications of nanocellulose: Status and prospect, *Journal of Saudi Chemical Society.* 22 (2018). <https://doi.org/10.1016/j.jscs.2018.02.005>.
- [20] S. Gopi, P. Balakrishnan, D. Chandradhara, D. Poovathankandy, S. Thomas, General scenarios of cellulose and its use in the biomedical field, *Mater Today Chem.* 13 (2019). <https://doi.org/10.1016/j.mtchem.2019.04.012>.

- [21] S. Fahimirad, F. Ajalloueiian, Naturally-derived electrospun wound dressings for target delivery of bio-active agents, *Int J Pharm.* 566 (2019). <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.05.053>.
- [22] B. Joseph, V.K. Sagarika, C. Sabu, N. Kalarikkal, S. Thomas, Cellulose nanocomposites: Fabrication and biomedical applications, *Journal of Bioresources and Bioproducts.* 5 (2020) 223–237. <https://doi.org/10.1016/J.JOBAB.2020.10.001>.
- [23] O. Nechyporchuk, M.N. Belgacem, J. Bras, Production of cellulose nanofibrils: A review of recent advances, *Ind Crops Prod.* 93 (2016) 2–25. <https://doi.org/10.1016/J.INDCROP.2016.02.016>.
- [24] S. Gopi, P. Balakrishnan, D. Chandradhara, D. Poovathankandy, S. Thomas, General scenarios of cellulose and its use in the biomedical field, *Mater Today Chem.* 13 (2019) 59–78. <https://doi.org/10.1016/J.MTCHEM.2019.04.012>.
- [25] M.I.H. Mondal, *Cellulose and cellulose derivatives: Synthesis, modification and applications*, 2015.
- [26] P. Phanthong, P. Reubroycharoen, X. Hao, G. Xu, A. Abudula, G. Guan, Nanocellulose: Extraction and application, *Carbon Resources Conversion.* 1 (2018). <https://doi.org/10.1016/j.crcon.2018.05.004>.
- [27] R.J. Moon, A. Martini, J. Nairn, J. Simonsen, J. Youngblood, Cellulose nanomaterials review: Structure, properties and nanocomposites, *Chem Soc Rev.* 40 (2011). <https://doi.org/10.1039/c0cs00108b>.
- [28] A. Dufresne, CHAPTER 1. Nanocellulose: Potential Reinforcement in Composites, in: 2012. <https://doi.org/10.1039/9781849735315-00001>.
- [29] I.E. Carlström, A. Rashad, E. Campodoni, M. Sandri, K. Syverud, A.I. Bolstad, K. Mustafa, Cross-linked gelatin-nanocellulose scaffolds for bone tissue engineering, *Mater Lett.* 264 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2020.127326>.
- [30] M.A. Teixeira, J.C. Antunes, C.L. Seabra, A. Fertuzinhos, S.D. Tohidi, S. Reis, M.T.P. Amorim, D.P. Ferreira, H.P. Felgueiras, Antibacterial and hemostatic capacities of cellulose nanocrystalline-reinforced poly(vinyl alcohol) electrospun mats doped with Tiger 17 and pexiganan peptides for prospective wound healing applications, *Biomaterials Advances.* 137 (2022) 212830. <https://doi.org/10.1016/J.BIOADV.2022.212830>.
- [31] M.A. Teixeira, M.C. Paiva, M.T.P. Amorim, H.P. Felgueiras, Electrospun nanocomposites containing cellulose and its derivatives modified with specialized biomolecules for an enhanced wound healing, *Nanomaterials.* 10 (2020). <https://doi.org/10.3390/nano10030557>.

- [32] M. Nasir, R. Hashim, O. Sulaiman, M. Asim, Nanocellulose: Preparation methods and applications, *Cellulose-Reinforced Nanofibre Composites: Production, Properties and Applications*. (2017) 261–276. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100957-4.00011-5>.
- [33] P. Phanthong, P. Reubroycharoen, X. Hao, G. Xu, A. Abudula, G. Guan, Nanocellulose: Extraction and application, *Carbon Resources Conversion*. 1 (2018) 32–43. <https://doi.org/10.1016/J.CRCON.2018.05.004>.
- [34] N. Raghav, M.R. Sharma, J.F. Kennedy, Nanocellulose: A mini-review on types and use in drug delivery systems, *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications*. 2 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.carpta.2020.100031>.
- [35] J. Guo, D. Liu, I. Filpponen, L.S. Johansson, J.M. Malho, S. Quraishi, F. Liebner, H.A. Santos, O.J. Rojas, Photoluminescent Hybrids of Cellulose Nanocrystals and Carbon Quantum Dots as Cytocompatible Probes for in Vitro Bioimaging, *Biomacromolecules*. 18 (2017). <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.7b00306>.
- [36] Kusmono, R.F. Listyanda, M.W. Wildan, M.N. Ilman, Preparation and characterization of cellulose nanocrystal extracted from ramie fibers by sulfuric acid hydrolysis, *Heliyon*. 6 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e05486>.
- [37] N. Lin, J. Huang, A. Dufresne, Preparation, properties and applications of polysaccharide nanocrystals in advanced functional nanomaterials: A review, *Nanoscale*. 4 (2012). <https://doi.org/10.1039/c2nr30260h>.
- [38] N. Lin, A. Dufresne, Nanocellulose in biomedicine: Current status and future prospect, *Eur Polym J*. 59 (2014). <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2014.07.025>.
- [39] A. Dufresne, Nanocellulose: a new ageless bionanomaterial, *Materials Today*. 16 (2013) 220–227. <https://doi.org/10.1016/J.MATTOD.2013.06.004>.
- [40] Y. Xue, Z. Mou, H. Xiao, Nanocellulose as a sustainable biomass material: Structure, properties, present status and future prospects in biomedical applications, *Nanoscale*. 9 (2017). <https://doi.org/10.1039/c7nr04994c>.
- [41] S.S. Ahankari, A.R. Subhedar, S.S. Bhadauria, A. Dufresne, Nanocellulose in food packaging: A review, *Carbohydr Polym*. 255 (2021) 117479. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2020.117479>.
- [42] S. Ventura-Cruz, A. Tecante, Nanocellulose and microcrystalline cellulose from agricultural waste: Review on isolation and application as reinforcement in polymeric matrices, *Food Hydrocoll*. 118 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.106771>.

- [43] D. Klemm, F. Kramer, S. Moritz, T. Lindström, M. Ankerfors, D. Gray, A. Dorris, Nanocelluloses: A new family of nature-based materials, *Angewandte Chemie - International Edition*. 50 (2011). <https://doi.org/10.1002/anie.201001273>.
- [44] S.S. Ahankari, A.R. Subhedar, S.S. Bhadauria, A. Dufresne, Nanocellulose in food packaging: A review, *Carbohydr Polym.* 255 (2021) 117479. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2020.117479>.
- [45] C. Felgueiras, N.G. Azoia, C. Gonçalves, M. Gama, F. Dourado, Trends on the Cellulose-Based Textiles: Raw Materials and Technologies, *Front Bioeng Biotechnol.* 9 (2021). <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.608826>.
- [46] R.S.A. Ribeiro, B.C. Pohlmann, V. Calado, N. Bojorge, N. Pereira, Production of nanocellulose by enzymatic hydrolysis: Trends and challenges, *Eng Life Sci.* 19 (2019) 279–291. <https://doi.org/10.1002/elsc.201800158>.
- [47] S. Wang, J. Sun, Y. Jia, L. Yang, N. Wang, Y. Xianyu, W. Chen, X. Li, R. Cha, X. Jiang, Nanocrystalline Cellulose-Assisted Generation of Silver Nanoparticles for Nonenzymatic Glucose Detection and Antibacterial Agent, *Biomacromolecules.* 17 (2016). <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.6b00642>.
- [48] N. Grishkewich, N. Mohammed, J. Tang, K.C. Tam, Recent advances in the application of cellulose nanocrystals, *Curr Opin Colloid Interface Sci.* 29 (2017). <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2017.01.005>.
- [49] M. Ul-Islam, M.W. Ullah, S. Khan, J.K. Park, Production of bacterial cellulose from alternative cheap and waste resources: A step for cost reduction with positive environmental aspects, *Korean Journal of Chemical Engineering.* 37 (2020). <https://doi.org/10.1007/s11814-020-0524-3>.
- [50] C. Zhong, Industrial-Scale Production and Applications of Bacterial Cellulose, *Front Bioeng Biotechnol.* 8 (2020). <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.605374>.
- [51] M. Roy, P. Sen, P. Pal, An integrated green management model to improve environmental performance of textile industry towards sustainability, *J Clean Prod.* 271 (2020) 122656. <https://doi.org/10.1016/J.JCLEPRO.2020.122656>.
- [52] K. Farhana, K. Kadirgama, A.S.F. Mahamude, M.T. Mica, Energy consumption, environmental impact, and implementation of renewable energy resources in global textile industries: an overview towards circularity and sustainability, *Materials Circular Economy.* 4 (2022). <https://doi.org/10.1007/s42824-022-00059-1>.

- [53] J.P. Juanga-Labayen, I. v. Labayen, Q. Yuan, A Review on Textile Recycling Practices and Challenges, *Textiles*. 2 (2022). <https://doi.org/10.3390/textiles2010010>.
- [54] S. Madhav, A. Ahamad, P. Singh, P.K. Mishra, A review of textile industry: Wet processing, environmental impacts, and effluent treatment methods, *Environmental Quality Management*. 27 (2018). <https://doi.org/10.1002/tqem.21538>.
- [55] T. Vadicherla, D. Saravanan, M. Muthu Ram, K. Suganya, Fashion Renovation via Upcycling, in: 2017. https://doi.org/10.1007/978-981-10-2146-6_1.
- [56] G. Sandin, G.M. Peters, Environmental impact of textile reuse and recycling – A review, *J Clean Prod*. 184 (2018). <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.02.266>.
- [57] S. Hertantyo, TEXTILE RECYCLING COMPANIES PUSHING FOR CIRCULARITY IN FASHION, (n.d.).
- [58] S. Rana, S. Pichandi, S. Parveen, R. Figueiro, Natural Plant Fibers: Production, Processing, Properties and Their Sustainability Parameters, in: 2014. https://doi.org/10.1007/978-981-287-065-0_1.
- [59] Z. Liu, X. Li, W. Xie, H. Deng, Extraction, isolation and characterization of nanocrystalline cellulose from industrial kelp (*Laminaria japonica*) waste, *Carbohydr Polym*. 173 (2017) 353–359. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2017.05.079>.
- [60] K. Niinimäki, G. Peters, H. Dahlbo, P. Perry, T. Rissanen, A. Gwilt, The environmental price of fast fashion, *Nat Rev Earth Environ*. 1 (2020). <https://doi.org/10.1038/s43017-020-0039-9>.
- [61] A. Garcia, A. Gandini, J. Labidi, N. Belgacem, J. Bras, Industrial and crop wastes: A new source for nanocellulose biorefinery, *Ind Crops Prod*. 93 (2016) 26–38. <https://doi.org/10.1016/J.INDCROP.2016.06.004>.
- [62] Y. Yue, C. Zhou, A.D. French, G. Xia, G. Han, Q. Wang, Q. Wu, Comparative properties of cellulose nano-crystals from native and mercerized cotton fibers, *Cellulose*. 19 (2012). <https://doi.org/10.1007/s10570-012-9714-4>.
- [63] S. Thambiraj, D. Ravi Shankaran, Preparation and physicochemical characterization of cellulose nanocrystals from industrial waste cotton, *Appl Surf Sci*. 412 (2017). <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2017.03.272>.
- [64] N. Pandi, S.H. Sonawane, K. Anand Kishore, Synthesis of cellulose nanocrystals (CNCs) from cotton using ultrasound-assisted acid hydrolysis, *Ultrason Sonochem*. 70 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2020.105353>.

- [65] S. Jiang, Z. Xia, A. Farooq, M. Zhang, M. Li, L. Liu, Efficient recovery of the dyed cotton–polyester fabric: cellulose nanocrystal extraction and its application in composite films, *Cellulose*. 28 (2021). <https://doi.org/10.1007/s10570-021-03738-5>.
- [66] R. Avagyan, G. Luongo, G. Thorsén, C. Östman, Benzothiazole, benzotriazole, and their derivatives in clothing textiles—a potential source of environmental pollutants and human exposure, *Environmental Science and Pollution Research*. 22 (2015). <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3691-0>.
- [67] G. Luongo, F. Iadaresta, E. Moccia, C. Östman, C. Crescenzi, Determination of aniline and quinoline compounds in textiles, *J Chromatogr A*. 1471 (2016). <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.09.068>.
- [68] H.P.S. Abdul Khalil, Y. Davoudpour, M.N. Islam, A. Mustapha, K. Sudesh, R. Dungani, M. Jawaid, Production and modification of nanofibrillated cellulose using various mechanical processes: A review, *Carbohydr Polym*. 99 (2014). <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.08.069>.
- [69] S.S. Hassan, G.A. Williams, A.K. Jaiswal, Emerging technologies for the pretreatment of lignocellulosic biomass, *Bioresour Technol*. 262 (2018). <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.04.099>.
- [70] H. Kargarzadeh, M. Ioelovich, I. Ahmad, S. Thomas, A. Dufresne, Methods for Extraction of Nanocellulose from Various Sources, in: *Handbook of Nanocellulose and Cellulose Nanocomposites*, 2017. <https://doi.org/10.1002/9783527689972.ch1>.
- [71] B.C. Saha, N. Qureshi, G.J. Kennedy, M.A. Cotta, Biological pretreatment of corn stover with white-rot fungus for improved enzymatic hydrolysis, *Int Biodeterior Biodegradation*. 109 (2016) 29–35. <https://doi.org/10.1016/J.IBIOD.2015.12.020>.
- [72] K. Karimi, M.J. Taherzadeh, A critical review of analytical methods in pretreatment of lignocelluloses: Composition, imaging, and crystallinity, *Bioresour Technol*. 200 (2016). <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.11.022>.
- [73] S. Mondal, Preparation, properties and applications of nanocellulosic materials, *Carbohydr Polym*. 163 (2017). <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.12.050>.
- [74] C.K. Weiss, A. Isogai, R. Konwarh, Nanocellulose: From Fundamentals to Advanced Applications, *Frontiers in Chemistry* | www.frontiersin.org. 1 (2020) 392. <https://doi.org/10.3389/fchem.2020.00392>.

- [75] S.H. Mohamed, M.S. Hossain, M.H.M. Kassim, M.I. Ahmad, F.M. Omar, V. Balakrishnan, M. Zulkifli, A.N.A. Yahaya, Recycling waste cotton cloths for the isolation of cellulose nanocrystals: A sustainable approach, *Polymers (Basel)*. 13 (2021). <https://doi.org/10.3390/polym13040626>.
- [76] J.H.O. do Nascimento, R.F. Luz, F.M.F. Galvão, J.D.D. Melo, F.R. Oliveira, R. Ladchumananandasivam, A. Zille, Extraction and Characterization of Cellulosic Nanowhisker Obtained from Discarded Cotton Fibers, in: *Mater Today Proc*, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2015.04.001>.
- [77] R.S.A. Ribeiro, B.C. Pohlmann, V. Calado, N. Bojorge, N. Pereira, Production of nanocellulose by enzymatic hydrolysis: Trends and challenges, *Eng Life Sci*. 19 (2019). <https://doi.org/10.1002/elsc.201800158>.
- [78] J. Gong, J. Li, J. Xu, Z. Xiang, L. Mo, Research on cellulose nanocrystals produced from cellulose sources with various polymorphs, *RSC Adv*. 7 (2017). <https://doi.org/10.1039/c7ra06222b>.
- [79] H.P.S. Abdul Khalil, Y. Davoudpour, M.N. Islam, A. Mustapha, K. Sudesh, R. Dungani, M. Jawaid, Production and modification of nanofibrillated cellulose using various mechanical processes: A review, *Carbohydr Polym.* 99 (2014) 649–665. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2013.08.069>.
- [80] A. Sharma, M. Thakur, M. Bhattacharya, T. Mandal, S. Goswami, Commercial application of cellulose nano-composites – A review, *Biotechnology Reports*. 21 (2019). <https://doi.org/10.1016/j.btre.2019.e00316>.
- [81] C. Wu, D.J. McClements, M. He, L. Zheng, T. Tian, F. Teng, Y. Li, Preparation and characterization of okara nanocellulose fabricated using sonication or high-pressure homogenization treatments, *Carbohydr Polym.* 255 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.117364>.
- [82] R.R. Ferreira, A.G. Souza, L.L. Nunes, N. Shahi, V.K. Rangari, D. dos S. Rosa, Use of ball mill to prepare nanocellulose from eucalyptus biomass: Challenges and process optimization by combined method, *Mater Today Commun.* 22 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.mtcomm.2019.100755>.
- [83] Y. Liu, H. Wang, G. Yu, Q. Yu, B. Li, X. Mu, A novel approach for the preparation of nanocrystalline cellulose by using phosphotungstic acid, *Carbohydr Polym.* 110 (2014). <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.04.040>.
- [84] S. Cui, S. Zhang, S. Ge, L. Xiong, Q. Sun, Green preparation and characterization of size-controlled nanocrystalline cellulose via ultrasonic-assisted enzymatic hydrolysis, *Ind Crops Prod*. 83 (2016). <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.01.019>.

- [85] F. Beltramino, M. Blanca Roncero, T. Vidal, C. Valls, A novel enzymatic approach to nanocrystalline cellulose preparation, *Carbohydr Polym.* 189 (2018). <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.02.015>.
- [86] N. Eslahi, F. Dadashian, N.H. Nejad, Optimization of enzymatic hydrolysis of wool fibers for nanoparticles production using response surface methodology, *Advanced Powder Technology.* 24 (2013). <https://doi.org/10.1016/j.appt.2012.09.004>.
- [87] D. Marbaniang, R.S. Dutta, N.R. Gogoi, S. Ray, B. Mazumder, Biopolymeric nanocrystals in drug delivery and biomedical applications, in: *Tailor-Made and Functionalized Biopolymer Systems*, 2021. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-821437-4.00013-x>.
- [88] F.T. Seta, X. An, L. Liu, H. Zhang, J. Yang, W. Zhang, S. Nie, S. Yao, H. Cao, Q. Xu, Y. Bu, H. Liu, Preparation and characterization of high yield cellulose nanocrystals (CNC) derived from ball mill pretreatment and maleic acid hydrolysis, *Carbohydr Polym.* 234 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.115942>.
- [89] M.M. Mahmud, A. Perveen, R.A. Jahan, M.A. Matin, S.Y. Wong, X. Li, M.T. Arafat, Preparation of different polymorphs of cellulose from different acid hydrolysis medium, *Int J Biol Macromol.* 130 (2019). <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.03.027>.
- [90] L. Brinchi, F. Cotana, E. Fortunati, J.M. Kenny, Production of nanocrystalline cellulose from lignocellulosic biomass: Technology and applications, *Carbohydr Polym.* 94 (2013). <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.01.033>.
- [91] P.D. Carà, M. Pagliaro, A. Elmekawy, D.R. Brown, P. Verschuren, N.R. Shiju, G. Rothenberg, Hemicellulose hydrolysis catalysed by solid acids, *Catal Sci Technol.* 3 (2013). <https://doi.org/10.1039/c3cy20838a>.
- [92] K. Song, Y. Ji, L. Wang, Y. Wei, Z. Yu, A green and environmental benign method to extract cellulose nanocrystal by ball mill assisted solid acid hydrolysis, *J Clean Prod.* 196 (2018). <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.06.128>.
- [93] F. Yeganeh, R. Behrooz, M. Rahimi, The effect of Sulfuric acid and Maleic acid on characteristics of nano-cellulose produced from waste office paper, *Int. J. Nano Dimens.* 8 (2017).
- [94] S. Mishra, P.S. Kharkar, A.M. Pethe, Biomass and waste materials as potential sources of nanocrystalline cellulose: Comparative review of preparation methods (2016 – Till date), *Carbohydr Polym.* 207 (2019). <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.12.004>.

- [95] Kusmono, M.N. Affan, Isolation and Characterization of Nanocrystalline Cellulose from Ramie Fibers via Phosphoric Acid Hydrolysis, *Journal of Natural Fibers*. (2020). <https://doi.org/10.1080/15440478.2020.1821292>.
- [96] N.T.U. Culsum, C. Melinda, I. Leman, A. Wibowo, Y.W. Budhi, Isolation and characterization of cellulose nanocrystals (CNCs) from industrial denim waste using ammonium persulfate, *Mater Today Commun*. 26 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.mtcomm.2020.101817>.
- [97] C. Ling, S. Shi, W. Hou, Z. Yan, Separation of waste polyester/cotton blended fabrics by phosphotungstic acid and preparation of terephthalic acid, *Polym Degrad Stab*. 161 (2019). <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2019.01.022>.
- [98] X.Q. Chen, G.X. Pang, W.H. Shen, X. Tong, M.Y. Jia, Preparation and characterization of the ribbon-like cellulose nanocrystals by the cellulase enzymolysis of cotton pulp fibers, *Carbohydr Polym*. 207 (2019). <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.12.042>.
- [99] H. Adeli, M.T. Khorasani, M. Parvazinia, Wound dressing based on electrospun PVA/chitosan/starch nanofibrous mats: Fabrication, antibacterial and cytocompatibility evaluation and in vitro healing assay, *Int J Biol Macromol*. 122 (2019). <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.10.115>.
- [100] Q. Hu, Y. Lu, Y. Luo, Recent advances in dextran-based drug delivery systems: From fabrication strategies to applications, *Carbohydr Polym*. 264 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.117999>.
- [101] Y. Zhao, Z. Li, S. Song, K. Yang, H. Liu, Z. Yang, J. Wang, B. Yang, Q. Lin, Skin-Inspired Antibacterial Conductive Hydrogels for Epidermal Sensors and Diabetic Foot Wound Dressings, *Adv Funct Mater*. 29 (2019). <https://doi.org/10.1002/adfm.201901474>.
- [102] L.E. Valencia-Gómez, S.A. Martel-Estrada, C. Vargas-Requena, J.L. Rivera-Armenta, N. Alba-Baena, C. Rodríguez-González, I. Olivas-Armendáriz, Chitosan/Mimosa tenuiflora films as potential cellular patch for skin regeneration, *Int J Biol Macromol*. 93 (2016). <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.09.083>.
- [103] R.S. Ambekar, B. Kandasubramanian, Advancements in nanofibers for wound dressing: A review, *Eur Polym J*. 117 (2019) 304–336. <https://doi.org/10.1016/J.EURPOLYMJ.2019.05.020>.
- [104] C. Weller, C. Weller, V. Team, Interactive dressings and their role in moist wound management, in: *Advanced Textiles for Wound Care*, 2019. <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-102192-7.00004-7>.

- [105] S. Saghazadeh, C. Rinoldi, M. Schot, S.S. Kashaf, F. Sharifi, E. Jalilian, K. Nuutila, G. Giatsidis, P. Mostafalu, H. Derakhshandeh, K. Yue, W. Swieszkowski, A. Memic, A. Tamayol, A. Khademhosseini, Drug delivery systems and materials for wound healing applications, *Adv Drug Deliv Rev.* 127 (2018). <https://doi.org/10.1016/j.addr.2018.04.008>.
- [106] E.M. Ahmed, Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review, *J Adv Res.* 6 (2015). <https://doi.org/10.1016/j.jare.2013.07.006>.
- [107] L.K. Kian, N. Saba, M. Jawaid, M.T.H. Sultan, A review on processing techniques of bast fibers nanocellulose and its polylactic acid (PLA) nanocomposites, *Int J Biol Macromol.* 121 (2019). <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.09.040>.
- [108] S. Mondal, Review on Nanocellulose Polymer Nanocomposites, *Polymer - Plastics Technology and Engineering.* 57 (2018). <https://doi.org/10.1080/03602559.2017.1381253>.
- [109] Y. Chu, Y. Sun, W. Wu, H. Xiao, Dispersion Properties of Nanocellulose: A Review, *Carbohydr Polym.* 250 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116892>.
- [110] K.Y. Perera, S. Jaiswal, A.K. Jaiswal, A review on nanomaterials and nanohybrids based bio-nanocomposites for food packaging, *Food Chem.* 376 (2022) 131912. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2021.131912>.
- [111] S. Karki, H. Kim, S.J. Na, D. Shin, K. Jo, J. Lee, Thin films as an emerging platform for drug delivery, *Asian J Pharm Sci.* 11 (2016). <https://doi.org/10.1016/j.ajps.2016.05.004>.
- [112] S. Verma, N. Kumar, P. Kumar Sharma, Buccal Film: An Advance Technology for Oral Drug Delivery, *Adv Biol Res (Rennes).* 8 (2014).
- [113] T. Huq, S. Salmieri, A. Khan, R.A. Khan, C. le Tien, B. Riedl, C. Fraschini, J. Bouchard, J. Uribe-Calderon, M.R. Kamal, M. Lacroix, Nanocrystalline cellulose (NCC) reinforced alginate based biodegradable nanocomposite film, *Carbohydr Polym.* 90 (2012). <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.07.065>.
- [114] L.S. Nair, C.T. Laurencin, Biodegradable polymers as biomaterials, *Progress in Polymer Science (Oxford).* 32 (2007). <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2007.05.017>.
- [115] I.M. Shamsuddin, S. N, A. M, A. MK, Biodegradable polymers for sustainable environmental and economic development, *MOJ Bioorganic & Organic Chemistry.* 2 (2018). <https://doi.org/10.15406/mojboc.2018.02.00080>.
- [116] G.D. Mogoşanu, A.M. Grumezescu, Natural and synthetic polymers for wounds and burns dressing, *Int J Pharm.* 463 (2014). <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.12.015>.

- [117] H. Rodríguez-Tobías, G. Morales, D. Grande, Comprehensive review on electrospinning techniques as versatile approaches toward antimicrobial biopolymeric composite fibers, *Materials Science and Engineering C*. 101 (2019). <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.03.099>.
- [118] S.K. Prajapati, A. Jain, A. Jain, S. Jain, Biodegradable polymers and constructs: A novel approach in drug delivery, *Eur Polym J*. 120 (2019). <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2019.08.018>.
- [119] M. İnal, G. Mülazımođlu, Production and characterization of bactericidal wound dressing material based on gelatin nanofiber, *Int J Biol Macromol*. 137 (2019). <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.06.119>.
- [120] S. Huang, X. Fu, Naturally derived materials-based cell and drug delivery systems in skin regeneration, *Journal of Controlled Release*. 142 (2010). <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2009.10.018>.
- [121] R. Ranjith, S. Balraj, J. Ganesh, M.C. John Milton, Therapeutic agents loaded chitosan-based nanofibrous mats as potential wound dressings: A review, *Mater Today Chem*. 12 (2019). <https://doi.org/10.1016/j.mtchem.2019.03.008>.
- [122] S.M. Costa, D.P. Ferreira, P. Teixeira, L.F. Ballesteros, J.A. Teixeira, R. Figueiro, Active natural-based films for food packaging applications: The combined effect of chitosan and nanocellulose, *Int J Biol Macromol*. 177 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.02.105>.
- [123] A.S. Ribeiro, S.M. Costa, D.P. Ferreira, R.C. Calhelha, L. Barros, D. Stojković, M. Soković, I.C.F.R. Ferreira, R. Figueiro, Chitosan/nanocellulose electrospun fibers with enhanced antibacterial and antifungal activity for wound dressing applications, *React Funct Polym*. 159 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2020.104808>.
- [124] D.P. Ferreira, D.S. Conceição, F. Fernandes, T. Sousa, R.C. Calhelha, I.C.F.R. Ferreira, P.F. Santos, L.F. Vieira Ferreira, Characterization of a Squaraine/Chitosan System for Photodynamic Therapy of Cancer, *Journal of Physical Chemistry B*. 120 (2016). <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.5b11604>.
- [125] R. Song, M. Murphy, C. Li, K. Ting, C. Soo, Z. Zheng, Current development of biodegradable polymeric materials for biomedical applications, *Drug Des Devel Ther*. 12 (2018). <https://doi.org/10.2147/DDDT.S165440>.
- [126] D.P. Ferreira, D.S. Conceição, R.C. Calhelha, T. Sousa, R. Socoteanu, I.C.F.R. Ferreira, L.F. Vieira Ferreira, Porphyrin dye into biopolymeric chitosan films for localized photodynamic therapy of cancer, *Carbohydr Polym*. 151 (2016) 160–171. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2016.05.060>.

- [127] M. Mujtaba, R.E. Morsi, G. Kerch, M.Z. Elsabee, M. Kaya, J. Labidi, K.M. Khawar, Current advancements in chitosan-based film production for food technology; A review, *Int J Biol Macromol.* 121 (2019) 889–904. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2018.10.109>.
- [128] R. Raftery, F.J. O'Brien, S.A. Cryan, Chitosan for gene delivery and orthopedic tissue engineering applications, *Molecules.* 18 (2013). <https://doi.org/10.3390/molecules18055611>.
- [129] K. de la Caba, P. Guerrero, T.S. Trung, M. Cruz-Romero, J.P. Kerry, J. Fluhr, M. Maurer, F. Kruijssen, A. Albalat, S. Bunting, S. Burt, D. Little, R. Newton, From seafood waste to active seafood packaging: An emerging opportunity of the circular economy, *J Clean Prod.* 208 (2019) 86–98. <https://doi.org/10.1016/J.JCLEPRO.2018.09.164>.
- [130] A. Khan, R.A. Khan, S. Salmieri, C. le Tien, B. Riedl, J. Bouchard, G. Chauve, V. Tan, M.R. Kamal, M. Lacroix, Mechanical and barrier properties of nanocrystalline cellulose reinforced chitosan based nanocomposite films, *Carbohydr Polym.* 90 (2012) 1601–1608. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2012.07.037>.
- [131] D. Dehnad, H. Mirzaei, Z. Emam-Djomeh, S.M. Jafari, S. Dadashi, Thermal and antimicrobial properties of chitosan–nanocellulose films for extending shelf life of ground meat, *Carbohydr Polym.* 109 (2014) 148–154. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2014.03.063>.
- [132] H. Mao, C. Wei, Y. Gong, S. Wang, W. Ding, Mechanical and water-resistant properties of eco-friendly chitosan membrane reinforced with cellulose nanocrystals, *Polymers (Basel).* 11 (2019). <https://doi.org/10.3390/polym11010166>.
- [133] M. Mujtaba, A.M. Salaberría, M.A. Andres, M. Kaya, A. Gunyakti, J. Labidi, Utilization of flax (*Linum usitatissimum*) cellulose nanocrystals as reinforcing material for chitosan films, *Int J Biol Macromol.* 104 (2017) 944–952. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2017.06.127>.
- [134] D. Dehnad, Z. Emam-Djomeh, H. Mirzaei, S.M. Jafari, S. Dadashi, Optimization of physical and mechanical properties for chitosan–nanocellulose biocomposites, *Carbohydr Polym.* 105 (2014) 222–228. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2014.01.094>.
- [135] H.P.S. Abdul Khalil, C.K. Saurabh, A.S. Adnan, M.R. Nurul Fazita, M.I. Syakir, Y. Davoudpour, M. Rafatullah, C.K. Abdullah, M.K.M. Haafiz, R. Dungani, A review on chitosan-cellulose blends and nanocellulose reinforced chitosan biocomposites: Properties and their applications, *Carbohydr Polym.* 150 (2016) 216–226. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2016.05.028>.
- [136] D.A. Marin-Silva, S. Rivero, A. Pinotti, Chitosan-based nanocomposite matrices: Development and characterization, *Int J Biol Macromol.* 123 (2019) 189–200. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2018.11.035>.

- [137] D. Dehnad, H. Mirzaei, Z. Emam-Djomeh, S.M. Jafari, S. Dadashi, Thermal and antimicrobial properties of chitosan–nanocellulose films for extending shelf life of ground meat, *Carbohydr Polym.* 109 (2014) 148–154. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2014.03.063>.
- [138] T. Wu, R. Farnood, K. O’Kelly, B. Chen, Mechanical behavior of transparent nanofibrillar cellulose–chitosan nanocomposite films in dry and wet conditions, *J Mech Behav Biomed Mater.* 32 (2014) 279–286. <https://doi.org/10.1016/J.JMBBM.2014.01.014>.
- [139] S. Rashki, N. Shakour, Z. Yousefi, M. Rezaei, M. Homayoonfal, E. Khabazian, F. Atyabi, F. Aslanbeigi, R. Safaei Lapavandani, S. Mazaheri, M.R. Hamblin, H. Mirzaei, Cellulose-Based Nanofibril Composite Materials as a New Approach to Fight Bacterial Infections, *Front Bioeng Biotechnol.* 9 (2021). <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.732461>.
- [140] C. Sharma, N.K. Bhardwaj, Fabrication of natural-origin antibacterial nanocellulose films using bio-extracts for potential use in biomedical industry, *Int J Biol Macromol.* 145 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.09.182>.
- [141] J. Wu, Y. Zheng, X. Wen, Q. Lin, X. Chen, Z. Wu, Silver nanoparticle/bacterial cellulose gel membranes for antibacterial wound dressing: Investigation in vitro and in vivo, *Biomedical Materials (Bristol).* 9 (2014). <https://doi.org/10.1088/1748-6041/9/3/035005>.
- [142] A.W. Jatoi, H. Ogasawara, I.S. Kim, Q.Q. Ni, Dopa-based facile procedure to synthesize AgNP/cellulose nanofiber composite for antibacterial applications, *Applied Nanoscience (Switzerland).* 9 (2019). <https://doi.org/10.1007/s13204-019-00952-3>.
- [143] J.U. Shin, J. Gwon, S.Y. Lee, H.S. Yoo, Silver-Incorporated Nanocellulose Fibers for Antibacterial Hydrogels, *ACS Omega.* 3 (2018). <https://doi.org/10.1021/acsomega.8b02180>.
- [144] F. Ostadhosseini, N. Mahmoudi, G. Morales-Cid, E. Tamjid, F.J. Navas-Martos, B. Soriano-Cuadrado, J.M.L. Paniza, A. Simchi, Development of chitosan/bacterial cellulose composite films containing nanodiamonds as a potential flexible platform for wound dressing, *Materials.* 8 (2015). <https://doi.org/10.3390/ma8095309>.
- [145] M.A. El-Samahy, S.A.A. Mohamed, M.H. Abdel Rehim, M.E. Mohram, Synthesis of hybrid paper sheets with enhanced air barrier and antimicrobial properties for food packaging, *Carbohydr Polym.* 168 (2017). <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.03.041>.
- [146] P. Zhang, L. Chen, Q. Zhang, F.F. Hong, Using in situ dynamic cultures to rapidly biofabricate fabric-reinforced composites of chitosan/bacterial nanocellulose for antibacterial wound dressings, *Front Microbiol.* 7 (2016). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00260>.

- [147] P. Campia, E. Ponzini, B. Rossi, S. Farris, T. Silveti, L. Merlini, M. Brasca, R. Grandori, Y.M. Galante, "Aerogels of enzymatically oxidized galactomannans from leguminous plants: Versatile delivery systems of antimicrobial peptides and enzymes," *Carbohydr Polym.* 158 (2017). <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.11.089>.
- [148] W. Shao, H. Liu, S. Wang, J. Wu, M. Huang, H. Min, X. Liu, Controlled release and antibacterial activity of tetracycline hydrochloride-loaded bacterial cellulose composite membranes, *Carbohydr Polym.* 145 (2016) 114–120. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2016.02.065>.
- [149] N.T. Laçin, Development of biodegradable antibacterial cellulose based hydrogel membranes for wound healing, *Int J Biol Macromol.* 67 (2014) 22–27. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2014.03.003>.
- [150] S. Saini, M.N. Belgacem, J. Bras, Effect of variable aminoalkyl chains on chemical grafting of cellulose nanofiber and their antimicrobial activity, *Materials Science and Engineering C.* 75 (2017). <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.02.062>.
- [151] L. Wang, C. Hu, L. Shao, The antimicrobial activity of nanoparticles: Present situation and prospects for the future, *Int J Nanomedicine.* 12 (2017). <https://doi.org/10.2147/IJN.S121956>.
- [152] N. Martins, L. Barros, C. Santos-Buelga, S. Silva, M. Henriques, I.C.F.R. Ferreira, Decoction, infusion and hydroalcoholic extract of cultivated thyme: Antioxidant and antibacterial activities, and phenolic characterisation, *Food Chem.* 167 (2015). <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.06.094>.
- [153] M.A. Shah, S.J.D. Bosco, S.A. Mir, Plant extracts as natural antioxidants in meat and meat products, *Meat Sci.* 98 (2014). <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2014.03.020>.
- [154] S. Ghayempour, M. Montazer, M. Mahmoudi Rad, Encapsulation of Aloe Vera extract into natural Tragacanth Gum as a novel green wound healing product, *Int J Biol Macromol.* 93 (2016). <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.08.076>.
- [155] F. Kurd, M. Fathi, H. Shekarchizadeh, Basil seed mucilage as a new source for electrospinning: Production and physicochemical characterization, *Int J Biol Macromol.* 95 (2017). <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.11.116>.
- [156] A. Oryan, E. Alemzadeh, A. Moshiri, Potential role of propolis in wound healing: Biological properties and therapeutic activities, *Biomedicine and Pharmacotherapy.* 98 (2018). <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.12.069>.

- [157] A.S. Ribeiro, S.M. Costa, D.P. Ferreira, H. Abidi, R. Fangueiro, Development of chitosan-gelatin nanofibers with cellulose nanocrystals for skin protection applications, in: *Key Eng Mater*, 2021. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/KEM.893.45>.
- [158] M. Sadri, S. Arab-Sorkhi, H. Vatani, A. Bagheri-Pebdeni, New wound dressing polymeric nanofiber containing green tea extract prepared by electrospinning method, *Fibers and Polymers*. 16 (2015). <https://doi.org/10.1007/s12221-015-5297-7>.
- [159] Y. Yahia, M.A. Benabderrahim, N. Tlili, M. Bagues, K. Nagaz, Bioactive compounds, antioxidant and antimicrobial activities of extracts from different plant parts of two *Ziziphus* Mill. species, *PLoS One*. 15 (2020). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0232599>.
- [160] E.M. Abdallah, E.R. Elsharkawy, A. Ed-dra, Biological activities of methanolic leaf extract of *Ziziphus mauritiana*, *Biosci Biotechnol Res Commun*. 9 (2016). <https://doi.org/10.21786/bbrc/9.4/6>.
- [161] K. Idris, N.N.M. Yusof, T.A.F. Tg Abdul Rahman, L.A. Adnan, A.A.N. Aziz, Analysis of Antimicrobial Compound in *Ziziphus Mauritiana* Extract using Attenuated Total Reflection-Fourier Transform Infrared (ATR-FTIR), *Malaysian Journal of Science Health & Technology*. (2021). <https://doi.org/10.33102/mjosht.v7i.104>.
- [162] M.J. Liu, C.Y. Cheng, A TAXONOMIC STUDY ON THE GENUS ZIZIPHUS, *Acta Hortic*. (1995). <https://doi.org/10.17660/actahortic.1995.390.23>.
- [163] K. Kubitzki, *The families and genera of vascular plants*, 2014. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-39417-1>.
- [164] P. Jain, A. Haque, T. Islam, M.A. Alam, H.M. Reza, Comparative evaluation of *Ziziphus mauritiana* leaf extracts for phenolic content, antioxidant and antibacterial activities, *J Herbs Spices Med Plants*. 25 (2019). <https://doi.org/10.1080/10496475.2019.1600627>.
- [165] M.E. Abalaka, S.Y. Daniyan, A. Mann, Evaluation of the antimicrobial activities of two *Ziziphus* species (*Ziziphus mauritiana* L. and *Ziziphus spinachristi* L.) on some microbial pathogens, *Afr J Pharm Pharmacol*. 4 (2010).
- [166] S.P. Miguel, D.R. Figueira, D. Simões, M.P. Ribeiro, P. Coutinho, P. Ferreira, I.J. Correia, Electrospun polymeric nanofibres as wound dressings: A review, *Colloids Surf B Biointerfaces*. 169 (2018). <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.05.011>.
- [167] J.I. Lozano-Navarro, N.P. Díaz-Zavala, C. Velasco-Santos, J.A. Melo-Banda, U. Páramo-García, F. Paraguay-Delgado, R. García-Alamilla, A.L. Martínez-Hernández, S. Zapién-Castillo, materials

- Chitosan-Starch Films with Natural Extracts: Physical, Chemical, Morphological and Thermal Properties, (n.d.). <https://doi.org/10.3390/ma11010120>.
- [168] A.S. Ferreira, C. Nunes, A. Castro, P. Ferreira, M.A. Coimbra, Influence of grape pomace extract incorporation on chitosan films properties, *Carbohydr Polym.* 113 (2014) 490–499. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2014.07.032>.
- [169] Y. Xu, S. Willis, K. Jordan, E. Sismour, Chitosan nanocomposite films incorporating cellulose nanocrystals and grape pomace extracts, *Packaging Technology and Science.* 31 (2018). <https://doi.org/10.1002/pts.2389>.
- [170] S.R. Kanatt, M.S. Rao, S.P. Chawla, A. Sharma, Active chitosan–polyvinyl alcohol films with natural extracts, *Food Hydrocoll.* 29 (2012) 290–297. <https://doi.org/10.1016/J.FOODHYD.2012.03.005>.
- [171] D. Altıok, E. Altıok, F. Tihminlioglu, Physical, antibacterial and antioxidant properties of chitosan films incorporated with thyme oil for potential wound healing applications, (n.d.). <https://doi.org/10.1007/s10856-010-4065-x>.
- [172] D. Soga, R.D. Paiva, M.H. Ueno-Guimarães, M. Muramatsu, Um microscópio caseiro simplificado, *Revista Brasileira de Ensino de Fisica.* 39 (2017). <https://doi.org/10.1590/1806-9126-RBEF-2017-0133>.
- [173] M. Carter, J.C. Shieh, *Guide to Research Techniques in Neuroscience*, 2010. <https://doi.org/10.1016/C2009-0-01891-1>.
- [174] T. Petit, L. Puskar, FTIR spectroscopy of nanodiamonds: Methods and interpretation, *Diam Relat Mater.* 89 (2018). <https://doi.org/10.1016/j.diamond.2018.08.005>.
- [175] A.A. Bunaciu, E. Aboul-enein, Hassan Y., Udristioiu, X-Ray Diffraction : Instrumentation and Applications *Critical Reviews in Analytical Chemistry* X-Ray Diffraction : Instrumentation and Applications, *Crit Rev Anal Chem.* 45 (2019).
- [176] L. Segal, J.J. Creely, A.E. Martin, C.M. Conrad, An Empirical Method for Estimating the Degree of Crystallinity of Native Cellulose Using the X-Ray Diffractometer, *Textile Research Journal.* 29 (1959). <https://doi.org/10.1177/004051755902901003>.
- [177] H.M. Ng, N.M. Saidi, F.S. Omar, K. Ramesh, S. Ramesh, S. Bashir, Thermogravimetric Analysis of Polymers, in: *Encyclopedia of Polymer Science and Technology*, 2018. <https://doi.org/10.1002/0471440264.pst667>.

- [178] C. Serra, J. Serra, I.L. Ferreira Machado, L.F. Vieira Ferreira, Spectroscopic Analysis of Parathyroid and Thyroid Tissues by Ground-State diffuse Reflectance and Laser Induced Luminescence: a Preliminary Report, *J Fluoresc.* 31 (2021). <https://doi.org/10.1007/s10895-021-02783-4>.
- [179] P. Krishnan, Evaluation and methods of interfacial properties in fiber-reinforced composites, *Mechanical and Physical Testing of Biocomposites, Fibre-Reinforced Composites and Hybrid Composites.* (2018) 343–385. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102292-4.00018-7>.
- [180] I. Wiegand, K. Hilpert, R.E.W. Hancock, Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances, *Nat Protoc.* 3 (2008). <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.521>.
- [181] M. Picollo, M. Aceto, T. Vitorino, UV-Vis spectroscopy, *Physical Sciences Reviews.* 4 (2019). <https://doi.org/10.1515/psr-2018-0008>.
- [182] H. Kargarzadeh, R.M. Sheltami, I. Ahmad, I. Abdullah, A. Dufresne, Cellulose nanocrystal: A promising toughening agent for unsaturated polyester nanocomposite, *Polymer (Guildf).* 56 (2015) 346–357. <https://doi.org/10.1016/J.POLYMER.2014.11.054>.
- [183] H. Celebi, A. Kurt, Effects of processing on the properties of chitosan/cellulose nanocrystal films, *Carbohydr Polym.* 133 (2015) 284–293. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2015.07.007>.
- [184] W.T. Wulandari, A. Rochliadi, I.M. Arcana, Nanocellulose prepared by acid hydrolysis of isolated cellulose from sugarcane bagasse, in: *IOP Conf Ser Mater Sci Eng*, 2016. <https://doi.org/10.1088/1757-899X/107/1/012045>.
- [185] A. Mandal, D. Chakrabarty, Isolation of nanocellulose from waste sugarcane bagasse (SCB) and its characterization, *Carbohydr Polym.* 86 (2011). <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.06.030>.
- [186] H. Ji, Z. Xiang, H. Qi, T. Han, A. Pranovich, T. Song, Strategy towards one-step preparation of carboxylic cellulose nanocrystals and nanofibrils with high yield, carboxylation and highly stable dispersibility using innocuous citric acid, *Green Chemistry.* 21 (2019). <https://doi.org/10.1039/c8gc03493a>.
- [187] R.T. O’connor, E.F. Dupré, D. Mitcham, Applications of Infrared Absorption Spectroscopy to Investigations of Cotton and Modified Cottons, <Http://Dx.Doi.Org/10.1177/004051755802800503>. 28 (2016) 382–392. <https://doi.org/10.1177/004051755802800503>.
- [188] C. Trilokesh, K.B. Uppuluri, Isolation and characterization of cellulose nanocrystals from jackfruit peel, *Sci Rep.* 9 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-53412-x>.

- [189] S. Bano, Y.S. Negi, Studies on cellulose nanocrystals isolated from groundnut shells, *Carbohydr Polym.* 157 (2017). <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.10.069>.
- [190] I. Måge, U. Böcker, S.G. Wubshet, D. Lindberg, N.K. Afseth, Fourier-transform infrared (FTIR) fingerprinting for quality assessment of protein hydrolysates, *LWT.* 152 (2021) 112339. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2021.112339>.
- [191] M. Salari, M. Sowti Khiabani, R. Rezaei Mokarram, B. Ghanbarzadeh, H. Samadi Kafil, Development and evaluation of chitosan based active nanocomposite films containing bacterial cellulose nanocrystals and silver nanoparticles, *Food Hydrocoll.* 84 (2018) 414–423. <https://doi.org/10.1016/J.FOODHYD.2018.05.037>.
- [192] D.P. Ferreira, D.S. Conceição, R.C. Calhelha, T. Sousa, R. Socoteanu, I.C.F.R. Ferreira, L.F. Vieira Ferreira, Porphyrin dye into biopolymeric chitosan films for localized photodynamic therapy of cancer, *Carbohydr Polym.* 151 (2016) 160–171. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2016.05.060>.
- [193] M. Mujtaba, A.M. Salaberria, M.A. Andres, M. Kaya, A. Gunyakti, J. Labidi, Utilization of flax (*Linum usitatissimum*) cellulose nanocrystals as reinforcing material for chitosan films, *Int J Biol Macromol.* 104 (2017) 944–952. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2017.06.127>.
- [194] Kusmono, M.W. Wildan, F.I. Lubis, Fabrication and characterization of chitosan/cellulose nanocrystal/glycerol bio-composite films, *Polymers (Basel).* 13 (2021). <https://doi.org/10.3390/polym13071096>.
- [195] M. Yadav, K. Behera, Y.H. Chang, F.C. Chiu, Cellulose Nanocrystal Reinforced Chitosan Based UV Barrier Composite Films for Sustainable Packaging, *Polymers* 2020, Vol. 12, Page 202. 12 (2020) 202. <https://doi.org/10.3390/POLYM12010202>.
- [196] A. Riaz, C. Lagnika, H. Luo, Z. Dai, M. Nie, M.M. Hashim, C. Liu, J. Song, D. Li, Chitosan-based biodegradable active food packaging film containing Chinese chive (*Allium tuberosum*) root extract for food application, *Int J Biol Macromol.* 150 (2020) 595–604. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2020.02.078>.
- [197] F.A. Corsello, P.A. Bolla, P.S. Anbinder, M.A. Serradell, J.I. Amalvy, P.J. Peruzzo, Morphology and properties of neutralized chitosan-cellulose nanocrystals biocomposite films, *Carbohydr Polym.* 156 (2017) 452–459. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2016.09.031>.
- [198] H. Mao, C. Wei, Y. Gong, S. Wang, W. Ding, Mechanical and Water-Resistant Properties of Eco-Friendly Chitosan Membrane Reinforced with Cellulose Nanocrystals, *Polymers* 2019, Vol. 11, Page 166. 11 (2019) 166. <https://doi.org/10.3390/POLYM11010166>.

- [199] E. Jamróz, P. Kulawik, P. Kopel, The Effect of Nanofillers on the Functional Properties of Biopolymer-Based Films: A Review, *Polymers* 2019, Vol. 11, Page 675. 11 (2019) 675. <https://doi.org/10.3390/POLYM11040675>.
- [200] Kusmono, M.W. Wildan, F.I. Lubis, Fabrication and Characterization of Chitosan/Cellulose Nanocrystal/Glycerol Bio-Composite Films, *Polymers* 2021, Vol. 13, Page 1096. 13 (2021) 1096. <https://doi.org/10.3390/POLYM13071096>.
- [201] M. Mujtaba, A.M. Salaberria, M.A. Andres, M. Kaya, A. Gunyakti, J. Labidi, Utilization of flax (*Linum usitatissimum*) cellulose nanocrystals as reinforcing material for chitosan films, *Int J Biol Macromol.* 104 (2017) 944–952. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2017.06.127>.
- [202] Y. Xu, S. Willis, K. Jordan, E. Sismour, Chitosan nanocomposite films incorporating cellulose nanocrystals and grape pomace extracts, *Packaging Technology and Science.* 31 (2018) 631–638. <https://doi.org/10.1002/PTS.2389>.
- [203] A. Khan, R.A. Khan, S. Salmieri, C. le Tien, B. Riedl, J. Bouchard, G. Chauve, V. Tan, M.R. Kamal, M. Lacroix, Mechanical and barrier properties of nanocrystalline cellulose reinforced chitosan based nanocomposite films, *Carbohydr Polym.* 90 (2012) 1601–1608. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2012.07.037>.
- [204] S. Choy, H. Moon, Y. Park, Y.M. Jung, J.M. Koo, D.X. Oh, D.S. Hwang, Mechanical properties and thermal stability of intermolecular-fitted poly(vinyl alcohol)/ α -chitin nanofibrous mat, *Carbohydr Polym.* 244 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116476>.
- [205] Y. Tang, X. Zhang, R. Zhao, D. Guo, J. Zhang, Preparation and properties of chitosan/guar gum/nanocrystalline cellulose nanocomposite films, *Carbohydr Polym.* 197 (2018) 128–136. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2018.05.073>.
- [206] I. Savencu, S. Iurian, A. Porfire, C. Bogdan, I. Tomuță, Review of advances in polymeric wound dressing films, *React Funct Polym.* 168 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2021.105059>.
- [207] S. Agatonovic-Kustrin, K.S. Balyklova, V. Gegechkori, D.W. Morton, M. Waksmundzka-Hajnos, M. Hawryl, E. Gikas, molecules HPTLC and ATR/FTIR Characterization of Antioxidants in Different Rosemary Extracts, (2021). <https://doi.org/10.3390/molecules26196064>.
- [208] View of Analysis of Antimicrobial Compound in *Ziziphus Mauritiana* Extract using Attenuated Total Reflection-Fourier Transform Infrared (ATR-FTIR), (n.d.). https://mjosht.usim.edu.my/index.php/mjosht/article/view/104/58?fbclid=IwAR2NR8AnoaX_COucOQhdQ7QCrhUfHZnyY4vBxS8wkWJKXCE-sovscZgPtOs (accessed October 5, 2022).

- [209] S. Sutariya, A. Ahmad Shah, A. Bajpai, R.J. Sharma, C.P. Pandhurnekar, A. Gupta, Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) analysis, antioxidant and anti-inflammatory activities of leaf and fruit extracts of *Gymnosporia montana*, *Mater Today Proc.* (2022). <https://doi.org/10.1016/J.MATPR.2022.09.462>.
- [210] I. Bykov, Characterization of Natural and Technical Lignins using FTIR Spectroscopy, *Construction.* (2008).
- [211] M.F.Z. Kadir, Z. Aspanut, S.R. Majid, A.K. Arof, FTIR studies of plasticized poly(vinyl alcohol)-chitosan blend doped with NH_4NO_3 polymer electrolyte membrane, *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* 78 (2011). <https://doi.org/10.1016/j.saa.2010.12.051>.
- [212] C.P. Parlet, M.M. Brown, A.R. Horswill, Commensal Staphylococci Influence *Staphylococcus aureus* Skin Colonization and Disease, *Trends Microbiol.* 27 (2019) 497–507. <https://doi.org/10.1016/J.TIM.2019.01.008>.
- [213] S. Krishna, L.S. Miller, Host–pathogen interactions between the skin and *Staphylococcus aureus*, *Curr Opin Microbiol.* 15 (2012) 28–35. <https://doi.org/10.1016/J.MIB.2011.11.003>.
- [214] I.Y. Suleiman, S.A. Yaro, M. Abdulwahab, S.A. Salihu, O.C. Ogheneme, Phytochemical and spectroanalytical characterizations of some plants extract as green corrosion inhibitors, *Journal of Materials and Environmental Science.* 8 (2017).
- [215] Y. Li, W. Liu, X. Zheng, Investigation into electrogenerated chemiluminescence behavior of Tris(bipyridine)ruthenium(II)/silica nanoparticles electrocatalyzed by $\text{Cu}(\text{tris}(\text{hydroxymethyl})\text{aminomethane})_2^{2+}$ complex, *Acta Chimi Sin.* 73 (2015). <https://doi.org/10.6023/A15010047>.
- [216] Z. Jurasekova, J. v. Garcia-Ramos, C. Domingo, S. Sanchez-Cortes, Surface-enhanced Raman scattering of flavonoids, *Journal of Raman Spectroscopy.* 37 (2006). <https://doi.org/10.1002/jrs.1634>.