UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ARTES, CIÊNCIAS E HUMANIDADES

MARIANA DE MELO BRITES

Desenvolvimento de membranas de nanofibras a base de acetato de celulose do bagaço de cana-de-açúcar produzidas por eletrofiação para a incorporação de enzimas.

São Paulo

2015

MARIANA DE MELO BRITES

Desenvolvimento de membranas de nanofibras a base de acetato de celulose do bagaço de cana-de-açúcar produzidas por eletrofiação para a incorporação de enzimas.

Dissertação apresentada à Escola de Artes, Ciências e Humanidades da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre. Área de Concentração: Materiais e Processos Têxteis.

Versão corrigida contendo as alterações solicitadas pela comissão julgadora em 09 de outubro de 2015. A versão original encontra-se em acervo reservado na Biblioteca da EACH/USP e na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD), de acordo com a Resolução CoPGr 6018, de 13 de outubro de 2011.

Orientadora: Prof^a. Associada Dra. Silgia Aparecida da Costa

São Paulo
2015

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Universidade de São Paulo. Escola de Artes, Ciências e Humanidades. Biblioteca)

Brites, Mariana de Melo

Desenvolvimento de membranas de nanofibras a base de acetato de celulose do bagaço de cana-de-açúcar produzidas por eletrofição para a incorporação de enzimas / Mariana de Melo Brites ; orientadora, Silgia Aparecida da Costa . – São Paulo, 2015

113 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Têxtil e Moda, Escola de Artes, Ciências e Humanidades, Universidade de São Paulo
Versão corrigida

1. Tecnologia têxtil. 2. Fibras têxteis. 3. Bagaços - Aproveitamento; Uso. 4. Cana-de-açúcar. 5. Materiais nanoestruturados. I. Costa, Silgia Aparecida da, orient. II. Título.

CDD 22.ed. – 677

Nome: BRITES, M. M.

Título: Desenvolvimento de membranas de nanofibras a base de acetato de celulose do bagaço de cana-de-açúcar produzidas por eletrofiação para a incorporação de enzimas.

Dissertação apresentada à Escola de Artes,
Ciências e Humanidades da Universidade
de São Paulo para obtenção do título de
Mestre. Área de Concentração: Materiais e
Processos Têxteis.

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Dedico este trabalho a minha mãe Maria que sempre me incentivou a continuar e apoiou nos momentos difíceis.

Às minhas queridas amigas Paula e Vivian, as melhores amigas que uma pessoa pode ter na vida.

A minha avó Altair que sempre me inspirou.

E ao meu pai Antonio que me ensinou a ser uma pessoa solidária.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Professora Silgia Aparecida da Costa pelos ensinamentos, atenção, dedicação, apoio e incentivo durante a orientação.

À Professora Sirlene Maria da Costa pelos seus conhecimentos na aplicação do bagaço da cana-de-açúcar que foi fundamental no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Professor Luiz Catalani, do Instituto de Química da USP, por ter permitido a utilização do seu laboratório para a realização da etapa de eletrofiação.

Ao Doutor Ricardo Bentini pelo apoio na utilização do aparelho de eletrofiação e a todos os colegas do laboratório de biomateriais pela amizade e companheirismo.

Ao Professor Adalberto Pessoa Jr., da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, por ceder espaço em seu laboratório para a realização dos últimos ensaios.

Ao Professor Humberto Gomes Ferraz, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, pela realização dos ensaios térmicos em seu laboratório.

Ao Professor Rodrigo Cardoso de Oliveira, da Faculdade de Odontologia de Bauru, pelo apoio na realização dos ensaios de citotoxicidade.

Aos técnicos do laboratório, Ervin Sriubas e Kelliton Francisco pelo apoio técnico.

Aos meus colegas do Grupo de Pesquisa em Têxteis Técnico: Kátia Hipolito, Daniela Furuya, Carol Lima, Thais Gonzalez, Agatha Carretero, Giovana Melin, Renata Tonaco, Isabella Hansted, pela amizade durante o desenvolvimento prático deste trabalho.

Agradeço também à Escola de Artes, Ciências e Humanidades da Universidade de São Paulo pela infraestrutura dos laboratórios e a CAPES pela bolsa concedida para desenvolvimento deste projeto.

Agradeço a todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para o desenvolvimento deste Projeto de Mestrado.

RESUMO

BRITES, M. M. **Desenvolvimento de membranas de nanofibras a base de acetato de celulose do bagaço de cana-de-açúcar produzidas por eletrofiação para a incorporação de enzimas.** 2015. 113f. Dissertação de (mestrado) – Escola de Artes, Ciências e Humanidades, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Neste trabalho a celulose extraída do bagaço de cana-de-açúcar foi convertida para triacetato de celulose que foi utilizado na produção de nanomembranas obtidas através da técnica de eletrofiação. O acetato de celulose foi preparado adicionando-se 100 mL de ácido acético, 1 mL de ácido sulfúrico e 67 mL de anidrido acético para 1g de celulose do bagaço de cana-de-açúcar. Foi obtido um rendimento de cerca de 1,3g do produto para cada 1g de bagaço utilizado no processo. O triacetato de celulose produzido foi caracterizado por meio de Análise de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR). Os resultados mostraram um conjunto de bandas de baixa intensidade na região 3700 a 3100, uma banda intensa em 1750 cm^{-1} e uma banda intensa em 1230 cm^{-1} . O grau de substituição foi de 2,8. Os resultados da Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) para a celulose comercial (Sigma®) apresentou dois picos endotérmico a 200°C e 320°C e um pico exotérmico a 340°C, e a celulose do bagaço de cana-de-açúcar mostrou um pico endotérmico a 190°C. O acetato de celulose comercial (Sigma®) apresentou dois picos endotérmicos a 185°C e a 240°C e o triacetato de celulose do bagaço de cana-de-açúcar mostrou quatro picos endotérmicos a 170°C, 240°C, 300°C e 370°C, respectivamente. As nanomembranas de triacetato de celulose foram produzidas utilizando-se várias soluções poliméricas, a solução polimérica mais adequada ao processo foi Acetona/Dimetilformamida (DMF 85:15 m/m) a 15% de triacetato de celulose 70/30 m/m Sigma®/Bagaço. Durante o processo de eletrofiação foram testadas as seguintes condições: voltagem (25 KV), fluxo (2-4 mL/h) e distância de (7-12 cm). As nanomembranas foram caracterizadas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV); citotoxicidade onde os resultados obtidos indicando a biocompatibilidade das nanomembranas eletrofiadas; absorção de água, na faixa de 150% a 350% e perda de massa na faixa de 9% a 28%. Neste trabalho também foi realizado o estudo da incorporação da enzima bromelina, visando agregar propriedades cicatrizantes e anti-inflamatórias às nanomembrana e assim possibilitando sua futura utilização no tratamento de feridas, traumas, queimaduras, entre outros. Os melhores resultados na condição em recuperação de atividade enzimática foram de 67,5.

Palavras-chave: Bagaço de cana-de-açúcar; Celulose; Acetato de celulose; Eletrofiação, Membrana de nanofibras.

ABSTRACT

BRITES, M. M. **Development of the nanofiber membranes based on cellulose acetate pulp from sugar cane produced by electrospinning to incorporate enzymes.** 2015. 113f. Dissertação de (mestrado) – Escola de Artes, Ciências e Humanidades, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

In this work, the cellulose extracted from sugarcane bagasse was converted to cellulose triacetate which was used in the production of nanomembranes obtained by electrospinning technique. The cellulose acetate was prepared by adding 100 mL of acetic acid, 1 mL of sulfuric acid and 67 mL of acetic anhydride to 1 g of cellulose pulp from sugar cane. A yield of about 1.3 g of product per gram of bagasse used in the process was obtained. The cellulose triacetate produced was characterized by analysis of Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR). The results show a set of low intensity bands in the region 3700 - 3100, an intense band at 1750 cm^{-1} and an intense band at 1230 cm^{-1} . The degree of substitution calculated was 2.8. The results of Differential Scanning Calorimetry (DSC) of the commercial cellulose (Sigma®), presented two endothermic peaks at 200°C, 320°C and an exothermic peak at 340°C, and the cellulose from sugarcane bagasse showed the endothermic peak at 190°C. The commercial cellulose acetate (Sigma®) showed two endothermic peak 185°C to 240°C and cellulose triacetate from sugarcane bagasse showed four endothermic peaks at 170°C, 240°C, 300°C and 370°C respectively. The nanomembranes of cellulose triacetate were produced using some polymeric solutions, the polymeric solutions most appropriated was acetone/dimethylformamide (DMF 85:15 w / w) to 15% cellulose triacetate, cellulose 70/30 w / w Sigma® / Bagasse. During the electrospinning process the following conditions were tested: voltage (25 kV), flow rate (2 - 4 mL/h) and distance (7 - 12 cm). The nanomembranes were characterized by Scanning Electron Microscopy (SEM); cytotoxicity the results indicate the biocompatibility of the electrospinning nanomembranes; and water absorption, yielding values between 150 and 350% mass loss and to values between 9 and 28%. In this study it was the incorporation of the enzyme bromelain, in order to add healing and anti-inflammatory properties to nanomembrane was also performed and thus allowing their future use in the treatment of wounds, traumas, burns, among others. Provided the best results in recovery of enzyme activity was about 67.5.

Keywords: Sugar cane bagasse; Cellulose; Cellulose acetate; Electrospinning; nanofiber membranes.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Cultivo de cana-de-açúcar	22
Figura 2 - Formas de representação gráfica da molécula de β -D-glucose.	24
Figura 3 - Exemplos do grau de polimerização médio da celulose em materiais	25
Figura 4 - Formação da ligação glicosídica entre duas unidades de β -D-glicopirranose,	25
Figura 5 - Mecanismo da reação de acetilação da celulose.	30
Figura 6 - Fluxograma comparativo entre o processo de produção do triacetato e o	32
Figura 7 - Esquema da eletrofiliação	45
Figura 8 - Processo de acetilação da celulose do bagaço da cana-de-açúcar.	60
Figura 9 - Filtração do triacetato de celulose produzido.	60
Figura 10 - Solubilização do triacetato de celulose do bagaço de cana-de-açúcar.....	63
Figura 11 - Processo de eletrofiliação de nanomembrana de triacetato de celulose.....	64
Figura 12 - Curva padrão da concentração de proteína (mg/L) versus ABS (nm).	69
Figura 13 - Celulose de bagaço de cana-de-açúcar.	75
Figura 14 - Triacetato de celulose.	75
Figura 15 - Representação da reação de saponificação do acetato de celulose.	76
Figura 16 - Curva DSC da celulose comercial da Sigma® (sob atmosfera inerte de nitrogênio com fluxo de gás 50 mL/min.), com razão de aquecimento de 10 °C/min de 25 a 400 °C.	79
Figura 17 - Curva de DSC celulose do bagaço de cana-de-açúcar (sob atmosfera inerte de nitrogênio com fluxo de gás 50 mL/min.), com razão de aquecimento de 10 °C/min de 25 a 400 °C.	79
Figura 18 - Curva de TGA/DTG celulose Sigma® (sob atmosfera inerte de nitrogênio com fluxo de gás 100 mL/min.), com razão de aquecimento de 10 °C/min de 25 a 600 °C.	79
Figura 19: Curva de TGA/DTG celulose de bagaço (sob atmosfera inerte de nitrogênio com fluxo de gás 100 mL/min.), com razão de aquecimento de 10 °C/min de 25 a 600 °C.	79
Figura 20 - Curva DSC de acetato de celulose comercial da Sigma®, (sob atmosfera inerte de nitrogênio com fluxo de gás 50 mL/min.), com razão de aquecimento de 10°C/min de 25 a 400 °C.....	80

Figura 21 - Curva de DSC triacetato de celulose do bagaço de cana-de-açúcar (sob atmosfera inerte de nitrogênio com fluxo de gás 50 mL/min.), com razão de aquecimento de 10°C/min de 25 a 400 °C.....	80
Figura 22 - Curva de TGA/DTG acetato de celulose Sigma® (sob atmosfera inerte de nitrogênio com fluxo de gás 100 mL/min.), com razão de aquecimento de 10 °C/min de 25 a 600 °C.....	80
Figura 23 - Curva de TGA/DTG triacetato de celulose de bagaço de cana-de-açúcar (sob atmosfera inerte de nitrogênio com fluxo de gás 100 mL/min.), com razão de aquecimento de 10 °C/min de 25 a 600 °C.....	80
Figura 24 - Curva DSC de acetato de celulose comercial da Sigma® em mistura com triacetato de celulose do bagaço de cana-de-açúcar 70/30 m/m (sob atmosfera inerte de nitrogênio com fluxo de gás 50 mL/min.), com Razão de aquecimento de 10 °C/min de 25 a 400 °C.....	81
Figura 25 - Espectro de infravermelho para o triacetato de celulose produzido a partir da celulose comercial (Sigma) e da celulose do bagaço da cana-de-açúcar.....	82
Figura 26 - Nanomembrana de triacetato de celulose solução TAC 18% m/m acetona/DMF 85:15 m/m.....	85
Figura 27 - Nanomembrana de triacetato de celulose solução TAC 15% m/m acetona/DMF 85:15 m/m.....	86
Figura 28 - Nanomembrana de triacetato de celulose solução TAC 6% m/m diclorometano/DMF 90:10 m/m.....	86
Figura 29 - Imagem de MEV da nanomembrana de triacetato de celulose solução TAC 6% (m/m) diclorometano/DMF 85:15 (m/m) ampliado 1000x.....	88
Figura 30 - Imagem de MEV da nanomembrana de triacetato de celulose solução TAC 6% (m/m) diclorometano/DMF 85:15 (m/m) ampliado 5000x.....	88
Figura 31 - Imagem de MEV nanomembrana de triacetato de celulose(Sigma®) solução TAC 6% (m/m) diclorometano/DMF 85:15 (m/m), ampliado 50000x.....	89
Figura 32 - Imagem de MEV da nanomembrana de triacetato de celulose solução TAC 6% m/m diclorometano/DMF 90:10 m/m ampliado 1000x.....	90
Figura 33 - Imagem de MEV nanomembrana de triacetato de celulose solução TAC 6% m/m diclorometano/DMF 90:10 m/m ampliado 5000x.....	90
Figura 34 - Imagem de MEV nanomembrana de triacetato de celulose solução TAC 6% (m/m) diclorometano/DMF 90:10 (m/m), ampliado 50000x.....	90

Figura 35 - Imagem de MEV da nanomembrana de triacetato de celulose solução 15% (m/m) acetona/DMF 85:15 (m/m) eletrofiado a 12cm, ampliado 1000x.	91
Figura 36 - Imagem de MEV da nanomembrana de triacetato de celulose solução 15% m/m acetona/DMF 85:15 m/m eletrofiado a 12cm, ampliado 5000x.....	91
Figura 37 - Imagem de MEV da nanomembrana de triacetato de celulose solução 15% (m/m) acetona/DMF 85:15 (m/m) eletrofiado a 10cm, ampliado 1000x.	92
Figura 38 - Imagem de MEV da nanomembrana de triacetato de celulose solução 15% (m/m) acetona/DMF 85:15 (m/m) eletrofiado a 10cm, ampliado 5000x.	92
Figura 39 - Imagem de MEV nanomembrana de triacetato de celulose solução 15% m/m acetona/DMF 85:15 m/m eletrofiada a 10cm, 50000x.	93
Figura 40 - Imagem de MEV nanomembrana de triacetato de celulose solução 15% m/m acetona/DMF 85:15 m/m eletrofiada a 12 cm, ampliado 20000x.	93
Figura 41 - Imagem de MEV nanomembrana de triacetato de celulose solução 15% (m/m) acetona/DMF 85:15 (m/m) eletrofiado a 10cm, ampliado 50000x.	93
Figura 42 - Imagem de MEV nanomembrana de triacetato de celulose solução 15% (m/m) acetona/DMF 85:15 (m/m) eletrofiado a 12cm, ampliado 50000x.	93
Figura 43 - Imagem de MEV da nanomembrana de triacetato de celulose solução 18% (m/m) acetona/DMF 85:15 (m/m) ampliado 1000x.	94
Figura 44 - Imagem de MEV da nanomembrana de triacetato de celulose solução 18% (m/m) acetona/DMF 85:15 (m/m) ampliado 5000x.	94
Figura 45 - Imagem de MEV nanomembrana de triacetato de celulose solução 18% (m/m) acetona/DMF 85:15 (m/m), ampliado 50000x.	95
Figura 46 - Imagem de MEV da nanomembrana de triacetato de celulose solução 15% triacetato misto 70:30 sigma/bagaço (m/m) acetona/DMF 85:15 (m/m) ampliado 1000x.	96
Figura 47 - Imagem de MEV da nanomembrana de triacetato de celulose solução 15% triacetato misto 70:30 sigma/bagaço (m/m) acetona/DMF 85:15 (m/m) ampliado 20000x.	96
Figura 48 - Imagem de MEV da nanomembrana de triacetato de celulose solução 15% TAC misto 70:30 TAC sigma/bagaço (m/m) acetona/DMF 85:15 (m/m), ampliado 50000x.	97
Figura 49 - Gráfico de porcentagem de absorção de umidade pelas nanomembranas.....	98
Figura 50 - Gráfica de porcentagem de perda de massa pelas nanomembranas.	99

Figura 51 - Análise da redução do MTT de células NIH3T3 tratadas com meio condicionado com as bandagens (a) Extrato Bruto e (b) diluição 50%); além dos controles positivo e negativo, nos períodos de 24, 48 e 72 horas. * = $p < 0,05$	100
Figura 52 - Análise da redução do MTT de células NIH3T3 tratadas com meio condicionado com as bandagens (a) Extrato Bruto e (b) diluição 50%); além dos controles positivo e negativo, nos períodos de 24, 48 e 72 horas. * = $p < 0,05$	101
Figura 53 - Atividade da bromelina liberada das nanomembranas na solução de PBS durante o período de incubação de 10 dias à 37°C.	103

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição média da cana-de-açúcar.	22
Tabela 2 - Soluções poliméricas preparadas para o processo de eletrofiação.	61
Tabela 3 - Divisão dos grupos experimentais.	72
Tabela 4 - Teor de grupos acetil do triacetato de celulose de bagaço de cana-de-açúcar.	77
Tabela 5 - Grau de substituição dos materiais acetilados.	77
Tabela 6 - Atribuições das principais bandas no FTIR do triacetato de celulose.	83
Tabela 7 - Soluções precursoras e parâmetros utilizados nos processos de eletrofiação das nanomembranas.	87
Tabela 8 - Resultados de imobilização da bromelina incorporada nos géis para produção das nanomembranas.	103

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - principais efeitos dos parâmetros da eletrofiação na morfologia das fibras.	47
Quadro 2 - Exemplos de curativos e bandagens comercializados e suas aplicações.	57

LISTA DE ABREVIATURAS

AC – Acetato de celulose

AQ – Antraquinona

DMEM – Meio de Eagle modificado por Dulbecco – NUTRICELL

DMF – Dimetilformamida

DMSO - Dimetilsulfóxido

DSC – Differential Scanning Calorimetry em português Calorimetria Exploratória Diferencial

FTIR – Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier

%GA – Grau de Acetilação porcentagem de grupos acetila

GP – Grau de Polimerização

GS – Grau de Substituição

MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura

MTT – Azul de Tetrazólio (3-(4,5-dimethylthiazolone-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide)

PBS – Tampão Fosfato

RI – Rendimento da Imobilização

SFB – Soro Fetal Bovino

TAC – Triacetato de Celulose

TG/DTA – Termogravimetria

TPP® - Techno Plastic Products

SUMÁRIO

RESUMO	7
ABSTRACT	8
LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE QUADROS	14
LISTA DE ABREVIATURAS	15
1 INTRODUÇÃO	19
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
2.1 CANA-DE-AÇÚCAR	21
2.2 BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR	23
2.3 CELULOSE	24
2.4 HEMICELULOSE.....	26
2.5 LIGNINA.....	27
2.6 CINZAS E EXTRATIVOS	28
2.7 ACETATO DE CELULOSE	28
2.7.1 Processo de Produção	30
2.7.2 Característica da fibra	37
2.7.2.1 <i>Tenacidade e alongamento</i>	38
2.7.2.2 <i>Estrutura fina</i>	38
2.7.2.3 <i>Umidade</i>	38
2.7.2.4 <i>Massa específica</i>	38
2.7.2.5 <i>Índice de refração</i>	39
2.7.2.6 <i>Propriedades elétricas</i>	39
2.7.2.7 <i>Resistência à luz</i>	39
2.7.2.8 <i>Resistência ao calor</i>	39
2.7.2.9 <i>Propriedades químicas</i>	40
2.7.2.10 <i>Aparência e cor</i>	40
2.7.2.11 <i>Manutenção</i>	41
2.7.2.12 <i>Resistência a micro-organismos</i>	41

2.7.2.13 Capacidade de tingimento.....	41
2.7.2.14 Resistência à abrasão	41
2.7.3 Perfil do mercado	42
2.8 ELETROFIAÇÃO	44
2.8.1 Parâmetros da solução	47
2.8.1.1 Viscosidade e massa molar da solução precursora	48
2.8.1.2 Tensão Superficial.....	48
2.8.1.3 Condutividade elétrica da solução polimérica	49
2.8.2 Parâmetros de Processo	49
2.8.2.1 Voltagem aplicada	49
2.8.2.2 Vazão.....	50
2.8.2.3 Distância da agulha ao coletor.....	50
2.8.2.4 Efeito do coletor.....	50
2.8.2.5 Temperatura	51
2.8.3 Parâmetros do ambiente	51
2.8.3.1 Umidade	51
2.9 ENZIMA BROMELINA	51
2.9.1 Enzimas	51
2.9.2 Bromelina	52
2.9.3 Imobilização	54
2.10 TÊXTEIS TÉCNICOS MÉDICOS.....	55
3 OBJETIVOS	58
3.1 OBJETIVO GERAL	58
4 MATERIAIS E MÉTODOS	59
4.1 MATERIAIS.....	59
4.2 MÉTODOS	59
4.2.2 Produção de triacetato de celulose	59
4.2.3 Determinação do grau de substituição (GS) do triacetato de celulose	60
4.2.4 Preparo das soluções poliméricas de Triacetato de Celulose	61
4.2.4.1 Solução de triacetato de celulose (TAC) 6% m/m em diclorometano/DMF	
90:10 m/m	61
4.2.4.2 Solução de triacetato de celulose TAC 6% m/m em diclorometano/DMF	
85:15 m/m	62

4.2.4.3 Solução de triacetato de celulose TAC 18% m/m em acetona/DMF 85:15 m/m	62
4.2.4.5 Solução de triacetato de celulose TAC 15% m/m misto (70:30 m/m TAC sigma®/bagaço) em acetona/DMF 85:15 m/m	62
4.2.5 Eletrofiação das soluções poliméricas.....	63
4.2.6 Imobilização da enzima bromelina	64
4.2.7 Rendimento do processo de imobilização em termos de proteínas totais e atividade recuperada	64
4.2.7.1 Recuperação em proteína	65
4.2.7.2 Rendimento do processo de imobilização (RI)	65
4.2.8 Estudo de liberação da enzima bromelina	65
4.2.9 Determinação da atividade enzimática e concentração para a enzima bromelina	66
4.2.9.1 Atividade da bromelina	66
4.2.9.2 Proteína.....	68
4.2.10 Estudos de degradação das nanomembranas	69
4.2.11 Teste de citotoxicidade	70
4.2.11.1 Cultura de células	71
4.2.12 Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	73
4.2.13 Calorimetria exploratória diferencial (DSC).....	73
4.2.14 Termogravimetria (TG/DTA)	74
4.2.15 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....	74
4.2.16 Tratamentos estatísticos dos dados.....	74
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	75
5.1 OBTENÇÃO E RENDIMENTO DO TRIACETATO DE CELULOSE	75
5.2 DETERMINAÇÃO DO GRAU DE SUBSTITUIÇÃO (GS) DO TRIACETATO DE CELULOSE.....	76
5.3 ANÁLISE DE CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC) E TERMOGRAVIMETRIA (TGA/DTG)	77
5.4 ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)	81
5.5 ESTUDO DAS CONDIÇÕES DE PREPARO DAS SOLUÇÕES POLIMÉRICAS DE TRIACETATO DE CELULOSE	83

5.6 ELETROFIAÇÃO DAS NANOMEMBRANAS DE TRIACETATO DE CELULOSE	84
5.7 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DAS NANOMEMBRANAS PELA ANÁLISE DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV).....	87
5.8 ESTUDOS DE ABSORÇÃO DE ÁGUA E PERDA DE MASSA EM SOLUÇÃO DE SUOR ARTIFICIAL ÁCIDO, BÁSICO E TAMPÃO FOSFATO.....	97
5.9 TESTE DE CITOTOXICIDADE	99
5.9.1 Redução do MTT	100
5.9.2 Cristal violeta	100
5.10 ESTUDO DE IMOBILIZAÇÃO DA BROMELINA NAS NANOMEMBRANAS	102
5.11 ESTUDO DE LIBERAÇÃO DA ENZIMA BROMELINA	103
6 CONCLUSÃO	104
PERSPECTIVAS FUTURAS	106
REFERÊNCIAS	107

1 INTRODUÇÃO

Na área médica, os materiais têxteis desempenham um papel cada vez mais importante, principalmente com os avanços na nanotecnologia. As fibras, tecidos, não tecidos e malhas podem ser utilizadas para diversos tipos de aplicações como não implantes, implantes e dispositivos extras corporais (DENARD, 2004).

Muitos dos materiais têxteis hoje podem ser produzidos utilizando técnicas de nanotecnologia. Nesses materiais as fibras foram reduzidas de micrômetros a nanômetros, e podem apresentar algumas características excepcionais. No setor comercial são consideradas como nanofibras aquelas fibras com diâmetros inferiores a 500 nm. Estas se enquadram na categoria de elementos na escala nano de uma dimensão, em que se encontram os nanotubos e nanopartículas. As características morfológicas e de diâmetro, bem como a grande área de superfície, faz com que as nanofibras eletrofiadas apresentem uma ampla gama de possibilidades de funcionalização, candidatas a diversas aplicações de interesse (NISTA, 2012).

Segundo Nista (2012), associado com a nanotecnologia, novos tipos de tratamentos estão surgindo com significativa redução dos custos médicos. Com os recentes aperfeiçoamentos da eletrofiação, polímeros sintéticos assim como naturais têm sido utilizados como matéria-prima na produção de nanofibras com morfologia e funcionalidade controlada. Um grande potencial de aplicação dessas nanofibras eletrofiadas tem sido observado na área de saúde, indústrias cosméticas e farmacêuticas.

A nanotecnologia é um campo multidisciplinar que reúne a química, a física, a biologia, a engenharia de materiais e a computação de última geração, um nanômetro é uma medida na ordem de um bilionésimo de metro (SILVA, 2004).

O método mais simples, econômico e capaz de produzir nanofibras de diversos materiais a partir de polímeros utilizados em aplicações industriais é através da técnica de eletrofiação (CABRAL et al., 2009).

A espessura e a morfologia das fibras obtidas por eletrofiação a partir de soluções poliméricas dependem das propriedades físico-químicas destas soluções, como viscosidade, concentração das soluções, tensão superficial, a vazão da solução e distância entre a ponta da agulha e o coletor (CABRAL et al., 2009). Existem diversos polímeros passíveis de aplicação no processo de eletrofiação, dentre eles um polímero natural, o acetato de celulose.

No Brasil, a cana-de-açúcar é uma das maiores monoculturas agrícolas, utilizada para produzir principalmente álcool e açúcar, toda essa produção gera uma grande quantidade de resíduos. O processamento da cana para produção de álcool e açúcar gera vários resíduos agrícolas, como palha, bagaço, a torta de filtro, a vinhaça e águas residuárias. Desses resíduos, o bagaço é o que se encontra em primeiro lugar em termos de quantidade gerada (ALVES FILHO, 2007).

O bagaço é um resíduo agroindustrial abundante na indústria de cana-de-açúcar.. Sendo o Brasil o maior produtor de cana-de-açúcar destinado principalmente para a indústria de açúcar e álcool, foi estimado que as usinas podem liberar de 30 a 50% do bagaço produzido para usos alternativos (CARVALHO, 2009).

Como todo material lignocelulósico o bagaço é constituído por três principais componentes macromoleculares: celulose, polioses e lignina (CARVALHO, 2009).

Atualmente, esse resíduo é em sua maioria queimado para gerar energia para as usinas, mas uma quantidade considerável é ainda desperdiçada, o que vem motivando a pesquisa pela busca de alternativas para sua reciclagem, como por exemplo, a utilização da celulose para a produção de álcool pelo processo de hidrólise enzimática e hidrólise ácida, produção de compósitos e derivados celulósicos em geral (CERQUEIRA et al., 2010).

Nanofibras de celulose podem ser obtidas a partir destes resíduos agrícolas, constituindo uma alternativa para se manter o equilíbrio ambiental e de agregação de valores de produtos do setor da agricultura (BONDANCIA et al., 2010).

A celulose é um polissacarídeo abundante na natureza. É um polímero linear natural, derivado da condensação da D-glicose. Formada por ligações glicosídicas β -1,4 entre unidades D-glicopirranose, e está presente nas paredes celulares das plantas em geral. A cadeia molecular da celulose é formada pela repetição de unidades estruturais menores chamadas celobiose (KLOCK et al., 2005).

A proposta deste estudo foi elaborada pensando nas questões de inovações para o setor têxtil e nos benefícios que serão oferecidos ao meio ambiente, por meio do reaproveitamento de matéria-prima com a utilização do bagaço de cana-de-açúcar e ainda à sociedade, com a produção de novos materiais com propriedades medicinais. Este estudo visa à utilização da celulose do bagaço da cana-de-açúcar para produção do acetato de celulose e o desenvolvimento de nanomembranas com propriedades medicinais. Foi realizado também o estudo da incorporação da enzima bromelina, visando oferecer propriedades cicatrizantes e anti-inflamatória, que possibilitará o tratamento de feridas, traumas, queimaduras, feridas promovidas pela diabetes, úlceras de pressão, feridas pós-cirúrgicas, entre outras aplicações.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CANA-DE-AÇÚCAR

A cana-de-açúcar, *Saccharum officinarum*, é uma gramínea proveniente da Ásia cultivada em regiões tropicais e subtropicais. Pertence à família das *Poaceae*, a família botânica mais importante para as economias humanas, esta reúne também cereais como arroz, trigo, cevada, milho, entre outros. A cana-de-açúcar ocupa lugar de destaque na agricultura, estando entre as espécies vegetais mais cultivadas no mundo, alcançando mais de 80 países (CANDIDO, 2011).

O plantio da cana-de-açúcar foi difundido no Brasil no início do período colonial. O clima tropical e o solo adequado ao plantio contribuíram para o país tornar-se o maior produtor de açúcar durante o século XVI e início do século XVII (OLIVEIRA, 2010).

O Brasil é o maior produtor da cultura, seguido por Índia e China, e o maior produtor de açúcar e etanol de cana-de-açúcar. Mais de 50% do açúcar comercializado no mundo é brasileiro. A cana-de-açúcar é uma das maiores monoculturas agrícolas no país, com uma produção estimada em 642,1 milhões de toneladas para a safra de 2014/15, em cerca de nove milhões de hectares de área cultivada, distribuídas em todos estados produtores e utilizada para produzir álcool e açúcar (CONAB, 2014).

A estrutura da cana-de-açúcar consiste de vários tipos de tecidos, sendo estas o córtex (ou casca), tecido parenquimatoso e hastes fibrovasculares. O córtex é composto de fibras contendo uma grande quantidade de lignina, é caracterizado pela espessura da parede celular, comprimento e rigidez de suas fibras. A função deste tecido é conferir proteção contra efeitos mecânicos externos servindo de suporte para a planta. A parte central do talo (medula) é constituída por um tecido parenquimatoso não fibroso, o qual possui como principal função o armazenamento do suco adocicado produzido pela planta. Imerso neste tecido encontram-se as hastes fibrovasculares, compostas de fibras curtas e vasos que atuam na sustentação e condução dos alimentos e outros produtos ao longo da planta (CANDIDO, 2011).

Apenas o talo vem apresentando valor econômico por sua capacidade de acumulação de açúcares e produção de fibras. A sacarose é o principal componente da cana-de-açúcar. A Tabela 1 mostra a composição média da cana-de-açúcar (CARVALHO, 2009).

Tabela 1- Composição média da cana-de-açúcar.

Composição	Teor (%)
Água	65 – 75
Açúcares	11 – 18
Fibras	8 – 14
Sólidos solúveis	12 – 23

Fonte: CARVALHO, (2009)

No Brasil tem ocorrido alguns avanços no setor sucroalcooleiro. O crescimento da produção da cana-de-açúcar, açúcar e álcool mostra a capacidade que o país tem de responder às demandas internas e externas. Em 2003, os veículos *flex-fuel* entraram no mercado brasileiro, criando uma demanda adicional para as destilarias. Visando, também, atender a potencial demanda externa, as indústrias aumentaram a produção de álcool, deixando o mercado com bom nível de abastecimento, uma vez que, ainda não houve consolidação do uso do álcool em outros países (CONAB, 2008).

O governo do Estado de São Paulo, pela lei nº 11.241, de 19 de setembro de 2002, dispõe que a eliminação da queima seja gradativa, de modo que até 2021 a queima da palha seja completamente eliminada, assim gerando uma maior quantidade de resíduo, que pode ser aproveitado na geração de bens de maior valor agregado (CANDIDO, 2011). A Figura 1 mostra um cultivo de cana-de-açúcar.

Figura 1 - Cultivo de cana-de-açúcar

Fonte: O autor (2012).

2.2 BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR

O processamento da cana gera diversos resíduos agrícolas, como palha, bagaço, a torta de filtro, a vinhaça e águas residuárias. Desses resíduos, o bagaço é o que encontra-se em primeiro lugar em termos de quantidade gerada. Os dados mostram que uma tonelada de cana-de-açúcar pode gerar cerca de 140 kg de bagaço (ALVES FILHO, 2007). Na safra de 2013/2014 houve uma produção de 658,8 milhões de toneladas de cana-de-açúcar no período (CONAB, 2014). Os custos dos processos de colheita e lavagem do bagaço já são incluídos ao processo de extração do açúcar, tornando assim as condições econômicas excelentes para o processamento do bagaço.

O bagaço é uma mistura morfológica heterogênea, consistindo do resíduo fibroso obtido do talo da cana-de-açúcar após os processos de trituração, moagem e extração do suco, e de outros elementos estruturais, tais como vasos, parênquimas e células epiteliais (CARVALHO, 2009). É um resíduo rico em carboidrato constituído por fibras e medula respectivamente nas proporções de aproximadamente 65% e 35%. A medula é a porção central formada por células parenquimáticas, não lignificadas e de pouca resistência, onde se encontra os feixes vasculares. Tem sido considerado como uma matéria-prima adequada para ser utilizada em processos para a obtenção de diversos produtos de valor econômico, como a polpa celulósica, polpa moída, furfural, álcool furfurílico, metanol, etanol, fertilizantes e ração animal (CANDIDO, 2011).

Entre as aplicações dadas ao bagaço, destaca-se principalmente, seu uso como combustível nas caldeiras das usinas para geração de vapor para alimentação da fábrica de açúcar e a geração de energia elétrica. Somadas a essas duas principais finalidades, é utilizado na produção de polpa e papel, aglomerados e chapas semelhantes à madeira, em ração animal, na obtenção de produtos químicos, na produção de enzimas, entre muitas outras aplicações. Muitos processos e produtos têm feito uso deste resíduo agroindustrial como matéria-prima, em decorrência de suas características físico-químicas, além da grande quantidade produzida (CARVALHO, 2009).

A fração de celulose é a mais abundante no bagaço de cana-de-açúcar, sendo assim possível a utilização do bagaço para modificação química na produção de derivados celulósicos. A composição principal do bagaço consiste de 43,1 % de celulose, 27,6% de hemicelulose 23,4% de lignina, 2,8 % de cinzas (COSTA et al., 2013).

A celulose de bagaço de cana-de-açúcar pode ser obtida por hidrólise ácida seguida por um processo de polpação alcalina. Durante a hidrólise, os reagentes atuam sobre a lignina,

quebrando a macromolécula em unidades de baixa massa molar, que são solúveis no licor. No entanto, esta reação não é suficientemente forte para eliminar toda a lignina e os resíduos de hemiceluloses, um processo de branqueamento adicional pode ser usado (PEREIRA. et al., 2011).

2.3 CELULOSE

A celulose é o composto orgânico mais comumente encontrado na natureza, constitui entre 40 e 50% de quase todas as plantas e pode também ser encontrada em pequenas proporções em bactérias e algas. Está localizada principalmente na parede secundária das células vegetais (KLOCK et al., 2005). Cerca de um terço de toda a matéria vegetal é constituída de celulose. Embora amplamente encontrada na natureza, a celulose comercial é derivada quase inteiramente de algodão e madeira (ODIAN, 2004).

A celulose é um polissacarídeo composto pela repetição de unidades derivadas da condensação da D-glucose ($C_6H_{12}O_6$). As formas de representação da molécula D-glucose são apresentadas na Figura 2. A conformação piranose em cadeia é atualmente aceita como a descrição mais acertada da molécula de D-glucose (KLOCK et al., 2005; FERRAZ, 2001, FENGEL ;WEGENER, 1991).

figura 2 - Formas de representação gráfica da molécula de β -D-glucose.

Fonte: KLOCK et al. 2005.

Apresenta-se como um polímero de cadeia linear com ligações glicosídicas β -1,4 entre unidades D-glicopiranoze, sua estrutura é organizada e possui regiões cristalinas e amorfas (OGEDA ; PETRI, 2010). A fibra de celulose consiste em uma mistura de moléculas de celulose de diferentes tamanhos. Sendo assim, quando se fala de grau de polimerização ou massa molar para certa amostra, refere-se a um valor médio. O comprimento da cadeia polimérica da celulose varia de acordo com sua origem e é expresso em seu grau de

polimerização GP. O grau de polimerização da celulose pode variar de 1.000 a 15.000. Em temperatura ambiente a celulose é insolúvel em água, solventes orgânicos, ácidos e álcalis diluídos (KLOCK et al., 2005). Na Figura 3 podemos ver a estimativa do GP para cada tipo de fonte de celulose.

Figura 3 - Exemplos do grau de polimerização médio da celulose em materiais

Grau de Polimerização da Celulose de várias origens	
Tipo de Celulose	Grau de Polimerização
Celulose nativa (celulose I)	3.500 --- 12.000
Linter de algodão purificado	1.000 --- 3.000
Polpas de madeiras comerciais	600 --- 1.500
Celulose regenerada (celulose II)	200 --- 600

Fonte: KLOCK et al., 2005

A unidade estrutural básica de repetição para celulose é a unidade de celobiose. Esta se encontra em conformação de duplas hélices estendidas, sendo o segundo anel quimicamente idêntico ao primeiro, porém invertido ao longo do plano geral do primeiro anel (LANIEVE, 2007). A Figura 4 mostra a formação da ligação glicosídica entre duas unidades de β -D-glicopiranoose, produzindo a celobiose, precursora da celulose.

Figura 4 - Formação da ligação glicosídica entre duas unidades de β -D-glicopiranoose, produzindo a celobiose, precursora da celulose.

Fonte: CARVALHO, 2009.

Cada unidade de glicose contém três grupos hidroxilas (OH) livres, respectivamente ligados aos carbonos 2, 3 e 6. Estes são responsáveis pelo comportamento físico químico da celulose, tornando as macromoléculas de celulose suscetíveis a formar ligações de hidrogênio intermoleculares (entre as unidades de glicose de moléculas adjacentes) e intramoleculares (entre unidades de glicose da mesma molécula), as quais são extremamente importantes para suas características químicas e físicas (MEIRELES, 2007).

Sob condições normais, a celulose é extremamente insolúvel em água, o que é necessário para sua própria função como sustentação estrutural nas paredes celulares vegetais (OGEDA E PETRI, 2010). Comumente a celulose é convertida em derivados que possuem propriedades diferentes, como a solubilidade, o que abre caminhos para uma série de aplicações. Entre as aplicações está a produção de ésteres celulósicos, que tem se mostrado de grande importância comercial nos últimos anos (MEIRELES, 2007).

A celulose pode ser solubilizada ou funcionalizada através de reações com grupos hidroxila secundária na estrutura da celulose. Estes derivados de celulose, incluindo o acetato, propilhidroxila, e outros, também podem ser transformados em fibras. Ambos os derivados de celulose e a celulose são materiais relevantes em aplicações onde as fibras eletrofiadas estão sendo aplicadas incluindo o uso de filtração e em aplicações biomédicas (FREY, 2008).

O acetato de celulose vem sendo usado como matéria-prima para estudos de eletrofição. Este derivado possui a vantagem de ser facilmente solubilizado em solventes adequados ao processo de eletrofição, formando desta forma as nano membranas (FREY, 2008).

2.4 HEMICELULOSE

As hemiceluloses, também chamadas de polioses, são compostos amorfos, com estrutura ramificada e constituídos pela combinação de vários açúcares (pentoses, hexoses, ácidos hexurônicos e deoxiexoses) de baixa massa molecular (CANDIDO, 2011). Estão intimamente associados à celulose nos tecidos das plantas. Sua massa molar é de cerca 10 a 100 vezes menor do que a da celulose e apresenta ramificação em sua estrutura (MEIRELES, 2007).

Apresentam-se na forma de polímeros ramificados podendo ser classificados como homopolímeros, por exemplo, a xilana, formada por xilose ou heteropolímeros como, por exemplo, a glicomanana, formada por glicose e manose. O teor de polioses em diferentes tipos de vegetais é bastante variável, tendo um valor médio de 20% (CANDIDO, 2011).

Estruturalmente as hemiceluloses são mais semelhantes a celulose do que com a lignina e são depositadas na parede celular num estágio anterior à lignificação. A fácil interação das ramificações e cadeias laterais com a celulose promove estabilidade e flexibilidade à hemicelulose (CARVALHO, 2009). Diferenciam-se da celulose pela facilidade de hidrólise por ácidos diluídos e solubilidade em soluções alcalinas. As hemiceluloses são compostas por unidades de açúcar que possuem cinco átomos de carbono, chamadas pentoses, ou seis átomos de carbono, chamados hexoses (MEIRELES, 2007).

2.5 LIGNINA

As ligninas são hidrocarbonetos poliméricos complexos, formados por grupos alifáticos e aromáticos. Confere rigidez a parede celular e atua como um agente permanente de ligação entre as células, tornando as estruturas resistentes ao impacto, compressão e dobra. As ligninas podem conter núcleos aromáticos do tipo guaiacila, siringila ou p-hidroxifenila (MEIRELES, 2007).

Dentre os materiais lignocelulósicos, é a macromolécula orgânica mais importante e abundante depois da celulose. É uma macromolécula amorfa, altamente complexa e ramificada tridimensionalmente, gerada a partir da polimerização desidrogenativa dos álcoois hidroxycinâmicos: p-cumarílico, coniferílico e sinapílico. É constituída principalmente de unidades de fenilproprano associadas por ligações estáveis do tipo C-C, aril-éter e aril-aril (CANDIDO, 2011).

A lignina atua como uma camada protetora das microfibrilas de celulose, agindo como uma cola e conferindo coesão ao conjunto de células (CANDIDO, 2011). Tem como característica ainda a barreira contra degradação enzimática e/ou microbiana da parede celular, pode ser desenvolvido como principal matéria-prima industrial para diversas aplicações. Atualmente, estima-se uma taxa de biossíntese anual de lignina de cerca de 20 gigatoneladas. É a responsável, em grande parte, pelas dificuldades apresentadas na obtenção da celulose, por conferir rigidez à parede celular, agindo como um agente de ligação entre as células, dificultando o acesso do agente hidrolisante à celulose e hemicelulose (CARVALHO, 2009).

2.6 CINZAS E EXTRATIVOS

Junto aos componentes lignocelulósicos da parede celular existem numerosas substâncias como cinzas e extrativos. Estes materiais são responsáveis muitas vezes por certas propriedades dos vegetais, tais como: cheiro, cor, gosto. Possuem um papel importante na proteção contra pragas e no metabolismo das plantas, mas não têm uma contribuição positiva aos processos de conversão de biomassa e sim um efeito inibitório. Estas substâncias pertencem a classes muito diferentes quanto a sua composição química e, portanto, há dificuldades em se encontrar um sistema claro e compreensivo de classificação, de modo geral são divididos em material orgânico (extrativos) e inorgânico (cinzas) (CANDIDO, 2011).

2.7 ACETATO DE CELULOSE

O acetato de celulose é um dos derivados da celulose com maior importância comercial, é um dos polímeros mais importantes devido a sua larga aplicação em fibras, plásticos, filmes fotográficos e membranas. Podem ser usados em processos de separação por membranas como hemodiálise, matrizes para liberação controlada de fármacos, nanofiltração e osmose reversa, sensores e proteção de filmes ópticos, separação de gases e preparação de filmes de alumina (CERQUEIRA et al., 2010).

Este é produzido pela substituição dos grupos hidroxila das unidades de glucose por grupos acetila. Sendo assim, podem ser produzidos acetatos com diferentes graus de substituição. Um triacetato corresponde à celulose completamente saturada de grupos acetil, ou seja, pelo menos 92% dos grupos hidróxilos são acetilados. O acetato secundário é produzido a partir da pasta de triacetato, mistura-se água a solução reacional de triacetato, sob pressurização ou aumento de temperatura, promovendo a redução dos grupos acetilados de maneira uniforme, ocorrendo à hidrólise parcial do triacetato, onde a taxa de grupos hidroxilas acetilados tem que ser inferior a 92%, mas superior a 74% (LANIEVE, 2007).

Algumas cadeias são completamente acetiladas, enquanto outras podem não reagir completamente. Um produto parcialmente acetilado é geralmente produzido por hidrólise controlada do triacetato. O triacetato é solubilizado em água e a completa solubilização assegura que o produto final será mais homogêneo (ODIAN, 2004).

O grau de substituição (GS) é um fator de extrema importância, pois afeta sua solubilidade em diferentes solventes, a cristalinidade, o potencial de biodegradabilidade, entre

outras propriedades do polímero. Por exemplo, celulose ($GS = 0$) é insolúvel na maioria dos solventes (S), mas ao se aumentar o GS do acetato de celulose, a solubilidade se altera ($GS \approx 1$, S: água; $GS \approx 2$, S: tetrahidrofurano ou acetona; $GS \approx 3$, S: diclorometano ou clorofórmio). Assim, determinar o grau de substituição do acetato de celulose é importante para que se defina sua utilização (CERQUEIRA et al., 2010).

Outro fator de extrema importância que, aliado ao grau de substituição (grau de esterificação), determina as propriedades e aplicações do acetato de celulose, é a viscosidade da solução. A viscosidade constitui um indicador do grau de polimerização, influência diretamente as propriedades mecânicas das fibras ou filmes formados. Já o grau de substituição determina a solubilidade e a compatibilidade com plastificantes e outros polímeros e também exerce influência sobre as propriedades mecânicas do acetato (SILVA, G., 2002).

Há três sistemas para a produção comercial do triacetato e acetato de celulose: sistema de ácido acético; sistema de cloreto de metileno, e os sistemas heterogêneos. Dentre estes, o sistema de produção mais utilizado é o sistema de ácido acético. No sistema de ácido acético, este ácido atua como solvente para o triacetato de celulose, uma vez que é formado durante a acetilação da celulose (LANIEVE, 2007).

Os derivados da celulose, como a metilcelulose, são amplamente utilizados em diversas atividades, de acordo com seu grau de substituição. Por exemplo, podem ser utilizados como um espessante na indústria de alimentos e como uma matriz para a liberação controlada das drogas na indústria farmacêutica. São também utilizados pela indústria farmacêutica e de cosméticos para produção de géis hidrofílicos e sofreram um aumento de sua aplicação devido à sua facilidade para ser espalhado e por não serem gordurosos. Esses géis têm vantagens quanto à toxicidade, biocompatibilidade, biodegradabilidade, alta estabilidade e baixo custo, além de serem encontrados em abundância na natureza (IZIQUE, 2007).

No presente estudo o triacetato de celulose foi preparado com ácido acético, ácido sulfúrico, anidrido acético e celulose do bagaço de cana-de-açúcar. Segundo Carvalho (2009), o anidrido é o agente que promove a acetilação e o ácido sulfúrico funciona como um catalisador na reação. O triacetato de celulose é produzido pela hidrólise em meio ácido do triacetato através da adição de água à mistura, a pressurização ou o aumento de temperatura, contribuem para uma distribuição uniforme dos acetatos na superfície da fibra polimérica.

2.7.1 Processo de Produção

O acetato de celulose é um éster orgânico, obtido pela reação de acetilação da celulose com anidrido acético em presença de ácido acético, tendo como catalisador ácido sulfúrico.

Não há métodos comerciais satisfatórios para a acetilação direta da celulose em acetato secundário. A celulose é um polímero altamente cristalino, e suas cadeias ordenadas e fortemente ligadas por pontes de hidrogênio o torna insolúvel no meio reacional até que a acetilação esteja quase completa. Comercialmente, a celulose é totalmente acetilada para triacetato e, em seguida, hidrolisada de volta ao acetato secundário. O polímero mesmo cuidadosamente hidrolisado tem um rendimento aleatório. Triacetato de celulose é obtido por meio da esterificação da celulose com anidrido acético. (LANIEVE, 2007). Na Figura 5 pode-se observar o mecanismo de acetilação da celulose.

Figura 5 - Mecanismo da reação de acetilação da celulose.

Fonte: CARVALHO (2009)

A reação de acetilação do triacetato e acetato de celulose podem ocorrer pelo sistema homogêneo (sistema de ácido acético; sistema de cloreto de metileno) ou pelos sistemas

heterogêneos. Ambos os métodos se constituem na reação da celulose com uma mistura de ácidos, ácido acético e anidrido acético, na presença de ácido sulfúrico ou ácido perclórico como catalisador. A maior parte do acetato é produzida pelo sistema homogêneo de ácido acético. A principal diferença entre os dois métodos é que na acetilação heterogênea utiliza-se um agente que permite que a estrutura fibrosa da celulose não inche, como por exemplo o tolueno. No sistema de acetilação homogênea não se utiliza o tolueno e a celulose é solubilizada no meio reacional, o que causa mudança na morfologia das fibras de celulose (MEIRELES, 2007). Na Figura 6 pode-se observar um fluxograma do processo de produção do acetato de celulose.

Figura 6 - Fluxograma comparativo entre o processo de produção do triacetato e o diacetato de celulose pelas etapas do processo de produção.

Fonte: Autor.

A primeira etapa do processo de produção das fibras de triacetato e acetato de celulose é a preparação pela dissolução da celulose em ácido acético glacial, a fim de tornar a celulose mais reativa e a acetilação mais rápida. O processo de suspensão é realizado

inicialmente pela quebra da folha de celulose desintegrada no triturador. A celulose triturada é transportada ao pré-tratador, onde é adicionado ácido acético para pré-tratar a celulose. Segundo Lanieve (2007), a etapa de pré-tratamento pode ser realizada em uma fase de vapor ou suspensão. A etapa de tratamento em fase de vapor envolve uma pequena quantidade de ácido acético calculado de acordo com o peso da celulose utilizada. Industrialmente o processo é realizado em um recipiente de aço inoxidável fechado com agitação mínima e temperatura em torno de 25 a 50°C, por 1h. Há uma contínua vaporização e condensação do ácido acético no interior das fibras, resultando em inchaço uniforme em toda a celulose.

Já o pré-tratamento através de suspensão envolve uma relação elevada de líquido/celulose. A celulose está dispersa em água ou em ácido acético aquoso com agitação vigorosa para dispersar a celulose de maneira uniforme, em seguida, a água é substituída por ácido acético por uma série de operações contínuas. A dispersão final é feita em uma grande quantidade de ácido acético com apenas uma pequena parte de água. A vantagem do pré-tratamento por suspensão é que a etapa de trituração é eliminada, ou seja, as folhas de celulose são alimentadas diretamente em barca equipada com um agitador e contendo o meio de dispersão (LANIEVE, 2007).

Depois do pré-tratamento vem à etapa de acetilação. A celulose pré-tratada é carregada em um acetilador e é adicionada uma carga em excesso de anidrido e ácido acético glacial e o ácido sulfúrico como catalisador, a solução é mantida em constante agitação. Durante a reação ocorre à formação do ácido sulfo-acético, que é também conhecido como agente de acetilação.

O anidrido acético reage com a umidade na celulose pré-tratada, resultando em ácido acético e um meio reacional totalmente anidro. Em seguida, a celulose começa a reagir com o anidrido acético, a reação inicial ocorre principalmente nas regiões amorfas da celulose. Os estágios iniciais da acetilação consistem de uma reação heterogênea em que a celulose ou a celulose parcialmente acetilada está dispersa em meio reacional. A boa agitação da mistura é necessária para assegurar que o processo de acetilação seja o mais uniforme possível em toda a dispersão (LANIEVE, 2007).

A reação é fortemente exotérmica e para evitar a degradação da molécula do polímero é necessário resfriar os recipientes. Depois de uma hora a 20°C e cerca de sete horas a 25 – 30°C, a reação é completada e a dispersão fibras/líquido se torna uma massa viscosa gelatinosa. Neste ponto, a celulose foi completamente acetilada, ou seja, convertida em triacetato de celulose (HEARLE, WOODINGS, 2001). De acordo com Neto (1996), para a verificação do ponto ideal de acetilação, amostras são continuamente retiradas e examinadas.

Para separar o triacetato da solução de ácido acético, a pasta de triacetato é diluída em água, sofrendo um processo de precipitação e separação. Em seguida, o triacetato é lavado com água algumas vezes até a completa eliminação da acidez, em seguida é feita a secagem do substrato. O triacetato sólido é dissolvido em clorofórmio ou em cloreto de metileno, transformando-se em solução de triacetato misturado com algum álcool, e então transformado em fibra (NETO, 1996).

Neste ponto foi produzido o triacetato de celulose, também conhecido como acetato primário, que já pode ser fiado como será explicado mais adiante.

Para a produção do acetato secundário ou diacetato de celulose, volta-se à etapa de acetilação da celulose, quando se obteve a pasta de triacetato. De acordo com Neto (1996), a produção de acetato de celulose secundário é realizada em uma operação separada, em que, o triacetato de celulose é hidrolisado sob condições cuidadosamente controladas para a obtenção de GS em torno de 2,4.

É adicionada água suficiente à solução de triacetato que contém excesso de ácido acético e anidrido acético. A água elimina o anidrido em excesso, originando assim uma solução 95% de ácido acético.

A solução é transportada para outro recipiente em que o triacetato de celulose é hidrolisado para se tornar acetato de celulose secundário. Segundo Hearle e Woodings (2001), a hidrólise ácida ocorre ao longo de um período de até 20 horas a uma temperatura mais elevada. É essencial que algum radical sulfato seja removido durante a hidrólise. Ao fim dessa fase é acrescentada água adicional e o acetato secundário é precipitado.

Os flocos de diacetato de celulose são precipitados do ácido no precipitador. Então eles são lavados com água em uma máquina de lavar em contracorrente contínua. Os flocos lavados são prensados ou centrifugados para remover o excesso de licor de lavagem, secos em um secador contínuo e transportados para silos de armazenamento. Os flocos ou pellets de muitos silos são misturados por meios de sistemas computadorizados, a fim de garantir um produto uniforme e evitar problemas posteriores, causados por diferenças na coloração ou brilho. O material misturado é então transportado para silos de armazenamento (LANIEVE, 2007). O processo dura em torno de 24 horas, sob uma forte agitação, para dissolver o acetato secundário em cerca de três vezes o seu peso em acetona misturada com água ou álcool.

O licor que sobra da precipitação do acetato é removido para uma planta de recuperação para extrair o ácido acético residual.

O processo de fiação seca é utilizado para ambas às fibras de triacetato e diacetato de celulose. De acordo com Neto, (1996) a massa de fiação é passada para um tanque de

alimentação e a solução polimérica alimenta a fieira. Uma bomba assegura um fluxo constante e uniforme de alimentação para as cabeças de fiação. Antes de alcançar fieiras, a solução de fiação sofre uma filtragem, com a finalidade de reter partículas sólidas que poderiam interferir no fluxo.

A fieira consiste em uma placa de metal, com diversos orifícios que podem ter variados formatos e diâmetros. Na fiação seca, o fio desce verticalmente da fieira por um tubo de 2 m a 5 m, chamado cabine de fiação, onde há uma contracorrente de ar quente, que entra pelo fundo da cabine, a uma temperatura de 100°C.

À medida que os conjuntos de filamentos são estrudados na câmara, eles se encontram com o ar quente, fazendo com que o solvente evapore e os filamentos se tornem sólidos, embora ainda sem uma orientação definitiva do filamento.

A temperatura, o teor de umidade e a velocidade do ar são parâmetros importantes na fiação seca. Um rolo guia na parte inferior da cabine direciona as fibras para um dispositivo de coleta. Os fios recebem uma leve torção ao serem recolhidos pela bobina de coleta. A velocidade adotada é geralmente entre 200 e 400 m/min, mas pode chegar até 1000 m/min (HEARLE; WOODINGS, 2001). Após a saída da cabine, os filamentos entram em contato com um cilindro que transfere a estes uma solução lubrificante e antiestática de acabamento, que pode ser aplicada no fio antes do enrolamento. O processo de fiação do acetato é uma combinação de fiação e estiragem e na saída, os filamentos são recolhidos por um cilindro de tração que determina a velocidade de estiragem. Há, em seguida, o enrolamento dos filamentos (NETO, 1996).

Um estiramento de cerca de 100% é aplicado aos fios a partir da fieira, na parte superior da cabine. Este estiramento gera uma orientação molecular no filamento e oferece uma relativamente baixa resistência necessária para que o fio possa ser usado em aplicações têxteis. Não sendo necessário mais nenhum passo adicional a fabricação do fio (LANIEVE, 2007).

O título dos filamentos produzidos depende da taxa de fluxo de massa através dos orifícios da fieira, que é controlado pela bomba dosadora, e da velocidade de escoamento. A extensão do fio é influenciada pelo diâmetro dos orifícios, uma vez que depende da taxa de fluxo linear através da fieira e da velocidade de recolhimento. O título do fio é obtido pelo título do filamento, determinada como padrão, multiplicado pelo número de orifícios da fieira. Celanese Acetato®, a maior produtora mundial de fios de acetato, produz cerca de 16 combinações diferentes de tamanhos de filamentos e fios em variações adaptadas às diferentes aplicações. A gama de fios de 55 a 600 denier (60,5–660 dtex). O tamanho de filamento mais

comum está em torno de 3,7 denier (4,1 dtex), mas desce até 1,67 denier (1,84 dtex) 100/60 fios e até 6,25 denier (6,9 dtex) 200/32 fios (HEARLE, WOODINGS, 2001).

De modo geral, a fiação seca é um processo mais rápido e limpo que a fiação úmida e necessita menos trabalho. Cada quilograma de fibra de acetato produzida precisa de cerca de 0,65 kg de celulose, 1,5 kg de anidrido acético e 4 kg de ácido acético, dos quais cerca de 0,4 kg de celulose e 0,6 kg de compostos acético compõe as fibras. Além disso, 0,05 kg de ácido sulfúrico, 3 kg de acetona e 45 kg de água são usados. A recuperação eficiente da acetona evaporada da solução e do excesso de ácido acético dos estágios anteriores gera economia para a empresa (HEARLE e WOODINGS, 2001).

O principal produto fabricado de acetato de celulose é o tow, que é usado na indústria do tabaco como filtro para cigarros. Segundo Hearle, Woodings (2001), o tow é produzido de modo muito semelhante aos fios têxteis de acetato de celulose, com a combinação de vários fios de fieiras distintas para formar o tow, ao invés de serem enrolados individualmente em bobinas.

Há, no entanto, algumas diferenças. Os filamentos usados para a fabricação do tow têm o formato da seção transversal em Y. A forma de Y foi escolhida por aumentar o volume e a área de superfície disponível para interceptar as partículas de fumaça. Ainda mais importantes para um desempenho adequado do filtro, são a crimpagem e o enfardamento. Os fios individuais são lubrificados com uma mistura de óleo mineral e surfactante, eles são “secos” para remover a maioria dos solventes e então combinados em forma de tow. Depois de crimpar, o tow passa por uma nova etapa de secagem para remover qualquer resíduo de acetona e chegar a um nível de umidade controlada precisamente de 6% (HEARLE e WOODINGS, 2001).

Segundo Lanieve (2007) o sistema de recuperação do ácido acético é muito importante para a economia na produção do acetato de celulose. Aproximadamente, de 4 a 4,5 kg de ácido acético são recuperados a cada kg de acetato de celulose: cerca de 0,5 kg é consumido pelo produto e o restante de 4 kg é recuperado como ácido acético aquoso em cerca de 30% concentração. O ácido acético aquoso usado é extraído através de um sistema de extração continua líquido/líquido. São usados solventes orgânicos como o metiletil cetona ou o acetato de etila. A fase orgânica superior contendo o ácido acético glacial extraído é fracionada e destilada para recuperar os solventes para reciclagem. O ácido acético residual destilado vai para armazenamento. A camada aquosa inferior da extração que contém sais, oriundos em sua maioria da neutralização do ácido sulfúrico usado como catalisador, são

geralmente descartado. Parte do ácido recuperado pode ser convertido em anidrido acético. Isto é feito de forma eficiente por pirólise catalítica.

Para a fiação do acetato é necessário recuperar 3 kg de acetona para cada quilo de fibra produzida. O ar carregado de solvente saindo da cabine é passado para camas de adsorção de carbono ativado. Quando as estruturas estão saturadas com solvente, eles são destituídos do solvente com vapor. Os vapores resultantes vão para uma coluna de fracionamento onde o solvente é recuperado. Algumas vezes o ar carregado de solvente saindo da cabine é refrigerado para condensar e recuperar o solvente. É relatada uma recuperação em torno de 99%. A acetona oferece a vantagem da rápida adsorção do solvente tem um baixo ponto de ebulição, que melhora sua remoção das estruturas de carbono ativada pelo vapor; e não é corrosivo (LANIEVE, 2007).

2.7.2 Característica da fibra

Muitas propriedades são similares para o triacetato e o diacetato, mas os tecidos de triacetato apresentam uma textura que não aparenta uniformidade.

As interações entre as fibras em um tecido são complexas, mas o desempenho do tecido reflete em parte as propriedades inerentes da própria fibra, bem como as fibras são arrançadas. As fibras de triacetato e acetato de celulose não são particularmente fortes como poliéster ou poliamida, embora tenham resistência suficiente para as suas aplicações. A palavra chave para as fibras e tecidos de triacetato e acetato de celulose é suave como a seda, boa aparência e conforto. Estes tecidos são caracterizados no comércio como tendo toque macio e bom caimento. As características gerais de ambas as fibras é simplesmente um excelente balanço de propriedades e custo econômico (LANIEVE, 2007).

As propriedades e aplicações do triacetato e do acetato de celulose são determinadas com base na viscosidade da solução e no grau de esterificação, também conhecido como grau de substituição. A viscosidade da solução constitui um indicador do grau de polimerização, que influencia diretamente nas propriedades mecânicas das fibras, membranas ou filmes produzidos. O grau de esterificação define a solubilidade e a compatibilidade com plastificantes e outros polímeros e também exerce influência sobre as propriedades mecânicas do polímero (SILVA, G., 2002).

2.7.2.1 Tenacidade e alongamento

Triacetato: Possui tenacidade e alongamento variáveis, perdendo resistência quando molhado. Para um alongamento de 3% a elasticidade é de 88%, para um alongamento de 5% a elasticidade cai para cerca de 65%, e para 10% de alongamento a elasticidade é de 43% (NETO, 1996).

Diacetato: As fibras são comparativamente fracas, extensíveis e tem uma baixa rigidez. Segundo Neto (1996) suas propriedades de repelência a água garantem uma diminuição menos proporcional na tenacidade a úmido do que no caso da viscose.

2.7.2.2 Estrutura fina

Triacetato: As fibras submetidas a tratamentos de calor têm alta ordem de cristalinidade e orientação. Em decorrência da regularidade das moléculas do polímero, as fibras são parcialmente cristalinas.

Diacetato: Possui uma ordem muito baixa de cristalinidade e orientação das fibras (NETO, 1996).

2.7.2.3 Umidade

Triacetato: Possui “regain” de 3,5% sob condições padronizadas ($65 \pm 2\%$ UR e $21 \pm 1^\circ\text{C}$), na presença de água perde resistência. O “regain” é mais baixo e é ainda mais reduzida através da geração de calor (HEARLE; WOODINGS, 2001).

Diacetato: O “regain” em condições padronizadas é de 6,5% (NETO, 1996). A absorção de umidade é mais baixa que a do rayon viscose, mas a taxa de variação do teor de umidade é aproximadamente a mesma das faixas médias de umidade do algodão (HEARLE; WOODINGS, 2001).

2.7.2.4 Massa específica

Triacetato: De acordo com Neto (1996), apresenta uma massa específica de $1,30\text{g/cm}^3$, que é inferior à massa específica da viscose ($1,52\text{g/cm}^3$).

Diacetato: Tem massa específica de $1,32\text{g/cm}^3$, semelhante a da lã.

2.7.2.5 *Índice de refração*

Triacetato: Segundo Lanieve (2007), paralelo ao eixo da fibra, o triacetato possui o índice de 1,472, e perpendicular ao eixo da fibra, o índice é de 1,471, onde praticamente não há birrefringência.

Diacetato: Ainda segundo Lanieve (2007), paralelo ao eixo da fibra, possui o índice de 1,478, e perpendicular ao eixo da fibra, o índice de 1,473. Pouca birrefringência.

2.7.2.6 *Propriedades elétricas*

Triacetato: Excelente isolante para seu grupo, já que desenvolve cargas eletrostáticas rapidamente. Só as fibras sintéticas superam o triacetato quanto ao isolamento elétrico, com exceção das poliamidas (NETO, 1996).

Diacetato: É um bom isolante elétrico por desenvolver cargas eletrostáticas de modo muito rápido.

2.7.2.7 *Resistência à luz*

Uma característica similar a ambas as fibras de acetato, sofre uma perda progressiva de tenacidade pelas exposições aos raios ultravioleta. Após 200 horas de exposição à tenacidade cai em 15% (NETO, 1996).

Boa resistência à luz. Similares ao algodão e melhores que o rayon viscose, possuem melhor solidez da cor que a poliamida e seda são menos resistentes que as acrílicas e os poliésteres. As condições de exposição ao sol, como umidade relativa e temperatura, são fatores importantes na variação da taxa de perda de tenacidade.

2.7.2.8 *Resistência ao calor*

Triacetato: Sua temperatura de fusão está entre 290°C e 300°C, que o destaca no grupo das fibras termoplásticas. Começa a amolecer a cerca de 230°C e, quando em combustão, apresenta um resíduo duro e negro. Geralmente durante a fusão ocorre uma descoloração e decomposição (NETO, 1996).

Segundo Lanieve (2007), a fibra de triacetato de celulose sem tratamento térmico derrete em torno de 190°C a 205°C. Contudo, o tratamento das fibras tem um efeito profundo no aumento de sua resistência ao calor, elevando o ponto de amolecimento. O ponto de

amolecimento para tratamento térmico de triacetato de celulose é de cerca de 240°C. As fibras tratadas termicamente possuem maior resistência a mudanças físicas e químicas, uma taxa de absorção do corante mais baixa, e um aumento da estabilidade da cor da fibra tingida.

Diacetato: É um polímero termoplástico, fundindo em torno de 230 - 232°C. O diacetato decompõe, quando fundido, em exposição ao ar, ocorrendo um processo de oxidação.

Quando a fibra de diacetato de celulose é aquecida, amolece na faixa de 190°C a 205°C a mesma do triacetato de celulose. Esta fibra é considerada por ter boa resistência ao calor, tendo melhor resistência que a poliamida, algodão, rayon viscose, lã, seda, linho e polipropileno. Sua fusão não é estável como as das fibras de poliamida ou poliéster, que funde a uma temperatura ligeiramente superior (cerca de 268°C). A descoloração e decomposição progressivas do diacetato de celulose durante o derretimento deste polímero termoplástico, explica porque não é produzido comercialmente por fiação por fusão (LANIEVE, 2007).

2.7.2.9 Propriedades químicas

Triacetato: Não é afetado por soluções diluídas de ácidos, mas é decomposto por ácidos inorgânicos concentrados e é solúvel em ácido acético. É mais resistente que o acetato à ação de álcalis, não sendo afetados por álcalis com pH inferior ou igual a 9,8. Apresentando uma pequena perda de resistência em torno de 100°C. É solúvel em alguns solventes, como, por exemplo, clorofórmio ou cloreto de metileno, e aumentado de volume na presença de tricloroetileno (NETO, 1996).

Diacetato: Não é afetado por soluções diluídas de ácidos, sofre processo de decomposição na presença de ácidos inorgânicos concentrados. Álcalis concentrados provocam a retirada de grupos acetil com tendências a transformá-los em celulose regenerada. É solúvel em certos solventes orgânicos, tais como acetona pura e acetona a 80% (NETO, 1996). De acordo com Johnson (2001), o diacetato de celulose é solúvel em uma série de solventes orgânicos e incha na presença de outros, mas não é afetado por éter e é biodegradável.

2.7.2.10 Aparência e cor

Ambos os fios feitos de triacetato e diacetato de celulose são brilhantes e têm cores vivas, os fios opacos são muito brancos e uniformes. Os fios têm aparência macia como seda

(LANIEVE, 2007). Por causa da natureza termoplástica da fibra, é fácil moldar tecidos de acetato e triacetato, produzindo efeitos como o plissado.

2.7.2.11 Manutenção

Os procedimentos de manutenção são semelhantes para ambas às fibras, e segundo Neto (1996), por ter como característica a perda de resistência a úmido não devem ser processadas em máquinas de lavar. Os tecidos apresentam rápida secagem. As fibras proporcionam ótima estabilidade dimensional e podem ser passadas sem a necessidade de umidificar o tecido, em virtude de sua boa resiliência e de seu caráter termoplástico, mas a aderência ocorre a baixas temperaturas, assim deve-se tomar cuidado ao passar.

2.7.2.12 Resistência a micro-organismos

Triacetato: Mesmo sendo biodegradável é muito mais resistente ao ataque biológico do que o rayon viscose. Tem uma resistência a microrganismos e insetos elevada, aproxima-se de fibras como poliéster, acrílico e poliamida (HEARLE; WOODINGS, 2001).

Diacetato: Possui resistência ao ataque biológico elevada, sendo mais resistente que o algodão.

2.7.2.13 Capacidade de tingimento

Ambas as fibras podem ser tingidas. Para o tingimento, tanto das fibras como dos tecidos, são usado principalmente corantes dispersos, com obtenção de cores vivas e atraentes, com excelente solidez.

De acordo com Hearle; Woodings (2001), devido à falta de grupos reativos, o tingimento foi inicialmente um problema. Contudo, novas categorias de corante, notavelmente os corantes dispersos, adequados para o acetato foram desenvolvidos e uma vasta gama de cores pôde ser produzida. A fervura da água prejudica o brilho das fibras de acetato, assim a temperatura de tingimento deve ser mantida abaixo de 85°C.

2.7.2.14 Resistência à abrasão

Triacetato: Os tecidos de triacetato tratados termicamente têm maior resistência à tração e a abrasão do que os tecidos de diacetato, mas ainda é baixa (LANIEVE, 2007).

Diacetato: A resistência à abrasão é mais baixa compara com outras fibras. Sua baixa resistência à abrasão é causada em parte por ser uma fibra forte (LANIEVE, 2007).

2.7.3 Perfil do mercado

Segundo os dados apresentados por Vidal (2013), cerca de 97% da celulose produzida no mundo (em 2012) foi empregada na produção de papéis. O restante, usualmente denominada celulose para dissolução ou celulose solúvel, é usada na fabricação de outros produtos (produto, por exemplo, fibras têxteis, como a viscose, acetato, entre outras). A partir da década de 2000, o mercado da celulose solúvel que era considerado um mercado em declínio, mostrou uma boa recuperação até o ano de 2012 o *Compounded Annual Growth Rate* (CAGR – taxa média de crescimento anual) da demanda global foi de 5,3%, desempenho superior ao apresentado pela celulose destinada à fabricação de papéis.

O aumento da demanda vem sendo acompanhado com atenção por participantes tradicionais deste mercado e por produtores de celulose para papéis. Com o crescimento apresentado pelo mercado, produtores de alto custo vêm convertendo suas capacidades para celulose solúvel. Esses produtores, localizados majoritariamente na América do Norte e na Europa sofrem com a concorrência da celulose de baixo custo oriunda de países localizados no hemisfério sul, como o Brasil. Diversas das conversões realizadas no mundo permitiram aos produtores flexibilizar sua produção entre celulose para papel e solúvel, assim permitindo a produção de acordo com a demanda dos mercados (VIDAL, 2013).

A celulose solúvel é matéria-prima para a produção dos mais variados derivados de celulose como o acetato

A aplicação em maior volume de acetato de celulose é como uma fibra têxtil (roupas, cortinas e colchas), podendo ser encontrada como fibra curta, filamentos contínuos e os filtros de cigarro (tow), sendo hoje, esse o seu emprego mais comum. Aplicações em plástico de acetato de celulose e os derivados de ésteres mistos incluem armações de óculos, filmes fotográficos, pentes, cabos de escovas, filmes e chapas para sinais decorativos e vernizes e revestimentos protetores para automóveis e móveis de madeira (ODIAN, 2004).

O tow, ou filtro de acetato, é uma fibra celulósica feita a partir de flocos de acetato, usado na estrutura dos cigarros para barrar o alcatrão e outros produtos tóxicos presentes no cigarro antes deste chegar ao fumante, sua produção é limitada a poucos produtores (VIDAL, 2013).

O produto tem uma demanda limitada, principalmente na área têxtil. No mercado existem outros polímeros que superam o acetato em aplicabilidade e custo de produção como, por exemplo, o poliéster ou a poliamida. Por outro lado, existe um produto que possui um nicho consolidado, que é o tow para filtro de cigarro. Mas que também apresenta oscilações no consumo em diversos países devido às campanhas antitabagistas (PRWEB, 2011; VIDAL, 2013; LANIEVE, 2007).

Segundo Vidal (2013), a produção de acetatos se mantém estável, com uma pequena variação positiva até o ano de 2012, correspondendo a 14% da demanda global da produção de celulose solúvel, e sendo o segundo derivado de celulose mais produzido no mundo.

Dados mais atuais indicam que a Ásia é a região que mais utiliza e produz o acetato. A China consome grandes volumes na produção de filtros de cigarro, que são apenas parcialmente abastecidos pela produção local (IHS, 2001). Outro produto asiático que utiliza o triacetato são as telas de cristal líquido (LCDs), que tem ajudado neste quadro devido sua fabricação no Japão e Coreia do Sul. Apesar de tudo, Europa e Estados Unidos ainda representam mercados importantes para o acetato de celulose (PRWEB, 2011). No Brasil, a fibra não é muito utilizada, com exceção do tow, mas a produção está se voltando para a exportação. O polímero pode ser utilizado na produção de armação de óculos, plástico e filmes, ferramentas, objetos, entre outros. Como têxtil técnico, está presente no feltro de pontas de canetas, assim como membranas semipermeáveis e fios, utilizados em filtros de grande absorção, mantas e forros.

Como características interessantes, pode-se citar seu balanço entre a hidrofobidade e hidrofiliidade, o que lhe oferece uma boa resistência ao ataque por microrganismo e insetos melhor do que a da viscose, além possibilidade do reaproveitamento dos solventes usado tanto no processo de produção da fibra como na fiação (LANIEVE, 2007; NETO, 1996). Diferentemente de seus principais concorrentes sintéticos, o acetato de celulose é biodegradável, característica cada vez mais apreciada nos dias de hoje.

Entre os principais produtores mundiais de acetato de celulose podemos citar a *Celanese Corporation®*; *Celanese Acetate®*; *Daicel Chemical Industries®*; *Eastman Chemical Company®*; *Mitsubishi Rayon Company Limited®*; *Primester®*; *Rhodia Acetow®* e *SK Chemicals Co. Ltd.* (BUSINESS WIRE, 2011).

No Brasil, a *Rhodia Acetow®* é a principal produtora do acetato, fabricando os flocos do polímero, fibras e o cabo para filtro de cigarro usando como matéria-prima a pastas de celulose de madeira (RHODIA, 2014).

Neste estudo foi produzido acetato de celulose a partir de bagaço de cana-de-açúcar, utilizado para a produção de nano membranas através da eletrofiação.

2.8 ELETROFIAÇÃO

O termo fiação eletrostática, ou eletrofiação, é utilizado para descrever uma técnica de síntese de fibras onde é empregada a força eletrostática. A utilização de campo eletrostático em polímero fundido ou solução polimérica como forma de produzir fibras foi iniciada e patenteada por Formhals em 1934, entretanto o fenômeno foi primeiramente observada em 1987 por Rayleigh (ENGEL, 2011).

A eletrofiação é um método de produção de fibras superfinais, com diâmetros variando de 10 μm até 10 nm (WAN et al., 2004). O processo tem metodologia que possibilita uma grande variedade de material a serem trabalhados, como os polímeros biodegradáveis e a celulose, abrindo assim um vasto campo de estudo. Segundo Frey (2008), a eletrofiação é um método de fabricação de fibras onde é utilizado um sistema elétrico no lugar de uma força motriz mecânica.

A fusão do polímero ou da solução polimérica é forçada através de um capilar para formar uma gota. Sob a influência do campo eletrostático, essa gota de solução polimérica é deformada na ponta do capilar. Com o aumento da tensão elétrica, a superfície da gota se alonga formando um cone que é chamado como cone de Taylor. Quando as forças eletrostáticas superaram a tensão superficial, um jato fino carregado é ejetado. Nesse percurso o solvente evapora e as propriedades viscoelásticas do polímero fazem com que se divida em diversas nanofibras (LIM et al., 2010). Para eletrofiação de fibras a partir de soluções de polímeros, geralmente é escolhido um solvente volátil (FREY, 2008). O jato se movimenta em direção a uma placa de massa, atuando como contra eletrodo, onde essas nanofibras são recolhidas e formam uma manta conforme a Figura 7. Segundo Wan et al. (2004), os parâmetros de controle do processo são a pressão hidrostática no capilar e o campo elétrico externo. Viscosidade, condutividade, permeabilidade dielétrica, tensão superficial e gradiente de temperatura também afetam o processo.

Figura 7 - Esquema da eletrofiação

Fonte: BOTAS (2012)

Quando essa carga excede um valor crítico, ela supera a tensão superficial da solução, que sai em forma de um jato. Enquanto o jato viaja no ar, o solvente evapora e as propriedades viscoelásticas do polímero fazem com que se divida em diversas nanofibras, que são recolhidas em um coletor, que possui carga oposta a parte da extrusão, formando uma manta (LIM et al., 2010).

Os polímeros biodegradáveis são desenvolvidos para degradar-se pela ação de organismos vivos. Foi feito um progresso extraordinário no desenvolvimento de produtos e processos práticos a partir de polímeros como amido, celulose e o ácido láctico. A produção de fibras ultrafinas biodegradáveis por eletrofiação tem recebido muita atenção devido ao seu pequeno diâmetro, baixa densidade, alta área superficial específica e excelentes propriedades superficiais (JI-HUAN, 2008).

Existem ainda algumas dificuldades da eletrofiação de celulose, entre elas a interação do solvente convencional com o processo (LIM et al., 2010). O problema é que a celulose não funde (FREY, 2008) e deve ser trabalhada previamente para criar a solução necessária no processo de eletrofiação. Uma opção é converter a celulose em um derivado. Alguns estudos com derivados da celulose como a etilcelulose (EC), o hidroxipropil metilcelulose (HPMC) e o acetato de celulose (AC) obtiveram resultados positivos. Segundo Frey (2008), o grande desafio para esse tipo de fiação é formular uma solução que não necessite desta derivação.

Sob condições normais, a celulose é extremamente insolúvel em água, o que é necessário para sua própria função como sustentação estrutural nas paredes celulares vegetais (OGEDA E PETRI, 2010). Sendo assim, é necessário readequar a solução e todo o processo para que o solvente seja completamente eliminado durante o processo de fiação.

O acetato de celulose vêm sendo usado como matéria-prima na eletrofiação da celulose. Este derivado possui a vantagem de facilmente ser solubilizado em solventes adequados ao processo de eletrofiação e ser novamente convertido em celulose. Em diversas ocasiões, os solventes mistos têm sido bem sucedidos e incorporados em parte para realmente diminuir a taxa de evaporação do solvente, dando tempo para as fibras secarem antes de se solidificar no espaço de ar e evitando o entupimento na fiação de eletrofiação (FREY, 2008).

Liu e Hsieh exploram uma variedade de solventes para acetato de celulose adequados ao processo de eletrofiação incluindo acetona, DMAc, e ácido acético em misturas. Poucas fibras foram obtidas a partir da eletrofiação do acetato de celulose solubilizado em acetona ou ácido acético a 100% e não houve a formação de fibras de acetato de celulose solubilizado em DMAc 100%. A eletrofiação a partir do acetato de celulose solubilizado em ácido acético/DMAc resultou em fibras frisadas e finas. A formação de fibras a partir de acetona/DMAc foi estável e uniforme (FREY, 2008).

A morfologia das fibras varia tanto com a concentração de acetato de celulose em relação ao solvente, quanto com a proporção de acetona para DMAc no solvente (FREY, 2008). A espessura e a morfologia das fibras obtidas por eletrofiação a partir de soluções poliméricas dependem das propriedades físico-químicas destas soluções, como viscosidade, concentração das soluções, tensão superficial, a vazão da solução e distância entre a ponta da agulha e o coletor (CABRAL et al., 2009).

A eletrofiação representa uma opção interessante para processamento de biomateriais, com equipamentos simples. É uma das poucas técnicas para produzir micro e nanofibras.

Fibras poliméricas ultrafinas, obtidas por meio de eletrofiação têm uma vasta gama de aplicações potenciais, tais como filtragem de fluidos, produtos para biomedicina, suportes de catalisadores, liberação de medicamentos, a engenharia de tecidos, nanofios, entre outros (WAN et al., 2004).

Existem muitos parâmetros operacionais do processo de eletrofiação que influenciam na morfologia das fibras produzidas. Dentre estes estão algumas propriedades da solução polimérica, como viscosidade, tensão superficial e condutividade elétrica, e parâmetros do processamento, como a voltagem aplicada, condições ambientais umidade e distância entre o

coletor e a agulha (ENGEL, 2011). No Quadro 1 são citados alguns dos principais efeitos dos parâmetros da eletrofiação.

Quadro 1 - Principais efeitos dos parâmetros da eletrofiação na morfologia das fibras.

Efeitos na morfologia das fibras	
Parâmetros do processo	
Tensão aplicada	Um aumento da tensão aplicada provoca, geralmente, uma diminuição no diâmetro das fibras.
Caudal da solução	Uma diminuição do caudal provoca uma diminuição no diâmetro das fibras.
Distância entre a agulha e o coletor	Está relacionada com o tempo de voo da fibra. O aumento da distância aumenta o tempo de voo. A escolha do tempo de voo deve ter em conta a taxa de evaporação do solvente.
Parâmetros da solução	
Viscosidade	Com uma viscosidade reduzida podem surgir contas. Um aumento da viscosidade provoca um aumento no diâmetro das fibras, o que contribui para o desaparecimento de contas.
Condutividade	Um aumento na condutividade provoca uma redução no diâmetro das fibras.
Tensão superficial	Uma tensão superficial elevada pode resultar na formação de contas ou de apenas gotas, em vez de um fio polimérico.
Parâmetros ambientais	
Temperatura	Um aumento da temperatura provoca uma diminuição na viscosidade da solução, diminuindo o diâmetro das fibras. Também provoca um aumento na taxa de evaporação do solvente, se a evaporação for muito rápida a viscosidade do jacto aumenta, dificultando o estiramento das fibras.
Umidade	A umidade afeta a taxa de evaporação das soluções polimérica, o que pode favorecer ou atrasar a solidificação do jacto e afetar a morfologia das fibras.

Fonte: BOTAS, 2012

2.8.1 Parâmetros da solução

2.8.1.1 Viscosidade e massa molar da solução precursora

Uma das condições para a eletrofiação ocorrer com a formação das fibras é que a viscosidade e a massa molar da solução polimérica sejam adequadas ao processo de eletrofiação.

No caso de líquidos de baixa viscosidade de moléculas pequenas, o jato pode dividir-se em gotículas, como resultado da tensão superficial (conhecido como electrospraying). Para líquidos de alta viscosidade de macromoléculas, o jato não quebra, mas viaja como um jato para o alvo aterrado. Para soluções altamente viscosas ou polímeros fusionados, o processo pode ser utilizado em eletro-extrusão na indústria de plásticos (JI-HUAN, 2008).

A concentração e a massa molar do polímero em uma solução são fatores capazes de alterar a viscosidade de uma solução polimérica, sendo assim, a relação destes é direta com a viscosidade da solução. A massa molar representa o comprimento da cadeia polimérica, que determina a quantidade de entrelaçamentos das cadeias no solvente. Do mesmo modo, o aumento da concentração leva a um maior entrelaçamento das cadeias na solução, o que é necessário para que haja a continuidade do jato durante o processo de eletrofiação (ENGEL, 2011).

No caso de uma solução com baixa viscosidade, as gotas formadas na saída da agulha formarão filamentos quebradiços. Entretanto, aumentando a viscosidade há um aumento no diâmetro das fibras, pois há um aumento no número de moléculas passando pela agulha simultaneamente, gerando fibras mais uniformes e resistentes. No caso de viscosidades muito altas, a solução pode secar na ponta da agulha antes da eletrofiação ser iniciada. De modo que um balanço faz-se necessário para o sucesso da eletrofiação (ENGEL, 2011).

2.8.1.2 Tensão Superficial

A tensão superficial é um fator importante que afeta a morfologia das nanofibras e sua fiabilidade por eletrofiação. Quanto menor for a tensão superficial, menor será a tensão de limiar necessária para vencer a tensão superficial da solução eletrofiada (JI-HUAN, 2008).

A tensão superficial é uma tendência à concentração na superfície de um líquido, diminuindo a área da superfície de contato com outra fase. Na eletrofiação, para que haja a formação de fibras, as cargas induzidas no interior da solução polimérica devem ser altas o suficiente para vencer a tensão superficial da solução. Durante o movimento do jato em direção ao coletor, as cadeias poliméricas sofrem estiramento provocado pelo campo elétrico,

mas uma elevada tensão superficial tende a se opor as forças do campo, de modo que a solução forme gotas no meio do caminho ou grânulos na estrutura das fibras, o que é indesejado, além disso, soluções com alta tensão superficial geram fibras com maior diâmetro (ENGEL, 2011).

2.8.1.3 Condutividade elétrica da solução polimérica

Segundo Nista (2012) durante a eletrofiação o estiramento da fibra é causado pela repulsão das cargas na sua superfície. Deste modo, se a condutividade elétrica da solução polimérica se eleva, mais cargas podem ser carregadas pelo jato. A condutividade da solução pode ser ampliada pela adição de íons. Pequenas quantidades de sal ou polieletrólitos podem ser adicionadas à solução para aumentar as cargas e, conseqüentemente, ocorrerá o estiramento da fibra sem a formação de contas e a probabilidade de fibras com menor diâmetro aumentará.

Portanto, o aumento do estiramento da solução reduz o diâmetro das fibras, já que a presença de íons aumenta a condutividade da solução. Sendo que a voltagem crítica para ocorrência da eletrofiação diminui; entretanto, há um limite para a redução no diâmetro das fibras. Mais um efeito do aumento das cargas é a grande instabilidade gerada, resultando em um aumento na área de deposição das fibras (NISTA, 2012).

2.8.2 Parâmetros de Processo

2.8.2.1 Voltagem aplicada

A voltagem ou tensão aplicada na solução polimérica é um elemento fundamental na eletrofiação. Se a força elétrica for igual à zero ou baixa, a gota pendente da solução de polímero na ponta do capilar será deformada numa forma cônica, em que a tensão superficial é dominante. Se a tensão excede um valor limite, a força eletrostática vence a tensão superficial e um jato muito fino é ejetado iniciando o processo de eletrofiação (JI-HUAN, 2008).

Segundo Engel (2011), quando se aplica alta voltagem ocorre maior ejeção de polímero, o que facilita a formação de fibras com maior diâmetro. Com o aumento da voltagem, ou seja, com o aumento no campo elétrico, cresce a força eletrostática repulsiva no jato, favorecendo a redução do diâmetro das fibras. Na maioria dos casos, a alta voltagem levará ao maior estiramento do jato e a evaporação mais rápida do solvente ao longo do

caminho até o coletor, levando ao menor diâmetro das fibras, sob o efeito de altas voltagens há maior chance de formação de aglomerados nas fibras.

2.8.2.2 Vazão

A vazão é o parâmetro que determina a quantidade de solução polimérica disponível para eletrofição. Para uma determinada voltagem, existe uma vazão correspondente para manter o cone de Taylor estável. Quando a vazão é elevada, ocorre um aumento correspondente no diâmetro da fibra ou pode ocorrer à formação de contas (NISTA, 2012).

Quando a agulha é alimentada com um grande volume de solução, o solvente depositado na fibra pode não ter tempo suficiente para evaporar totalmente, ocasionando fibras fundidas com aspecto de uma teia. Sendo assim, a baixa vazão é desejada, pois o solvente terá maior tempo para evaporar (NISTA, 2012).

2.8.2.3 Distância da agulha ao coletor

A distância entre a agulha e coletor é outro fator estudado como sendo um meio de controle da morfologia e do diâmetro das fibras eletrofiadas. É necessária uma distância mínima entre a ponta do capilar e o coletor para que as fibras tenham tempo suficiente para secar antes de atingirem o coletor, de outro modo, com uma distância muito curta ou muito longa é possível observar a formação de aglomerados na estrutura das fibras (ENGEL, 2011).

2.8.2.4 Efeito do coletor

O campo elétrico existente entre a fonte e o coletor é essencial na eletrofição, sendo este o parâmetro mais importante do processo. O coletor deve ser feito de um material condutor, como uma folha ou placa de alumínio ou cobre, este é eletricamente aterrado para que haja uma diferença de potencial estável entre o coletor e a fonte. Quando é utilizado um coletor não condutor, as cargas rapidamente se acumulam, resultando em poucas fibras depositadas. As cargas das fibras devem ser dissipadas para que o coletor condutor promova uma maior atração das mesmas (NISTA, 2012).

De acordo com Nista (2012), quando a velocidade de depósito das fibras é alta e a nanomembrana grossa o suficiente, poderá ocorrer um alto acúmulo de carga residual na nanomembrana, já que polímeros geralmente não são condutores. Quando isso acontece, é comumente observado a olho nu, pequenas depressões na nanomembrana.

2.8.2.5 Temperatura

A temperatura é uma das condições que podem afetar a eletrofiação. Considerando que as variações na temperatura das soluções poliméricas afetam sua viscosidade (inversamente proporcional), pode-se afirmar que os efeitos causados pela elevação da temperatura são semelhantes aos da diminuição da viscosidade. Assim, diminuindo o diâmetro das fibras produzidas (ENGEL, 2011).

Segundo Nista (2012), a temperatura pode causar o aumento da taxa de evaporação do solvente e reduzir a viscosidade da solução polimérica. Quando a viscosidade é mais baixa, o aumento da temperatura eleva a mobilidade das moléculas de polímero. Deste modo as forças eletrostáticas são capazes de exercer uma força maior sobre a solução, estirando mais a solução, resultando em fibras com diâmetro menor.

2.8.3 Parâmetros do ambiente

2.8.3.1 Umidade

A umidade do ambiente pode ter influência no processo de eletrofiação. A alta umidade facilita a condensação de água na superfície das fibras, influenciando na sua morfologia. O aumento da umidade pode levar a formação de pequenos poros circulares na superfície das fibras. Por outro lado a baixa umidade favorece a evaporação rápida de um solvente volátil, podendo resultar em problemas como o entupimento da ponta do capilar, o que interrompe a formação das fibras (ENGEL, 2011).

2.9 ENZIMA BROMELINA

2.9.1 Enzimas

Enzimas são moléculas orgânicas presentes nas células de organismos vivos, tem a função de catalisar reações químicas. Aumentam a velocidade com a qual as reações alcançam o equilíbrio. Um catalisador aumenta a velocidade de reação, porém ele mesmo não é modificado durante o processo. Nos estágios intermediários da reação, a enzima liga-se à molécula que está sendo transformada e, à medida em que o produto é liberado, a enzima é regenerada na sua forma original (FERREIRA, 2007).

A catálise enzimática das reações é essencial para os sistemas vivos. Em condições biológicas relevantes, as reações não catalisadas tendem a ser lentas (FERREIRA 2007). As enzimas possuem atividade catalítica específica, apresentam elevada especificidade em relação aos reagentes cujas transformações químicas catalisam (MOURA, 2010).

Podem ser obtidas de fontes vegetais, animais e microbiana. Enzimas estão presentes em vários processos industriais como nas indústrias têxtil, farmacêutica, de alimentos e de papel e celulose (MONTEIRO; SILVA, 2009).

Emil Fischer postulou em 1894, que a especificidade das enzimas se origina no fato de que tanto as enzimas quanto os substratos são complementares geometricamente, um modelo que ficou conhecido com modelo “chave-fechadura” (MONTEIRO; SILVA, 2009). Uma reação catalisada enzimaticamente ocorre no interior dos limites de uma cavidade, ou fenda, na estrutura molecular da enzima chamada sítio ativo. Substrato é a molécula que se liga ao sítio ativo e que sofre a ação da enzima (MOURA, 2010).

A mudança provocada pelo calor e outros agentes é conhecida como desnaturação. A desnaturação gera modificações fundamentais nas proteínas, destruindo, em particular, a sua atividade fisiológica. Assim, quando uma solução aquosa de uma enzima, por exemplo, é aquecida até seu ponto de ebulição por determinado tempo e depois resfriada, a enzima torna-se insolúvel e, principalmente, não mais apresenta atividade catalítica. Outro fator que exerce grande influência na manutenção da atividade enzimática é o pH, devido a alterações no estado de ionização dos componentes do sistema, em consequência da variação da concentração de H^+ (BORRACINI, 2006; MOURA, 2010).

A desnaturação de proteínas pode ser provocada não apenas pelo calor, ou por valores inadequados de pH, mas também por solventes orgânicos, por solutos como a uréia, pela exposição da proteína a alguns tipos de detergentes, pela agitação vigorosa da solução proteica até a formação abundante de espuma, presença de certos íons ou sais caotrópicos na solução que contém as proteínas, oxidação, força iônica, entre outros (BORRACINI, 2006).

O estudo das enzimas também é de grande importância prática. Em algumas doenças, especialmente nas desordens genéticas hereditárias, pode ocorrer nos tecidos uma deficiência, ou mesmo a ausência total, de uma ou mais enzimas (FERREIRA, 2007).

2.9.2 Bromelina

A bromelina é o nome genérico dado ao conjunto de isoenzimas proteolíticas encontradas nos vegetais da família *Bromeliaceae*, da qual o abacaxi é a fonte mais rica e

conhecida. Esta enzima é utilizada em diferentes setores, todos baseados em sua atividade proteolítica, dentre as quais se destacam a propriedade de facilitar a digestão de proteínas, sendo, por isso, adicionada em medicamentos digestivos, e a capacidade de amaciamento de carnes (ABÍLIO et al., 2009).

É constituída por tiol-endorpeptidases e outros componentes como fosfatases, glucosidases, peroxidases, celulasas, glicoproteínas e carboidratos, além de vários inibidores de proteases. Este complexo enzimático pode ser extraído de diversas partes do abacaxi: polpa, caule, folhas e raízes (SILVA, 2008). Possui propriedades cicatrizantes e anti-inflamatórias, sendo muito interessante no tratamento de úlceras, edemas e ferimentos da pele, entre outras.

É uma cisteína proteinase, a planta *Ananas comosus* possui quatro cisteína proteinase distintas, duas delas no talo. A bromelina do talo é uma enzima sulfidrílica, grupamento essencial para a sua atividade proteolítica. Como característica das enzimas pertencentes a esse grupo, requer grupamentos sulfídricos livres para sua atividade catalítica. Agentes redutores como a cisteína, sulfetos, sulfitos e também cianetos atuam como ativadores da ação enzimática. A bromelina proveniente do fruto é uma proteína ácida, e seu ponto isoelétrico foi determinado por meio de focalização isoelétrica com o pH 4,6 e mudanças conformacionais irreversíveis ocorrem em valores de pH maiores que 10,3. A enzima presente no fruto é mais ativa com relação à caseína do que a enzima encontrada no talo (FERREIRA, 2007; MOURA, 2010)

Atualmente, a bromelina é preparada por meio da centrifugação, ultrafiltração e liofilização do suco de abacaxi resfriado, originando um pó amarelo, a atividade enzimática é mensurada com diferentes substratos como a caseína, gelatina ou tripeptídeos cromogênicos (SILVA, 2008).

De acordo com Silva, R. (2008), atua primariamente por ação proteolítica direta, hidrolisando ligações peptídicas. Esta ação proteolítica ocorre em proteínas solúveis, assim como nas proteínas estruturais de membrana, especialmente sobre os receptores e marcadores de superfície. A bromelina possui ainda atividade tiol-redutase, causando a ruptura de pontes dissulfeto entre cadeias peptídicas.

Os valores encontrados para o pH ótimo da bromelina estavam entre 4,5 e 7,0, onde apresentaram o máximo de atividade. Esses pHs correspondem aos pHs ótimos citados por diversos autores. Quanto aos valores para temperatura, a partir de 30°C houve uma elevação significativa da atividade que permaneceu até 40°C, ou seja, sua faixa de melhor aplicabilidade (FERREIRA, 2007).

A bromelina comercialmente disponível é a obtida do talo, apesar de grandes quantidades de resíduos do fruto oriunda das indústrias de conservas de abacaxi. A bromelina comercial não costuma ser pura, sendo as principais enzimas contaminantes outras enzimas proteolíticas e enzimas não proteolíticas, tais como: fosfatases, peroxidases, celulasas e outras glicosidases (FERREIRA, 2007).

Esta enzima possui diversos usos, todos baseados em sua atividade proteolítica, por exemplo, nas indústrias alimentícias e farmacêuticas. É utilizada no amaciamento de carnes, na clarificação de cervejas, na fabricação de queijos, no pré-tratamento de soja, no preparo de alimentos infantis e dietéticos, na indústria têxtil, no tratamento do couro, no tratamento da lã e da seda, no tratamento de distúrbios digestivos e feridas (FERREIRA, 2007).

Entre as diversas aplicações medicinais da enzima bromelina, pode-se citar seu uso no tratamento de queimaduras, prevenção de formação de edemas e diminuição dos já existentes, atua como agente anti-inflamatório, auxilia no preparo de colágeno hidrolisado, entre outros. Alguns dos efeitos da bromelina podem resultar de sua capacidade de alterar e modular estruturas de superfície de células distintas, através de seus peptídeos livres (SILVA, 2008).

Adicionado às suas atividades inflamatórias, anti-trombóticos e fibrinolíticos anti-edematoso, bromelinas têm provado ser seguras, sem efeitos colaterais indesejáveis após a administração oral (RÁBADE, 2011).

No presente estudo, a enzima bromelina foi imobilizada nas nanomembranas produzidas por eletrofiação a partir do triacetato de celulose de bagaço de cana-de-açúcar, com a finalidade de desenvolver um têxtil técnico destinado a aplicações médicas.

2.9.3 Imobilização

A entrega da droga através da pele pode oferecer diversas vantagens quando comparada as vias oral e tubária, por exemplo: não passar pelo hepático "primeira passagem" eliminação; manutenção de um nível de droga constante, prolongada e terapeuticamente eficaz no sangue ou tecido; o término rápido da entrega da droga; e melhora a adesão do paciente (WANG et al., 2002).

Uma grande variedade de tipos de suporte (sintéticos ou naturais) e técnicas tem sido utilizada para imobilização de enzimas, células e biomoléculas. A quantidade de proteína e enzima ligada ao suporte encontra-se dependente diretamente das condições da reação de acoplamento utilizada, como por exemplo: disponibilidade de grupamentos funcionais na

superfície do suporte e da enzima, tempo de reação, temperatura, pH e concentração da enzima (COSTA; REIS, 2004).

Segundo Sarbu (2005), a imobilização covalente de enzimas pode ser conseguida de várias maneiras, dependendo do suporte de polímero em que a ligação se destina. No estudo feito por ele, foi imobilizada uma xilanase em uma membrana de acetato de celulose. No processo utilizado foi enxertado um peróxido de radical livre, a fim de introduzir grupos CONH₂ sobre a superfície da membrana, seguido por sua ativação com glutaraldeído.

São muitas as abordagens físicas e químicas para a funcionalização da superfície de nanofibras eletrofiadas para entrega de drogas. Entre outras, enxerto na superfície, tratamento de plasma, método químico úmido, e co-eletrofiação de agentes ativos são algumas das diferentes estratégias de funcionalização de superfície das nanomembranas. É também pertinente observar que certos ligantes bioativos específicos imobilizados sobre as superfícies de nanofibras eletrofiadas melhoram a adesão celular, proliferação e diferenciação (KONWARH et al., 2013).

Os extratos de plantas com um elevado teor de enzimas proteolíticas têm sido utilizados na medicina tradicional por um longo período de tempo para o tratamento de diversas enfermidades. Um exemplo é a bromelina derivada de ananás, a qual tem se mostrado capaz de prevenir o edema, a agregação de plaquetas e metástase devido à sua capacidade de modificar estruturas de superfície de célula por clivagem peptídica (RÁBADE, 2011).

2.10 TÊXTEIS TÉCNICOS MÉDICOS

O tratamento de feridas tem como objetivo mais comum a proteção das lesões contra a ação de agentes externos físicos, mecânicos ou biológicos. Para cumprir esta tarefa geralmente faz-se a aplicação de curativos, uma cobertura sobre uma ferida limpa. Até o século 20, os recobrimentos de feridas eram considerados artigos passivos, com mínima influência no processo de cicatrização (NISTA, 2012).

A pele é a primeira barreira contra o ataque de agentes patogênicos no corpo humano. Quando é rompida, seja por trauma, cirurgia, ou outros procedimentos invasivos, o corpo fica vulnerável a invasão microbiana. Em geral, o tratamento de feridas na pele exige o uso de um medicamento antimicrobiano para evitar ou combater infecções, devido à exposição da pele ao meio externo, onde o contato com os microrganismos é constante e inevitável (NISTA, 2012).

Os materiais têxteis têm crescido em importância no campo da medicina, encontrando cada vez mais aplicações à medida que novas pesquisas têm sido realizadas neste domínio. Podem ser definidos como têxteis médicos todos os têxteis técnicos utilizados na medicina (RAMOS, 2003).

Os têxteis técnicos médicos podem ser classificados pela sua área de atuação, sendo definidos como cirúrgicos ou extra-corporais. Os têxteis cirúrgicos podem ser subdivididos em: implantáveis são aqueles que servem como substitutos artificiais de alguma parte defeituosa do corpo (suturas, ligamentos artificiais, entre outros); não-implantáveis são utilizados para aplicações externas no corpo humano, com ou sem contato com a pele (emplastos, gazes, etc); e de proteção que destinam-se a proteger o paciente e também os profissionais de qualquer contato com fluidos possivelmente contaminados (batas, gorro, etc). Os têxteis técnicos médicos extra-corporais são mecanismos utilizados em geral para a purificação do sangue, e incluem membranas utilizadas em rins, fígados e pulmões artificiais (RAMOS, 2003).

Deve-se ter cuidado ao realizar curativos, pois esses podem ocasionar traumas mecânicos. O atrito entre a gaze e o ferimento, o excesso de pressão durante a limpeza, utilização de coberturas inadequadas ao tipo de ferimento entre outros fatores, podem dificultar o processo de cicatrização, ou mesmo ocasionando outros traumas menores ao redor da ulcera.

O curativo tido como ideal deve seguir os seguintes parâmetros: capacidade de remoção do exudato, manter a alta umidade entre a ferida e o curativo, permitir as trocas gasosas, ser impermeável a bactérias, fornecer isolamento térmico, ser isento de substâncias tóxicas e permitir a remoção sem causar traumas locais (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2002).

No âmbito têxtil, o curativo ideal deve ter uma alta porosidade, capacidade de absorção de fluidos adequados, possuir matéria-prima ou tratamento com propriedades antibacterianas e ser biocompatível com o tecido humano.

Os polímeros aplicados a área médica devem possuir propriedades mecânicas e físicas adequadas. Devem ter compatibilidade celular e/ou sanguínea e apresentar resistência a esterilização e serem suficientemente estáveis a temperatura ambiente (SHISHOO, 1999).

As fibras sintética comparadas às fibras naturais tendem a apresentar propriedades mecânicas, resistência à tração e o módulo superiores. São mais fáceis de serem projetadas para aplicações específicas, além de dispensar os métodos de purificação que acompanham as matérias-primas naturais. Porém, as fibras naturais apresentam propriedades bioativas

multifuncionais que lhes conferem desempenho superior em sistemas biológicos devido a maior biocompatibilidade (BIZARRIA, 2009).

As fibras de acetato de celulose obtidas a partir de celulose pura e de bagaço, produzidas por Alves Filho (2007), apresentaram capacidade de absorção de água na faixa de 60 – 86%. O que torna essas fibras interessantes para determinadas aplicações médicas. Por exemplo, para cobertura de ferimentos que apresentam secreção, uma vez que essas fibras tem uma boa capacidade de absorção e podem promover a secagem do ferimento. O perfil de perda de massa variou na faixa de 2,5 – 26% em 30 dias.

No Quadro 2 a seguir, pode-se observar alguns exemplos de curativos e bandagem disponíveis no mercado.

Quadro 2 - Exemplos de curativos e bandagens comercializados e suas aplicações.

Curativo (Nome comercial)	Aplicação	Referências
Curativo Tegaderm Hidrocolóide®	Indicado para proteção de pele submetida à fricção e stress mecânico;	http://solutions.3m.com.br
Película Protetora sem Ardor Cavilon®	Solução polimérica que, aplicada à pele, forma uma película protetora incolor e transparente, tornando-se uma barreira protetora contra fluídos corpóreos, drenantes de ostomias, fístulas, lesões cutâneas provocadas por trocas frequentes de curativos e/ou bolsas (produtos adesivos);	http://solutions.3m.com.br
Curativo Tegaderm® Filme transparente	Filme permeável ao oxigênio e ao vapor d'água oferecendo barreira contra líquidos e bactérias;	http://solutions.3m.com.br
Curativo Tegaderm Alginato®	Altamente absorvente, formando um gel ao entrar em contato com o exsudado da ferida favorecendo sua cicatrização. Pode ser aplicado em feridas com nível de exsudação de moderado a intenso, absorvendo em até 20 vezes o seu peso em exsudado;	http://solutions.3m.com.br
ACTISORB PLUS®	curativo Actisorb Plus 25, curativo de carvão ativado e prata. Indicado para uso em feridas infectadas para minimizar o odor e tratar infecção. É um curativo com ação microbicida tópica que não desenvolve resistência. Entre outros produtos.	http://reabmed.com.br

Fonte: Elaborado pelo autor

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O presente estudo teve como objetivo utilizar o triacetato de celulose obtido a partir da celulose do bagaço da cana-de-açúcar para o desenvolvimento de nanomembranas produzidas por meio de eletrofição e a imobilização da enzima bromelina nas nanomembranas eletrofiadas.

Para atingir o objetivo principal foram propostos os seguintes objetivos específicos:

- Estudar as condições de preparação do acetato de celulose;
- Estudar as condições de preparação das nanomembranas eletrofiadas;
- Caracterizar os materiais produzidos por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e quanto a viabilidade celular; Calorimétrica Exploratória Diferencial (DSC – *Differential Scanning Calorimetry*), Análise Termogravimétrica (TGA/DTG), Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR), por, absorção de umidade e perda de massa;
- Estudo da imobilização da enzima bromelina na estrutura das nanomembranas.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

Todos os solventes utilizados neste estudo foram de grau analítico.

Acetato comercial: O acetato de celulose utilizado foi com ($M_w \sim 31,000$) distribuído pela Sigma Aldrich®.

Celulose comercial: Celulose de linters de algodão microgranulada utilizada distribuído pela Sigma Aldrich®.

Celulose de bagaço de cana-de-açúcar

A celulose de bagaço utilizada neste estudo foi cedida gentilmente pela Professora Dr. Sirlene Maria da Costa da Escola de Artes, Ciências e Humanidades da Universidade de São Paulo. A celulose foi obtida a partir do bagaço contendo: glucana (43,1%), lignina klason (27,6%), lignina solúvel (1%), cinzas (2,8%) após o processo de polpação Soda/Antraquinona e branqueamento com peróxido de hidrogênio. A polpa obtida foi caracterizada quanto à composição química apresentando: celulose (93,7%), polioses (1%) e lignina (0,8%) (COSTA, 2013).

4.2 MÉTODOS

4.2.2 Produção de triacetato de celulose

Foram produzidos triacetato de celulose com celulose comercial Sigma Aldrich® e com celulose de bagaço de cana-de-açúcar.

Para o preparo do triacetato foram adicionados a um balão, com capacidade de 250 mL, 1g de celulose do bagaço da cana-de-açúcar e 67 mL de ácido acético (99,7 %). A mistura foi agitada por 30 min. Em seguida, foram adicionados ao balão 1 mL de ácido sulfúrico (95-99 %) e 33 mL de ácido acético (99,7 %), e mantida sob agitação por 25 min. Depois desse período, a mistura foi retirada e filtrada. A solução filtrada foi devolvida ao balão e adicionados 67 mL de anidrido acético (97%). A celulose filtrada foi adicionada ao balão, e a mistura foi mantida sob agitação por mais 30 min. Após o período de 30 min, a mistura foi mantida em repouso por 14 h (Figura 8). Após esse período de 14 h, foram adicionados 400 mL de água destilada, e a solução filtrada a vácuo (Figura 9). Foi realizada

lavagem com uma solução de 10% carbonato de sódio e sucessivas lavagem com água destilada até a neutralização do pH. O acetato foi seco a 40°C por 24 h e moído em almofariz de porcelana até se tornar pó (CERQUEIRA et al. 2010; CRUZ, 2010).

Figura 8 - Processo de acetilação da celulose do bagaço da cana-de-açúcar.

Figura 9 - Filtração do triacetato de celulose produzido.

4.2.3 Determinação do grau de substituição (GS) do triacetato de celulose

Foi determinado o grau de substituição do acetato de celulose comercial Sigma Aldrich®, do triacetato de celulose produzido com celulose comercial Sigma Aldrich® e do triacetato de celulose produzido com celulose de bagaço de cana-de-açúcar.

O teste foi realizado por meio de uma reação de saponificação de acordo com o procedimento descrito por Rodrigues et al., (2000). Foram pesados 0,10 g de acetato de celulose e adicionado 5 mL de hidróxido de sódio a 0,25 mol.L⁻¹ e 5 mL de etanol, a mistura foi mantida em repouso. Após o período de 24 h foi adicionado 10 mL de ácido clorídrico a 0,25 mol.L⁻¹, a mistura foi mantida em repouso por mais 30 min, em seguida a solução foi titulada com hidróxido de sódio 0,25 mol.L⁻¹, utilizando-se o indicador fenolftaleína. O procedimento foi realizado em triplicata.

O grau de substituição foi calculado pela equação 1:

$$\% GA = \frac{[(V_{bi} + V_{bt})\mu b - (V_a.\mu a)]M.100}{mac} \quad (\text{Equação 1})$$

Em que: %GA = Porcentagem de grupos acetila; Vbi = Volume de hidróxido de sódio adicionado; Vbt = Volume de hidróxido de sódio obtido na titulação; μ_b = Molaridade do hidróxido de sódio; Va = Volume de ácido clorídrico adicionado; μ_a = Molaridade do ácido clorídrico adicionado; M = Massa molar dos grupos acetil; mac = Massa de acetato de celulose utilizada.

Para determinar o grau de substituição (GS) por via química é feita a determinação da porcentagem (% m/m) de grupos acetila (GA) substituídos na cadeia celulósica, um material totalmente acetilado teria %GA de 43,50% e um GS de 2,88. Assim os valores para o GS dos acetatos produzidos foram calculados a partir de uma regra de três simples (MEIRELES, 2011; CANDIDO, 2011).

4.2.4 Preparo das soluções poliméricas de Triacetato de Celulose

Para a solubilização dos polímeros foram selecionados três solventes diclorometano, dimetilformamida (DMF) e acetona. As concentrações utilizadas são apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2 - Soluções poliméricas preparadas para o processo de eletrofiiação.

Soluções poliméricas
Solução de TAC 6% m/m diclorometano/DMF 90:10 m/m
Solução de TAC 6% m/m diclorometano/DMF 85:15 m/m
Solução de TAC 18% m/m acetona/DMF 85:15 m/m
Solução de TAC 15% m/m acetona/DMF 85:15 m/m
Solução de TAC 15% m/m 70/30 m/m Sigma®/Bagaço acetona/DMF 85:15 m/m

4.2.4.1 Solução de triacetato de celulose (TAC) 6% m/m em diclorometano/DMF 90:10 m/m

Foi preparada uma solução de diclorometano e dimetilformamida (DMF) 90:10 m/m e 6% de triacetato de celulose comercial Sigma® (TAC), a solução permaneceu sob agitação bem vedada por cerca de uma hora. A concentração de 6% de triacetato de celulose foi definida com base nos trabalhos de Meireles, (2007).

4.2.4.2 Solução de triacetato de celulose TAC 6% m/m em diclorometano/DMF 85:15 m/m

Foi preparada uma solução de diclorometano e dimetilformamida (DMF) 85:15 m/m e 6% de triacetato de celulose comercial Sigma® (TAC), a solução permaneceu sob agitação bem vedada por cerca de uma hora. A concentração de 6% de triacetato de celulose foi definida com base nos trabalhos de Meireles, (2007).

4.2.4.3 Solução de triacetato de celulose TAC 18% m/m em acetona/DMF 85:15 m/m

Foi preparada uma solução de acetona e dimetilformamida (DMF) 85:15 m/m e 18% de triacetato de celulose comercial Sigma® (TAC), a solução permaneceu sob agitação bem vedada por cerca de uma hora. A concentração de 18% de triacetato de celulose e a proporção dos solventes foi definida com base nos trabalhos de Nista, (2012).

4.2.4.4 Solução de triacetato de celulose TAC 15% m/m em acetona/DMF 85:15 m/m

Foi preparada uma solução de acetona e dimetilformamida (DMF) 85:15 m/m e 15% de triacetato de celulose comercial Sigma® (TAC), a solução permaneceu sob agitação bem vedada por cerca de uma hora. A concentração de 15% de triacetato de celulose e a proporção dos solventes foi definida com base nos trabalhos de Nista, (2012).

4.2.4.5 Solução de triacetato de celulose TAC 15% m/m misto (70:30 m/m TAC sigma®/bagaço) em acetona/DMF 85:15 m/m

Foi preparada uma solução de acetona e dimetilformamida (DMF) 85:15 m/m e 15% de triacetato de celulose (TAC), dividido entre 70% acetato comercial Sigma® e 30% acetato de bagaço de cana-de-açúcar. A solução permaneceu sob agitação bem vedada por cerca de uma hora. A concentração de 15% de triacetato de celulose e a proporção dos solventes foi definida com base nos trabalhos de Nista, (2012).

Na Figura 10 a solubilização da mistura de triacetato de celulose de bagaço de cana-de-açúcar e triacetato de celulose Sigma® em mistura de solventes: acetona e dimetilformamida.

Figura 10 - Solubilização do triacetato de celulose do bagaço de cana-de-açúcar.

4.2.4.6 Solução de triacetato de celulose TAC 15% m/m misto (70:30 m/m TAC sigma®/bagaço) em acetona/DMF 85:15 m/m com 10mg/g de enzima Bromelina imobilizada

Foi pesado 0,0264 g da enzima bromelina e adicionada a solução preparada de acetona e DMF 85:15 m/m. A solução foi agitada até a completa dissolução da enzima. Foi adicionado a solução da enzima 15% de triacetato de celulose (TAC), dividido entre 70% acetato comercial Sigma® e 30% acetato de bagaço de cana-de-açúcar. A solução permaneceu sob agitação bem vedada por cerca de uma hora.

4.2.5 Eletrofiação das soluções poliméricas.

Durante o processo de eletrofiação das soluções de triacetato de celulose foram testadas as seguintes condições: voltagem (25 kV), fluxo de escoamento (2 - 4 mL/h) e distância de (7-12 cm). Os parâmetros foram definidos inicialmente com base na bibliografia consultada, principalmente Nista (2012) e foram otimizados ao longo do processo.

A eletrofiação foi realizada utilizando-se um sistema constituído por uma fonte de alta tensão, um coletor constituído por uma placa metálica com as dimensões de 20 x 20 cm, conectado a um eletrodo terra e um capilar. O capilar foi constituído por uma seringa de plástico de 10 mL e uma agulha metálica conectada também a um polo elétrico. A vazão foi controlada por uma bomba onde uma seringa foi encaixada de modo a manter o fluxo de solução constante. Em cada teste foram eletrofiados aproximadamente 6 a 7 mL de solução polimérica. As soluções de triacetato de celulose foram eletrofiadas em uma temperatura que variou entre 14 a 18°C e umidade em torno de 50%UR. Na Figura 11 a seguir pode-se observar a eletrofiação da solução de triacetato de celulose acetona/dimetilformamida 85:15 m/m a 15% de triacetato de celulose.

Figura 11 - Processo de eletrofição de nanomembrana de triacetato de celulose.

4.2.6 Imobilização da enzima bromelina

Neste estudo seis amostras das nanomembranas eletrofiadas a partir da solução polimérica de TAC 15% m/m 70/30 m/m Sigma®/Bagaço acetona/DMF 85:15 m/m foram cortadas com furador manual de 2 cm de diâmetro, e secas a 30°C por 24 horas. Após esse período foram imersas em 10 mL de uma solução de aminopropiltietoxisilano 2,5% (v/v) a 30°C por 24h (COSTA et al., 2004). Depois desse período foram lavadas 3 vezes com água destilada e foram imersas em 10 mL de uma solução glutaraldeído 1% (v/v). As amostras 1, 2 e 3 permaneceram na solução de glutaraldeído por 4h e as amostras 4, 5 e 6 permaneceram na solução por 24 horas. Ao termino do tempo imersas as amostras foram lavadas 3 vezes e em seguida foram imersas em 10 mL de uma solução de enzima (5 mg/g membrana) por 24 horas. As amostras foram lavadas com 10 mL de tampão fosfato de potássio. A atividade enzimática na solução inicial e após a imobilização foram determinadas de acordo com os itens 4.2.9. A recuperação em proteínas e o rendimento de imobilização foram calculados de acordo com os itens 4.2.7.1.

A incorporação da enzima diretamente na solução polimérica eletrofiada também foi testada de acordo com o descrito no tópico 4.2.8.

4.2.7 Rendimento do processo de imobilização em termos de proteínas totais e atividade recuperada

4.2.7.1 Recuperação em proteína

A quantidade de proteína imobilizada na nanomembrana foi determinada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976), conforme descrito no item 4.2.9.2 e os cálculos foram efetuados pela equação 2 (GALLIFUOCO et al., 1998).

$$RP = \left(\frac{P_{ads}}{P_0} \right) \times 100 \quad (\text{Equação 2})$$

Em que: P_0 = Proteína disponível para a imobilização (mg), e $P_{ads} = (P_0 - P_s - P_f)$, a quantidade de proteína absorvida ao suporte foi determinada como a diferença entre P_0 e as proteínas que permanece no sobrenadante (P_s) e nos filtrados (P_f) no final do processo de imobilização (mg).

4.2.7.2 Rendimento do processo de imobilização (RI)

O rendimento do processo de imobilização foi calculado pela equação 3.

$$RI = \left(\frac{U_{act}}{U_{ads}} \right) \times 100 \quad (\text{Equação 3})$$

Em que: U_{act} = Unidades de atividade enzimática fornecida para imobilização, e $U_{ads} = (U_{act} - U_s - U_f)$, as unidades de enzima total absorvida pelo suporte é dada pela diferença entre as unidades fornecidas para a imobilização U_{act} e as unidades residuais presentes no sobrenadante (U_s) e filtrados ao final do processo de imobilização permanece no sobrenadante (P_s) e nos filtrados (P_f) no final do processo de imobilização (mg).

4.2.8 Estudo de liberação da enzima bromelina

Para os estudos da cinética de liberação *in vitro* da enzima bromelina os experimentos foram realizados em triplicata. Foram cortadas três amostras de 10 cm de comprimento por 1 cm de largura, das nanomembranas eletrofiadas a partir da solução polimérica de triacetato de celulose TAC 15% m/m misto (70:30 m/m TAC sigma®/bagaço) em acetona/DMF 85:15 m/m com 10mg/g de enzima Bromelina imobilizada, como o descrito

no item 4.2.4.6. As amostras foram imersas em uma solução salina tampão de fosfato pH $7,4 \pm 0,2$ e mantidas em uma incubadora, com agitação constante de 60 rpm, a temperatura de 37°C . Foi coletado 1 mL da solução em intervalos de 1, 2, 3, 4, 7 e 10 dias.

4.2.9 Determinação da atividade enzimática e concentração para a enzima bromelina

4.2.9.1 Atividade da bromelina

A determinação da atividade proteolítica foi realizada conforme modificações das metodologias propostas por KUNITZ (1947) e WALTER (1984).

4.2.9.1.1 Preparo dos reagentes

Foram preparados 100 mL de NaOH 1 M, dissolvendo-se 4 g de NaOH em 100 mL de água. O tampão fosfato 1 M pH 7,5, foi preparado com 34 g de KH_2PO_4 em 250 mL de água e 43,5 g de K_2HPO_4 em 250 mL de água. O pH foi ajustado para 7,5 com KH_2PO_4 que foi adicionado ao K_2HPO_4 . O ácido clorídrico, HCl 1 M foi preparado adicionando 9,8 mL de HCl (32%) em 72 mL de água. O HCl 0,05 mol/L foi preparado diluindo 1 mL da solução HCl 1 M em 19 mL de água destilada. O ácido tricloroacético (TCA) 0,3 mol/L foi preparado dissolvendo-se 4,9 g de TCA em 100 mL de água. (ou diluindo-se 30 mL de TCA 15% para 90 mL). O NaOH 0,5 mol/L foi preparado diluindo 50 mL solução de NaOH 1M em 50 mL de água destilada.

4.2.9.1.2 Solução tamponada de caseína (2% m/v; fosfato 0,1 M, pH 7,5)

Em um béquer de 250 mL foram colocados 2 g de caseína e 5 mL de água destilada e 1 mL de NaOH 1 M e 30 mL de água destilada. A solução foi agitada com agitador magnético até dissolver completamente a caseína. Foram adicionados 5 mL de tampão fosfato 1 M pH 7,5 para clarear a solução. O pH 7,5 foi ajustado com HCl 1M e a solução diluída para 100 mL com água destilada.

4.2.9.1.3 Solução estoque de tirosina (5 mmol/L) para construção da curva padrão

Foram dissolvidos 45,3 mg de tirosina em 50 mL da solução de HCl 0,05 mol/L. A partir dessa solução foram preparadas as diluições: 3 (P0), 2 (P1), 1 (P2), 0,5 (P3) e 0,25 (P4) mM.

4.2.9.1.4 Procedimento para construção da curva padrão

Os experimentos foram realizados em triplicatas. Em cada tubo de Falcon de 15 mL foram pipetados 2,5 mL de solução padrão de tirosina (P0, P1, P2, P3, P4). Os tubos foram colocados em um banho a 37°C por 5 min, depois foram adicionados 0,2 mL de HCl 0,05 M. Os tubos foram colocados novamente no banho a 37°C por 10 min. Após os 10 min as reações foram interrompidas utilizando o ácido tricloroacético. Os frascos com as amostras foram deixados em repouso por 10 min a temperatura ambiente. Após esse período as amostras foram centrifugadas a 4000 g por 20 min a 28°C.

4.2.9.1.5 Medida de atividade

Para determinação da atividade foram colocados 2,5 mL de hemoglobina 2%, pH 7,5, tampão fosfato 0,1 M em tubos de falcon de 15 mL. Os tubos foram colocados em um banho a 37°C por 5 min, depois foram adicionados 0,2 mL de HCl 0,05 M. Os tubos foram colocados novamente no banho a 37°C por 10 min. Após os 10 min as reações foram interrompidas utilizando o ácido tricloroacético. Os frascos com as amostras foram deixados em repouso por 10 min a temperatura ambiente. Após esse período as amostras foram centrifugadas a 4000 g por 20 min a 28°C. A leitura de absorbância do sobrenadante foi feita a 280 nm.

4.2.9.1.6 Branco do aparelho

Foi preparado colocando 2,5 mL de HCl 0,05 M em tubos de falcon de 15 mL. Os tubos foram colocados em um banho a 37°C por 5 min, depois foram adicionados 0,2 mL de HCl 0,05 M. Os tubos foram colocados novamente no banho a 37°C por 10 min. Após os 10 min as reações foram interrompidas utilizando o ácido tricloroacético. Os frascos com as amostras foram deixados em repouso por 10 min a temperatura ambiente. Após esse período as amostras foram centrifugadas a 4000 g por 20 min a 28°C.

4.2.9.1.7 Branco da amostra (B1)

Foi preparado colocando 2,5 mL de HCl 0,05 M em tubos de falcon de 15 mL. Os tubos foram colocados em um banho a 37°C por 5 min, depois foram adicionados 0,2 mL da amostra. Os tubos foram colocados novamente no banho a 37°C por 10 min. Após os 10 min as reações foram interrompidas utilizando o ácido tricloroacético. Os frascos com as amostras foram deixados em repouso por 10 min a temperatura ambiente. Após esse período as amostras foram centrifugadas a 4000 g por 20 min a 28°C.

4.2.9.1.8 Branco do substrato (B2)

Foram colocados 2,5 mL de hemoglobina 2%, pH 7,5, tampão fosfato 0,1 M em tubos de falcon de 15 mL. Os tubos foram colocados em um banho a 37°C por 5 min, depois foram adicionados 0,2 mL de HCl 0,05 M. Os tubos foram colocados novamente no banho a 37°C por 10 min. Após os 10 min as reações foram interrompidas utilizando o ácido tricloroacético. Os frascos com as amostras foram deixados em repouso por 10 min a temperatura ambiente. Após esse período as amostras foram centrifugadas a 4000 g por 20 min a 28°C. A leitura de absorbância do sobrenadante foi feita a 280 nm.

A atividade foi calculada através de:

$$AT = AB1 - AB2 \quad (\text{Equação 4})$$

Em que: (AT) absorbância da amostra, (AB1) absorbância do branco da amostra e (AB2) absorbância do branco do substrato. Com absorbância AT encontra-se, na curva de calibração, a concentração de tirosina, C_{tirosina} , produzida pela ação da protease presente em 0,2 mL de amostra em 10 min a 37°C. O resultado final, em atividade enzimática, é dado por

$$\text{Atividade} = 3,75 \times C_{\text{tirosina}}$$

4.2.9.2 Proteína

A determinação da concentração de proteína foi realizada utilizando o método de BRADFORD, (1976) que se baseia na mudança de cor da solução ácida do Coomassie Brilliant Blue G 250, quando se liga a uma proteína a absorbância máxima muda de 465 nm para 595 nm. Para a preparação do reagente foi pesado 100 mg de Coomassie Blue e foi adicionado sob agitação a 50 mL de etanol (95%) e posteriormente 100 ml de ácido

fosfórico (85%); o volume final foi ajustado para 1000 ml com água destilada. Foram preparadas soluções de BSA com concentrações conhecidas de 50, 100, 200, 300, 400 e 500 mg/L, utilizando-se água destilada como solvente. Para a leitura das amostras foi pipetado 100 μ L de cada uma das concentrações que foram adicionadas em tubos de ensaios. Para concentração preparada à análise foi realizada em triplicata. Em cada um dos tubos adicionou-se 5 ml do reagente Coomassie Blue, a mistura foi agitada em vortex e a solução foi mantida em repouso durante 5 minutos. Após 5 minutos foi feita a leitura da densidade ótica a 595 nm, contra um branco preparado do mesmo modo, mas com 100 μ L de água destilada. Calculou-se a média do resultado obtido para cada concentração e esses valores foram colocados numa curva-padrão de Concentração de proteína (mg/L) versus ABS (nm). A equação da reta obtida através da curva padrão foi utilizada para a determinação das concentrações desconhecidas de proteínas.

Figura 12 - Curva padrão da concentração de proteína (mg/L) versus ABS (nm).

4.2.10 Estudos de degradação das nanomembranas

Foram cortadas 21 amostras nanomembranas com o auxílio de um vazador manual de 2 cm de diâmetro, pesadas e imersas em três soluções distintas: solução que simula o suor humano da superfície da pele ácido e básico e em solução PBS pH $7,4 \pm 2$, de acordo com os procedimentos descritos na norma ISO 105-E04:1994.

A solução que simula o suor humano ácido foi preparada solubilizando 0,5 g de monoclórohidrato de L-histidina ($C_6H_9O_2N_3 \cdot HCl \cdot H_2O$), 5,0 g de cloreto de sódio (NaCl), 2,2g de ortofosfato monossódico dihidratado ($NaH_2PO_4 \cdot 2 H_2O$) em 1L água destilada e

autoclavada. A solução foi ajustada ao pH ($5,5 \pm 0,2$) com uma solução a 0,1 mol/L (4 g/L) de hidróxido de sódio (NaOH).

A solução que simula o suor humano alcalino foi preparada solubilizando 0,5g de monoclórohidrato de L-histidina ($C_6H_9O_2N_3.HCl.H_2O$), 5,0 g de cloreto de sódio (NaCl), 5,0 g de ortofosfato dissódico dodecahidratado ($Na_2HPO_4.12 H_2O$) em 1L água destilada e autoclavada. A solução foi ajustada ao pH ($8,0 \pm 0,2$) com uma solução a 0,1 mol/L (4,0 g/L) de hidróxido de sódio (NaOH).

A solução de PBS foi preparada dissolvendo 43,5g de K_2HPO_4 em 250 mL de água destilada e autoclavada, a seguir foi dissolvido 34g de KH_2PO_4 em 250 mL de água destilada e autoclavada. A solução de K_2HPO_4 foi colocada em uma placa de agitação e o pH foi corrigido até pH 7,5 com a solução de K_2HPO_4 .

Os tubos de falcon com as amostras foram fechados e as amostras colocadas em um banho com agitação (60 rpm) a 37°C. Após os períodos de tempo determinados (1, 2, 3, 4, 7, 10 e 21 dias) as amostras foram removidas e determinadas suas massas. A quantidade de água absorvida foi calculada pela equação 4.

$$\% \text{ água absorvida} = \left(\frac{m_w - m_i}{m_i} \right) \times 100 \quad (\text{Equação 4})$$

Em que: m_i é a massa inicial da amostra e m_w é a massa da amostra molhada.

Ao fim de cada teste as amostras foram submetidas à secagem a 37°C por 24 horas e foram novamente pesadas para se determinar a massa seca final de modo a ser calculada a perda de massa (equação 5).

$$\% \text{ perda de massa} = \left(\frac{m_f - m_i}{m_i} \right) \times 100 \quad (\text{Equação 5})$$

Em que: m_f é a massa final da amostra após a secagem e m_i é a massa inicial da amostra.

4.2.11 Teste de citotoxicidade

A análise da citotoxicidade permite averiguar os efeitos tóxicos ou anti-proliferativos da amostra em culturas. O ensaio de citotoxicidade foi realizado pelo método de incorporação do vermelho neutro seguindo normas internacionais (ISO 10993-5, 1992). Foi realizado na Faculdade de Odontologia de Bauru – USP.

4.2.11.1 Cultura de células

4.2.11.1.1 Cultivo e expansão dos fibroblastos (NIH3T3)

No presente estudo foi utilizado fibroblastos da linhagem NIH3T3. As células foram cultivadas em meio de cultura DMEM (Meio de Eagle modificado por Dulbecco – NUTRICELL) suplementado com 10% de SFB (Soro Fetal Bovino - NUTRICELL), e incubadas em estufa a 37°C contendo 5% de CO₂. Após atingirem a subconfluência as células foram subcultivadas utilizando-se a enzima tripsina, responsável por dissociar as células do frasco de cultura (0,25% tripsina, 1mM EDTA- Sigma-Aldrich), mantidas por 5 minutos na estufa de CO₂ a 37°C, em seguida a tripsina foi inativada com meio de cultura DMEM com 10% SFB . As células foram transferidas para um tubo falcon de 15 ml (TPP® - Techno Plastic Products) e centrifugadas a 1.200 rpm por 5 minutos a 4°C. Após a centrifugação o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em um novo meio DMEM com 10% SFB. Após isso, fez-se a contagem celular por meio do protocolo do azul de tripan. Este corante é responsável por corar as células inviáveis. Posteriormente, as células foram utilizadas para os ensaios experimentais.

4.2.11.1.2 Preparo dos grupos experimentais

Nesse experimento foram utilizadas 2 grupos experimentais correspondentes às bandagens de triacetato de celulose Bagaço/Sigma® 30/70 m/m (Grupo 1); triacetato de celulose Sigma® (Grupo 2).

Seguindo as recomendações da ISO nº 10.993-5, as concentrações usadas para o experimento foram de 1cm² da bandagem por 1ml de DMEM 10% SFB, ou seja 1cm²/ml. As bandagens foram então cortadas e adicionadas no meio DMEM 10% SFB (proporção de 1cm²/mL) e incubado a 37° por 24 horas. Dos extratos obtidos foram usados os extratos brutos (sem diluição) e os extratos diluídos na mesma quantidade de meio (50%). Os grupos experimentais foram divididos conforme mostra a Tabela 3.

Além dos grupos experimentais, foram realizados os grupos controle positivo (Meio DMEM 10% SFB) e controle negativo (Meio DMEM 1% SFB). Todos os experimentos foram feitos em sextuplicatas.

Tabela 3 - Divisão dos grupos experimentais.

Grupos	Tipo de Bandagem (Extrato Bruto - EB)	Tipo de Bandagem (50% de concentração do EB)
1	Triacetato Bagaço/Sigma (30/70)	Triacetato Bagaço/Sigma (30/70)
2	Triacetato Sigma	Triacetato Sigma
Controle positivo	meio DMEM 10% SFB	meio DMEM 10% SFB
Controle negativo	meio DMEM 1% SFB	meio DMEM 1% SFB

4.2.11.1.3 Análise da viabilidade celular

Plaqueamento celular

Para os ensaios de viabilidade foram plaqueadas 2×10^3 células/poço em placas de 96 poços. Após incubação por 24h, o meio de cultivo foi substituído por meio DMEM complementado por 10% de SFB e condicionado com as bandagens. Cada placa foi analisada em um tempo experimental de 24, 48 e 72 horas após a adição do meio condicionado. Após cada período experimental, o meio de cultura foi removido, as células foram lavadas com PBS e em seguida foi realizado o ensaio de redução do MTT e Cristal violeta.

Redução do MTT

A análise da atividade mitocondrial das células foi realizada pelo método da redução do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazólio) (MOSSMAN, 1983). Esse teste quantifica a conversão do MTT, que é solúvel em água, em um formazan insolúvel. O formazan, de cor azul purpúrea, é solubilizado e, então, sua concentração pode ser determinada pela densidade óptica em espectrofotômetro. Em cada período experimental (24, 48 e 72 horas) as células foram lavadas com PBS, em seguida as células foram incubadas numa solução de 1 mg de MTT para 1ml de DMEM sem SFB, essa solução foi preparada no momento do seu uso e foi filtrada em filtro *Millipore* (0,22 μ m) antes de ser adicionado nas placas. Após esse procedimento, as placas foram deixadas por 4h a 37°C; em seguida removeu-se a solução, o pigmento insolúvel reduzido intracelularmente foi extraído em DMSO (dimetilsulfóxido) e deixado em temperatura ambiente por 30 minutos. Posteriormente, a absorbância foi mensurada a 562 nm (*LEITORA SYNERGY MX MONOCHROMATOR-BASED BIOTEK*).

Cristal Violeta

O ensaio de Cristal Violeta é responsável por corar os ácidos nucleicos das células (KUENG et al., 1989). Em cada período experimental (24, 48 e 72 horas), os meios de cultura de todos os grupos experimentais foram removidos, as células foram lavadas duas vezes com PBS e em seguida foi adicionado metanol 100% durante 10 minutos. Após esse período retirou-se o metanol e adicionou-se a solução de cristal violeta 0,2% em etanol 20% por 3 minutos. Em seguida removeu-se a solução e lavou-se novamente duas vezes os poços com PBS para remover o excesso do corante. Por fim, acrescentou-se a solução de citrato de sódio $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$ com etanol 50% durante 10 minutos. A absorbância foi determinada a 540nm (LEITORA SYNERGY MX MONOCHROMATOR-BASED BIOTEK).

4.2.11.1.4 Análise dos resultados dos ensaios de viabilidade celular

A análise estatística do ensaio de Cristal Violeta foi feita no *software GraphPad Prism 5* selecionando o teste estatístico *two-way ANOVA*, pós-teste Bonferroni, com indicação de $p < 0,05$.

4.2.12 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As microscopias foram realizadas no Laboratório de Caracterização Tecnológica da Escola Politécnica da Universidade de São Paulo (LCT-Poli/USP) utilizando um microscópio Quanta 600 FEG da marca FEI Electron Microscopes. As nanomembranas foram coladas individualmente ao suporte do microscópio com fita de carbono e revestida com platina, e as ampliações utilizadas foram de 1000x, 5000x, 20000x e 50000x.

4.2.13 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

As temperaturas de fusão, de cristalização e a porcentagem de cristalinidade foram obtidas através das análises de DSC. As amostras tanto das celulosas assim como as dos triacetatos foram submetidas aos testes de DSC e TGA.

Cerca de 2 mg das amostras foram colocadas em porta amostra de alumínio hermeticamente fechados e submetidas a análise em Calorímetro de Varredura DSC 7020 (Exstar, SII Nano Technology Inc., Japão) com atmosfera de nitrogênio de 50 mL min^{-1} e na razão de aquecimento de $10 \text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$, na faixa de temperatura de 25 a $400 \text{ }^{\circ}\text{C}$. O elemento

químico Índio foi utilizado como padrão para calibrar a escala de temperatura e a resposta de entalpia. Antes dos ensaios foram obtidos curvas em branco para avaliar a linha de base do equipamento. As curvas obtidas foram processadas e as curvas de fusão e cristalização foram analisadas quanto ao início e ao final da fusão e cristalização, temperatura máxima dos principais picos (°C) e entalpia de fusão (J/g).

4.2.14 Termogravimetria (TG/DTA)

Foi realizado por meio da termobalança TG/DTA 7200 (Exstar, SII Nano Technology Inc., Japão) com atmosfera de nitrogênio de 100 mL min⁻¹, sendo a massa da amostra cerca de 3,5 mg, acondicionadas em cadinho de platina na faixa de temperatura de 25 a 600°C, na razão de aquecimento de 10°C min⁻¹. Antes dos ensaios, foi verificado a calibração do instrumento empregando-se um padrão de oxalato de cálcio.

4.2.15 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

As amostras de acetato de celulose comercial, do triacetato produzido no laboratório com a celulose comercial e do acetato obtido do bagaço de cana-de-açúcar foram previamente secas em estufa a 60°C, juntamente com KBr, sendo posteriormente resfriada por 30 minutos em desseca dor com P₂O₅ sob vácuo. Foram preparadas pastilhas de KBr contendo 250 mg de KBr e 1,5 mg de amostra, que foram compactadas a uma pressão de 10 Kgf.Cm⁻² sob vácuo. A pastilha de referência, foi preparada contendo apenas KBr. Foram realizadas 32 varreduras na resolução de 4 cm⁻¹. Os espectros foram obtidos diretamente das amostras utilizando um espectrofotômetro Spectrum One Parkin Elmer foram feitos varreduras de 400 a 4000 cm⁻¹, para cada amostra com resolução de 4 cm⁻¹. Os ensaios foram realizados no Departamento de Biotecnologia da Universidade de São Paulo, Lorena, SP.

4.2.16 Tratamentos estatísticos dos dados

Os experimentos foram todos efetuados em triplicata e os valores obtidos foram apresentados na forma de média ponderada, em conjunto aos seus desvios padrão.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 OBTENÇÃO E RENDIMENTO DO TRIACETATO DE CELULOSE

Os dados obtidos a partir dos testes realizados se referem ao triacetato de celulose convertido da celulose do bagaço de cana-de-açúcar comparado ao acetato produzido utilizando celulose comercial Sigma®, assim como com o acetato produzido industrialmente pela empresa Sigma®. Foram também realizados testes tanto com a celulose do bagaço de cana-de-açúcar quanto com a celulose comercial Sigma® a fim de verificar as transformações ocorridas e caracterizar os materiais após o processo de acetilação da celulose.

O rendimento da reação foi determinado através de peso seco e constante. As massas de triacetato produzidas utilizando a celulose de bagaço de cana-de-açúcar foram pesadas e para cada 1g de celulose de bagaço utilizada no processo obteve-se um rendimento médio de aproximadamente 1,3 g de triacetato de celulose. A Figura 13 mostra a celulose do bagaço de cana-de-açúcar e na Figura 14 o triacetato de celulose produzido a partir desta celulose obtida

A reação de acetilação realizada por Cerqueira (2010) produziu em torno de 1,5 g de triacetato de celulose para cada grama de bagaço purificado, não foi encontrada evidência da presença de lignina, hemicelulose ou seus derivados nos testes realizados.

Os resultados mostraram a possibilidade de aproveitamento do bagaço de cana-de-açúcar que é uma biomassa produzida em grande quantidade no Brasil para a produção de triacetato de celulose com um bom rendimento.

Figura 13 - Celulose de bagaço de cana-de-açúcar.

Figura 14 - Triacetato de celulose.

5.2 DETERMINAÇÃO DO GRAU DE SUBSTITUIÇÃO (GS) DO TRIACETATO DE CELULOSE

O acetato de celulose é produzido pela substituição dos grupos hidroxila das unidades de glucose por grupos acetila, portanto, podem ser produzidos acetatos com diferentes graus de substituição. Um triacetato corresponde à celulose completamente saturada de grupos acetil, ou seja, pelo menos 92% dos grupos hidroxila são acetilados. O acetato secundário é produzido a partir da pasta de triacetato, ocorrendo à hidrólise parcial do triacetato, onde a taxa de grupos hidroxilas acetilados tem que ser inferior a 92%, mas superior a 74% (LANIEVE, 2007).

O grau de substituição (GS) é um fator de importante, pois afeta sua solubilidade do polímero em diferentes solventes, a cristalinidade, o potencial de biodegradabilidade, entre outras propriedades do polímero. Por exemplo, celulose (GS = 0) é insolúvel na maioria dos solventes (S), mas ao se aumentar o GS do acetato de celulose, a solubilidade se altera (GS $\approx$ 1, S: água; GS $\approx$ 2, S: tetrahydrofurano ou acetona; GS $\approx$ 3, S: diclorometano ou clorofórmio). Assim, determinar o grau de substituição do acetato de celulose é importante para que se defina sua utilização (CERQUEIRA et al., 2010).

Após a obtenção do triacetato de celulose determinou-se o grau de substituição (GS) por uma reação de saponificação. O cálculo do GS foi determinado segundo o procedimento descrito no item 4.2.3, por meio de uma reação química de saponificação (Figura 15) segundo a metodologia descrita por Rodrigues et al., (2000).

figura 15 - Representação da reação de saponificação do acetato de celulose.

Fonte: CANDIDO, (2011).

Segundo a bibliografia consultada um triacetato normalmente apresenta um grau de substituição maior que 2,50. O triacetato completamente acetilado apresenta um GS de 2,88, que corresponde a uma porcentagem de 43,50% de grupos acetila (CANDIDO, 2011; MEIRELES, 2011). O calculo do GS foi feito para cada um dos triacetatos analisados acetato de celulose comercial Sigma®, triacetato de celulose produzido a partir de celulose comercial Sigma® e triacetato de celulose produzido a partir do bagaço de cana-de-açúcar (Tabela 5).

O teor de grupos acetil do acetato de celulose produzidos a partir da celulose extraída do bagaço da cana-de-açúcar foi calculado após a titulação e o valor obtido foi de 41,9 % que corresponde a um grau de substituição (GS) de 2,8 (Tabelas 4 e 5). Mediante do valor obtido experimentalmente pode-se caracterizar o material produzido a partir do bagaço de cana-de-açúcar como sendo um triacetato de celulose, devido ao bom grau de substituição obtido.

Tabela 4 - Teor de grupos acetil do triacetato de celulose de bagaço de cana-de-açúcar.

	Massa (g)	Volume de NaOH (mL) gasto na titulação	% de grupos acetil (GA)
Acetato de celulose bagaço de cana-de- açúcar	0,1	8,9	41,9%
	0,1	8,9	41,9%
	0,1	8,9	41,9%
Média	0,1	8,9	41,9%

Tabela 5- Grau de substituição dos materiais acetilados.

Material	% Grupos Acetila	Grau de Substituição
Acetato – Comercial Sigma®	37,6%	1,8
TAC – Celulose Sigma®	38,7%	2,5
TAC – Celulose de Bagaço	41,9%	2,8

5.3 ANÁLISE DE CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC) E TERMOGRAVIMETRIA (TGA/DTG)

O teste de Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) realizado analisou a variação de energia das amostras dos polímeros de celulose comercial Sigma® e do bagaço de cana-de-açúcar, dos triacetatos de celulose comercial Sigma® e do produzido a partir da celulose do bagaço da cana-de-açúcar, assim como da membrana eletrofiada.

Para a análise dos resultados existem alguns parâmetros que devem ser observados. Como é o caso dos dois eventos que devem ser levados em consideração: o pico endotérmico e o pico exotérmico. O primeiro representa a absorção de calor, e é representado por um pico negativo. Por outro lado, o segundo pico pode ser atribuído a liberação de calor (BERNAL et al., 2002).

As Figuras 16 e 17 mostram os gráficos de DSC das amostras de celulose comercial Sigma® e do bagaço de cana-de-açúcar. O DSC do polímero celulose comercial Sigma® mostra dois picos endotérmicos o primeiro em torno de 200°C, que podem ser associado à perda de água da amostra e o começo da degradação da celulose, o segundo em torno de 320°C pode ser associado a degradação térmica da celulose. Segundo Carvalho (2009) a celulose inicia sua decomposição térmica na faixa entre 150 a 180°C, finalizando o processo acima de 350°C. A fusão dos cristais da celulose ocorre na faixa de 300°C. Também foi possível observar a presença de um pico exotérmico em torno de 340°C que pode ser associado à liberação de energia que ocorre com a degradação do polímero, o que pode ser confirmado quando comparamos o gráfico de DSC ao de TG (Figura 18) que apresenta uma grande perda de massa na mesma temperatura em que ocorre o pico endotérmico.

A celulose do bagaço de cana-de-açúcar mostrou apenas um pico endotérmico na faixa de 185°C que está associado à perda de água do polímero e o princípio da degradação da celulose, não apresentando o pico exotérmico de decomposição, devido ao fato da análise ter sido interrompida por volta de 400°C, porém mostra uma elevação exotérmica que pode estar relacionada à degradação do polímero, na mesma temperatura em que se inicia a elevação exotérmica ocorre uma perda de massa mais acentuada, o fenômeno pode ser observado no gráfico de TG na Figura 19.

Figura 16 - Curva DSC da celulose comercial da Sigma® (sob atmosfera inerte de nitrogênio com fluxo de gás 50 mL/min.), com razão de aquecimento de 10 °C/min de 25 a 400 °C.

Figura 17 - Curva de DSC celulose do bagaço de cana-de-açúcar (sob atmosfera inerte de nitrogênio com fluxo de gás 50 mL/min.), com razão de aquecimento de 10 °C/min de 25 a 400 °C.

Figura 18 - Curva de TGA/DTG celulose Sigma® (sob atmosfera inerte de nitrogênio com fluxo de gás 100 mL/min.), com razão de aquecimento de 10 °C/min de 25 a 600 °C.

Figura 19 - Curva de TGA/DTG celulose de bagaço (sob atmosfera inerte de nitrogênio com fluxo de gás 100 mL/min.), com razão de aquecimento de 10 °C/min de 25 a 600 °C.

O acetato de celulose comercial Sigma® mostrou dois picos endotérmicos, o primeiro pico em torno de 185°C, relacionado com a perda de água absorvida pelo material e ao amolecimento do polímero (Figura 20). Segundo Lanieve, (2007) a fibra de acetato de celulose derrete na faixa de 190 a 205°C a mesma do triacetato de celulose. O segundo pico ocorre em torno de 240°C que está relacionado com a fusão do polímero, em seguida pode ser observado uma subida exotérmica que pode estar associada à liberação de energia após a degradação do polímero. O triacetato de celulose do bagaço de cana-de-açúcar apresentou quatro picos endotérmicos (Figura 21), o primeiro em torno de 170°C, associado à perda de água absorvida pelo material, o segundo em torno de 240°C, relacionado ao amolecimento do polímero, o terceiro em cerca de 300°C, relacionado à fusão do polímero e o ultimo a 380°C,

já relacionado à degradação do polímero, o que pode estar associado ao ponto de degradação da celulose de bagaço de cana-de-açúcar, mais alto que o apresentado pela celulose Sigma® (Figuras 18 e 19). Os dois últimos picos estão relacionados com a temperatura de decomposição do acetato, a partir dos 300 °C há uma elevação exotérmica associada à degradação do polímero (Figuras 20 e 21).

Figura 20 - Curva DSC de acetato de celulose comercial da Sigma®, (sob atmosfera inerte de nitrogênio com fluxo de gás 50 mL/min.), com razão de aquecimento de 10°C/min de 25 a 400 °C.

Figura 21 - Curva de DSC triacetato de celulose do bagaço de cana-de-açúcar (sob atmosfera inerte de nitrogênio com fluxo de gás 50 mL/min.), com razão de aquecimento de 10°C/min de 25 a 400 °C.

Os gráficos de TG (Figuras 22 e 23) mostram que ambos os polímeros apresentam perda de massa em uma faixa de temperatura em torno de 290°C, sendo que o acetato Sigma® perdeu massa um pouco mais rapidamente que o triacetato de bagaço de cana-de-açúcar, mostrando uma perda de massa em torno de 260°C.

Figura 22 - Curvas de TGA/DTG acetato de celulose Sigma® (sob atmosfera inerte de nitrogênio com fluxo de gás 100 mL/min.), com razão de aquecimento de 10 °C/min de 25 a 600 °C.

Figura 23 - Curvas de TGA/ATG triacetato de celulose de bagaço de cana-de-açúcar (sob atmosfera inerte de nitrogênio com fluxo de gás 100 mL/min.), com razão de aquecimento de 10 °C/min de 25 a 600 °C.

O polímero misto de acetato de celulose comercial Sigma® e triacetato de celulose do bagaço de cana-de-açúcar apresentou quatro picos endotérmicos (Figura 24), o primeiro em torno de 160°C, associado à perda de água absorvida pelo material, o segundo em torno de 210°C relacionado ao amolecimento do polímero e o terceiro em cerca de 240°C relacionado à fusão do polímero. O último pico em torno de 295°C está relacionado com a temperatura de decomposição do acetato, a partir dos 300°C há uma elevação exotérmica associada à liberação de energia pela degradação do polímero.

Figura 24 - Curva DSC de acetato de celulose comercial da Sigma® em mistura com triacetato de celulose do bagaço de cana-de-açúcar 70/30 m/m (sob atmosfera inerte de nitrogênio com fluxo de gás 50 mL/min.), com Razão de aquecimento de 10 °C/min de 25 a 400 °C.

5.4 ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

Os gráficos de FTIR obtidos principalmente para o triacetato de celulose do bagaço de cana-de-açúcar se mostram de acordo com o encontrado por Meireles (2007), apresentando picos muito similares nas mesmas bandas, evidenciando o êxito na conversão de ambos os polímeros em triacetato de celulose. A Figura 25 mostra os espectros na região do infravermelho do acetato de celulose obtido a partir da celulose comercial (Sigma®) e da celulose do bagaço de cana-de-açúcar. As principais bandas que caracterizam a acetilação da celulose (Sigma® e do bagaço) e o grau de substituição.

Figura 25 - Espectro de infravermelho para o triacetato de celulose produzido a partir da celulose comercial (Sigma) e da celulose do bagaço da cana-de-açúcar.

Assim como o relatado por Candido, (2011) e Meireles, (2007) observa-se na Figura 25 a presença de bandas intensa na região de 1750 cm^{-1} , atribuída á ligação C=O característica do estiramento carbonila de éster. Após a acetilação da celulose, os grupamentos OH da cadeia celulósica são substituídos pelos grupamentos acetila, que se ligam ao anel piranosídico formando estruturas do tipo éster.

Uma banda intensa em 1230 cm^{-1} atribuída ao estiramento da ligação O=C-O-CH₃, características da hibridação sp² do triacetato de celulose. A presença do conjunto de bandas de baixa intensidade na região 3700 a 3100 são atribuídas aos grupos hidroxilas remanescentes na estrutura do polímero. O que significa grupamentos OH livres, que não estão realizando ligações de hidrogênio, o acetato obtido não foi totalmente substituído pelo grupamento acetil. O envelope da banda de 3700 a 3100 e sua baixa intensidade em relação à intensidade da banda atribuída ao grupo carbonila é a confirmação qualitativa do grau de substituição do polímero. A Tabela 6 mostra as atribuições para as principais bandas na região do infravermelho associadas ao triacetato de celulose.

tabela 6 – Atribuições das principais bandas no ftir do triacetato de celulose.

Posição (cm⁻¹)	Atribuições
3530	Estiramento O-H
2960	Estiramento assimétrico CH ₃
1760	Estiramento de carbonila de éster
1650	Deformação da água
1430	Deformação assimétrica CH ₂
1370	Deformação simétrica CH ₃
1240	Estiramento C-O de acetato
1160	Estiramento C-O
1050	Estiramento C-O

5.5 ESTUDO DAS CONDIÇÕES DE PREPARO DAS SOLUÇÕES POLIMÉRICAS DE TRIACETATO DE CELULOSE

A fim de se usar o triacetato de celulose produzido no processo de eletrofição, foram preparadas combinações de solventes para a solubilização do polímero obtido. Segundo Cabral et al., (2009) e Engel, (2011) a espessura e a morfologia das fibras obtidas por meio de eletrofição a partir de soluções poliméricas ou precursoras dependem das propriedades físico-químicas destas soluções, como viscosidade, concentração das soluções, tensão superficial.

Inicialmente foi usado o acetato de celulose Sigma® como base para os testes de solubilização, a fim de otimizar as condições experimentais. Foram testadas diversas combinações de solventes e concentrações de triacetato de celulose com base na bibliografia consultada. Estas condições foram modificadas com base nos resultados obtidos a partir da eletrofição das soluções poliméricas preparadas. Sendo assim, foram identificadas quatro condições experimentais as quais permitiram produzir nanomembranas: Solução de TAC 6% m/m diclorometano/DMF 85:15 m/m; Solução de TAC 6% m/m diclorometano/DMF 90:10 m/m; Solução de TAC 18% m/m acetona/DMF 85:15 m/m; Solução de TAC 15% m/m acetona/DMF 85:15 m/m.

Dentre estas quatro soluções poliméricas preparadas, a solução de triacetato de celulose acetona/DMF 85:15 m/m a 15% de TAC foi selecionada. A seleção foi realizada com base nas características apresentadas pelas nanomembranas eletrofiadas assim como pelas e dos solventes usados na preparação das soluções precursoras, a menor toxicidade apresentada

pela acetona em relação ao diclorometano foi um fator relevante. Esta mistura de solventes foi usada para a solubilização do triacetato de bagaço de cana-de-açúcar.

Durante a eletrofiação das soluções poliméricas, foi constatada uma maior dificuldade em eletrofiar as soluções de triacetato produzido no laboratório (seja esta a base triacetato produzido a partir do bagaço de cana-de-açúcar ou da celulose comercial Sigma®) quando comparado com acetato de celulose comercial Sigma®. O fenômeno pode ter ocorrido pela presença de partículas não solubilizadas presentes nas soluções. Uma das condições para a formação de fibras no processo de eletrofiação, é que um polímero em solução tenha massa molar adequada, (NISTA, 2012).

A formação de contas, gotas e poros pode ser atribuída à ação de ao menos três forças: a tensão superficial, que quando elevada pode resultar na formação de contas e ou gotas; a repulsão eletrostática entre cargas na superfície do jato, que pode contribuir na constituição de um jato fino com gotas; e a força viscoelástica. Geralmente a formação de contas e gotas pode ser evitada quando a influência da tensão superficial é superada pelas duas últimas forças (CALÍOPE, 2009).

Para melhorar a solubilidade do polímero e a consistência da solução polimérica durante o processo de eletrofiação do triacetato produzido a partir do bagaço de cana-de-açúcar foram elaboradas misturas entre o triacetato comercial Sigma® e o triacetato produzido a partir do bagaço de cana-de-açúcar utilizando como mistura de solventes acetona/DMF 85:15 m/m.

A mistura de polímeros que obteve os melhores resultados em nanomembranas foi à mistura fixada na proporção de 70% de acetato Sigma® e 30% de triacetato de Bagaço de cana-de-açúcar para a porcentagem de 15% de triacetato de celulose. As nanomembranas produzidas foram usadas para a incorporação da enzima bromelina.

5.6 ELETROFIAÇÃO DAS NANOMEMBRANAS DE TRIACETATO DE CELULOSE

Inicialmente foram tomados como base os parâmetros citados na bibliografia consultada tanto para o preparo das soluções precursoras como na escolha dos parâmetros utilizados durante a eletrofiação das nanomembranas. Segundo Wan et al., (2004) os parâmetros de controle do processo são a pressão hidrostática no capilar e o campo elétrico externo. Viscosidade, condutividade, permeabilidade dielétrica, tensão superficial e gradiente de temperatura, umidade e distância entre o coletor e a agulha também afetam o processo.

Em uma análise inicial foi possível observar que as nanomembranas eletrofiadas com uma distância entre o capilar e o coletor de 7 cm ou inferior apresentaram uma tendência a formação de aglomerados de fibras, formando elevações na superfície das nanomembranas (Figura 26). É necessária uma distância mínima entre a ponta do capilar e o coletor, para que as fibras eletrofiadas tenham tempo suficiente para secar antes de atingirem o coletor, por outro lado, se utilizarmos uma distância não adequada para a mistura de solventes eletrofiada (curta ou longa) também pode levar a formação de aglomerados na estrutura das fibras (ENGEL, 2011).

Neste estudo as distâncias que apresentaram os melhores resultados ficaram entre 10 e 12 cm (Figura 26), foi possível observar na aparência e forma das nanomembranas como a distância entre a agulha e o coletor influenciou no aspecto das nanomembranas formando estruturas elevadas na superfície (Figura 27).

Na Figura 26 pode-se observar uma nanomembrana de triacetato de celulose produzida utilizando a vazão de 2 mL/h e 12 cm de distância do coletor, que apresentou uma superfície uniforme.

Figura 26 - nanomembrana de triacetato de celulose solução TAC 18% m/m acetona/DMF 85:15 m/m.

Figura 27 - nanomembrana de triacetato de celulose solução TAC 15% m/m acetona/DMF 85:15 m/m.

Foi também observado que as nanomembranas produzidas a partir das soluções tendo como solvente o diclorometano/DMF que não foram capazes de cobrir toda a superfície do coletor que apresentava uma superfície de 20 cm x 20 cm, utilizando o mesmo volume de solução polimérica. O tamanho da nanomembrana eletrofiada se manteve em torno de 20 cm de largura por 12 cm de comprimento. Outra característica que foi possível observar no aspecto da nanomembranas foi que ao serem removidas da superfície do coletor se mostraram mais finas em comparação com aquelas eletrofiadas a partir das soluções em que foi utilizando como solventes a mistura de acetona/DMF (Figura 28).

Figura 28 - nanomembrana de triacetato de celulose solução TAC 6% m/m diclorometano/DMF 90:10 m/m.

5.7 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DAS NANOMEMBRANAS PELA ANÁLISE DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

As nanomembranas produzidas foram caracterizadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) para avaliar a morfologia e as dimensões das nanofibras eletrofiadas. Por meio da avaliação microscópica foi possível selecionar a melhor solução polimérica dentre as 4 que obtiveram os melhores resultados assim como as melhores condições operacionais a serem utilizadas para realizar o processo de eletrofiação.

As condições operacionais utilizadas para cada solução polimérica durante o processo de eletrofiação são descritas na Tabela 7.

Alguns parâmetros podem influenciar a formação de nanofibras através da eletrofiação das soluções poliméricas e são eles: (1) propriedades da solução, tais como, viscosidade, condutividade e tensão superficial; (2) condições operacionais, como, pressão hidrostática no capilar, a força do campo elétrico aplicado, a distância entre o capilar e o coletor e a taxa de alimentação (vazão) da solução polimérica e (3) parâmetros ambientais, que vem a ser temperatura da solução, umidade e velocidade do ar na câmara de eletrofiação (CALÍOPE, 2009).

tabela 7- Soluções precursoras e parâmetros utilizados nos processos de eletrofiação das nanomembranas.

Solução Polimérica	Distância entre o capilar e coletor (cm)	Vazão (mL/h)	Voltagem (Kv)
1 - Diclorometano/DMF 85:15 (m/m) triacetato de celulose 6% (m/m)	7	4	25
2 - Diclorometano/DMF 90:10 (m/m) triacetato de celulose 6% (m/m)	12	3	25
3 a - Acetona/DMF 85:15 (m/m) triacetato de celulose 15% (m/m)	12	3	25
3 b - Acetona/DMF 85:15 (m/m) triacetato de celulose 15% (m/m)	10	3	25
4 - Acetona/DMF 85:15 (m/m) triacetato de celulose 18% (m/m)	10	3	25
5 - Acetona/DMF 85:15 m/m a 15% de triacetato de celulose MISTO (70:30 m/m TAC sigma/bagaço)	10	4	25

As Figuras 29, 30 e 31 mostram imagens de MEV da nanomembrana eletrofiada a partir da solução polimérica de Diclorometano/DMF 85:15 (m/m) triacetato de celulose (Sigma®) 6% (m/m) (Tabela 7). Foi possível observar que houve uma maior quantidade de gotas e contas na nanomembrana. Foi considerado que o excesso do solvente DMF tornou a viscosidade da solução baixa quando comparada com as demais soluções preparadas. Segundo Botas (2012), e Nista (2012), uma solução polimérica com uma viscosidade baixa comumente apresenta contas depositadas ao longo das fibras, devido a uma grande quantidade de moléculas de solvente e poucas cadeias de polímero entrelaçadas, sendo assim a tensão superficial se torna o fator dominante do sistema ao longo do jato eletrofiado causando instabilidade no mesmo. Outros fatores como a distância entre a agulha e o coletor e a vazão podem ter influenciado a morfologia da nanomembrana levando a formação de gotas e contas. Esta nanomembrana foi eletrofiada a uma distância de 7 cm e com uma vazão de 4 mL/h.

A distância entre a agulha e coletor é um dos fatores estudados como sendo um meio de controle da morfologia e do diâmetro das fibras, com uma distância não adequada para os parâmetros usados na eletrofição (curta ou longa) observa-se a formação de aglomerados na estrutura das fibras (ENGEL, 2011). Nas Figuras 29 e 30 pode-se observar as contas e gotas mencionadas. Durante a eletrofição da nanomembrana foi possível observar mesmo a olho nu a presença das gotas e o aspecto fino e frágil apresentado pela membrana, dificultando sua manipulação.

Figura 29 - Imagem de MEV da nanomembrana de triacetato de celulose solução TAC 6% (m/m) diclorometano/DMF 85:15 (m/m) ampliado 1000x.

Figura 30 - Imagem de MEV da nanomembrana de triacetato de celulose solução TAC 6% (m/m) diclorometano/DMF 85:15 (m/m) ampliado 5000x.

Foi possível observar nas imagens de MEV que em geral, as nanomembranas eletrofiadas a partir das soluções poliméricas que tiveram como solvente o diclorometano, há maior irregularidade em sua superfície, além de apresentar nanofibras descontínuas e irregulares.

A Figura 31 mostra uma microscopia da nanomembrana ampliada 50000x, sendo possível observar que a superfície das fibras apresentam rugosidade ao longo de sua extensão.

Figura 30 - Imagem de MEV nanomembrana de triacetato de celulose(Sigma®) solução TAC 6% (m/m) diclorometano/DMF 85:15 (m/m), ampliado 50000x.

As Figuras 32, 33 e 34 mostram as imagens de MEV da nanomembrana que foi eletrofiada a partir da solução polimérica de Diclorometano/DMF 90:10 (m/m) triacetato de celulose (Sigma®) 6% (m/m) (Tabela 7). Pode-se observar que a nanomembrana obtida também apresentou contas, gotas e rugosidade na superfície das nanofibras, no entanto, foi possível constatar que a quantidade foi menor em comparação com a nanomembrana apresentada nas Figuras 29 e 30. A mudança na proporção dos solventes diclorometano/DMF, facilitou a solubilidade do triacetato, e este fator aliada a alteração na distância entre a agulha e o coletor, que passou de 7 cm para 12 cm oferecendo um tempo de voo maior, e a vazão reduzida de 4m/L para 3 mL/h contribuíram para a melhorar da morfologia da nanomembrana.

Segundo descrito por Engel (2011) e Botas (2012) é necessária uma distância mínima entre o capilar e o coletor para que os solventes possam evaporar e as fibras tenham tempo suficiente para secar antes de atingirem o coletor, o chamado tempo de voo da fibra. A

escolha do tempo de voo deve levar em conta a taxa de evaporação do solvente usado na preparação da solução precursora.

Após o processo de eletrofição as características importantes e desejáveis para uma nanofibra são: diâmetros com valores estáveis e controláveis; superfície da fibra livre de defeitos ou com defeitos controláveis; e nanofibras contínuas (CALÍOPE, 2009).

Segundo o descrito por Nista (2012) a redução da vazão de operação, tende a diminuir o diâmetro da fibra.

Figura 31 - Imagem de MEV da nanomembrana de triacetato de celulose solução TAC 6% m/m diclorometano/DMF 90:10 m/m ampliado 1000x.

Figura 32 - Imagem de MEV nanomembrana de triacetato de celulose solução TAC 6% m/m diclorometano/DMF 90:10 m/m ampliado 5000x.

Figura 33 - Imagem de MEV nanomembrana de triacetato de celulose solução TAC 6% (m/m) diclorometano/DMF 90:10 (m/m), ampliado 50000x.

As Figuras 35, 36, 37 e 38 mostram as imagens de MEV da nanomembrana eletrofiada a partir da solução polimérica de Acetona/DMF 85:15 (m/m) triacetato de celulose (Sigma®) 15% (m/m) (Tabela 7).

As naomembranas eletrofiadas a partir de soluções que tem como solvente acetona/DMF mostraram ter uma superfície homogênea, não apresentando contas e gotas diferentemente das nanomembranas eletrofiadas a partir de soluções que tiveram como solvente diclorometano/DMF. Foi possível observar que as nanomembranas apresentaram maior uniformidade e regularidade em sua superfície facilitando a manipulação. As nanofibras foram melhor distribuída pela extensão da nanomembrana, o que resultou em um filme mais resistentes ao toque e manipulação, quando comparada a nanomembrana eletrofiadas a partir das soluções que tiveram como solvente diclorometano/DMF.

Foram comparadas as imagens de MEV de duas nanomembras similares, em que a única diferença entre as duas membranas foi à distância entre agulha e o coletor durante a eletrofiação, a fim de verificar a influência deste parâmetro operacional na nanomembrana. As distâncias utilizadas foram de 12 cm e 10 cm respectivamente (Tabela 7). Foi possível observar que a diferença de 2 cm na distância entre a agulha e o coletor não influenciou na formação de contas e gotas ou defeitos na malha das nanomembranas (Figuras 35 e 36).

Figura 34 - Imagem de MEV da nanomembrana de triacetato de celulose solução 15% (m/m) acetona/DMF 85:15 (m/m) eletrofiado a 12cm, ampliado 1000x.

Figura 35 - Imagem de MEV da nanomembrana de triacetato de celulose solução 15% m/m acetona/DMF 85:15 m/m eletrofiado a 12cm, ampliado 5000x.

Figura 36 - Imagem de MEV da nanomembrana de triacetato de celulose solução 15% (m/m) acetona/DMF 85:15 (m/m) eletrofiado a 10cm, ampliado 1000x.

Figura 37 - Imagem de MEV da nanomembrana de triacetato de celulose solução 15% (m/m) acetona/DMF 85:15 (m/m) eletrofiado a 10cm, ampliado 5000x.

O diâmetro das nanofibras é uma das características mais importantes das fibras eletrofiadas. Visto que as nanofibras resultam da evaporação ou solidificação dos jatos poliméricos, os diâmetros das mesmas dependerão primeiramente das dimensões dos jatos assim como da quantidade de polímero no jato (CALÍOPE, 2009).

Por meio das imagens de MEV mostradas nas Figuras 39 e 40 foi possível fazer algumas medidas do diâmetro das fibras e foi possível verificar que a maioria encontra-se dentro da escala nanométrica. Comercialmente são aceitos como nanofibras, aquelas com diâmetros menores que 500 nm. Estes materiais se enquadram na categoria de elementos na escala nano de dimensão, em que se encontram os nanotubos e nanopartículas (NISTA, 2012).

Foi possível verificar que a distância entre a agulha e o coletor influenciou no diâmetro das fibras, sendo as nanofibras eletrofiadas a 12 centímetros apresentaram diâmetros maiores que as eletrofiadas a 10 centímetros. A distância entre a agulha e coletor é outro fator estudado como sendo um meio de controle da morfologia e do diâmetro das fibras eletrofiadas (ENGEL, 2011).

Figura 38 - Imagem de MEV nanomembrana de triacetato de celulose solução 15% m/m acetona/DMF 85:15 m/m eletrofiada a 10cm, 50000x.

Figura 39 - Imagem de MEV nanomembrana de triacetato de celulose solução 15% m/m acetona/DMF 85:15 m/m eletrofiada a 12 cm, ampliado 20000x.

As nanofibras eletrofiadas a partir das soluções com os solventes acetona/dimetilformamida apresentaram uma menor rugosidade e maior uniformidade, que as nanofibras produzidas a partir das soluções tendo como solventes o diclorometano/dimetilformamida como pode ser visto na Figura 41 e 42.

Figura 40 - Imagem de MEV nanomembrana de triacetato de celulose solução 15% (m/m) acetona/DMF 85:15 (m/m) eletrofiado a 10cm, ampliado 50000x.

Figura 41 - Imagem de MEV nanomembrana de triacetato de celulose solução 15% (m/m) acetona/DMF 85:15 (m/m) eletrofiado a 12cm, ampliado 50000x.

As Figuras 43, 44 e 45 mostram as imagens de MEV obtidas da nanomembrana eletrofiada a partir da solução precursora de Acetona/DMF 85:15 (m/m) triacetato de celulose 18% (m/m) (Tabela 7). Esta solução polimérica é bastante similar a analisada anteriormente, sua única diferença é o aumento da concentração de triacetato de celulose (Sigma®) de 15% para 18%. Foram usados os mesmos parâmetros usados na eletrofição da nanomembrana anterior, mantendo-se 10 cm de distância da agulha ao coletor, vazão de 3 mL/h e voltagem de 25 Kv. O aumento na concentração de triacetato de celulose de 15% para 18% não aparentou ter influência significativa nas nanomembranas que apresentaram características similares. Foi possível observar que não houve a presença de contas e gotas na superfície da nanomembrana, assim como apresentaram uniformidade e regularidade, as nanofibras foram bem distribuídas pela extensão da nanomembrana.

Figura 42 - Imagem de MEV da nanomembrana de triacetato de celulose solução 18% (m/m) acetona/DMF 85:15 (m/m) ampliado 1000x.

Figura 43 - Imagem de MEV da nanomembrana de triacetato de celulose solução 18% (m/m) acetona/DMF 85:15 (m/m) ampliado 5000x.

Durante a análise das imagens de MEV foi possível medir o diâmetro das fibras e comprovar que houve a ocorrência de fibras de diâmetro abaixo de 500 nm o que as caracteriza como nanofibras (Figura 45).

Figura 44 - Imagem de MEV nanomembrana de triacetato de celulose solução 18% (m/m) acetona/DMF 85:15 (m/m), ampliado 50000x.

As Figuras 46, 47 e 48 mostram as imagens de MEV para as nanomembranas que foram eletrofiadas a partir da solução polimérica de Acetona/DMF 85:15 m/m a 15% de triacetato de celulose MISTO (70:30 m/m TAC Sigma®/bagaço) (Tabela 7). Como foi descrito no tópico 5.5 foi proposto a mistura entre os polímeros de triacetato comercial Sigma® e triacetato de celulose produzido a partir do bagaço da cana-de-açúcar a fim de melhorar a solubilidade do polímero e a viscosidade da solução precursora. A solução polimérica selecionada para a mistura entre os triacetatos foi a solução acetona/dimetilformamida 85:15 (m/m) a 15% (m/m) de triacetato de celulose. As nanomembranas eletrofiadas a partir desta solução precursora obtiveram bons resultados, esta solução tem uma concentração de TAC mais baixa, o que facilitou a diluição dos polímeros e o processo de eletrofiliação.

Durante o preparo desta solução foi possível observar que ela apresenta um aspecto mais translúcido e com menor incidência de partículas quando comparada com as demais soluções precursoras mistas (TAC Sigma®/TAC Bagaço) testadas, que eram amareladas e opacas. Foi possível concluir que a presença de partículas pode estar associado ao processo de produção do acetato de celulose e ao seu próprio grau de pureza, o material produzido não foi submetido a processos de purificação como os produtos comerciais.

O processo de eletrofiliação da solução polimérica mista (70/30 TAC Sigma®/Bagaço) quase não apresentou interrupções como nos casos soluções mistas (TAC

Sigma®/TAC Bagaço) em outras porcentagens. A presença de partículas durante o processo de eletrofiação dificultava a regularidade do jato eletrofiado. As nanomembranas eletrofiadas a partir desta solução apresentaram boa uniformidade e regularidade em sua superfície e facilidade de manipulação. Foi possível verificar também a presença de pequenas gotas na estrutura da nanomembrana que pode ser atribuído a vazão 4 mL/h utilizada durante o processo de eletrofiação.

Assim como nas demais imagens de MEV obtidas foi possível medir o diâmetro das fibras e comprovar sua escala nanométrica (Figura 48).

Figura 45 - Imagem de MEV da nanomembrana de triacetato de celulose solução 15% triacetato misto 70:30 sigma/bagaço (m/m) acetona/DMF 85:15 (m/m) ampliado 1000x.

Figura 46 - Imagem de MEV da nanomembrana de triacetato de celulose solução 15% triacetato misto 70:30 sigma/bagaço (m/m) acetona/DMF 85:15 (m/m) ampliado 20000x.

Figura 47 - Imagem de MEV da nanomembrana de triacetato de celulose solução 15% TAC misto 70:30 TAC sigma/bagaço (m/m) acetona/DMF 85:15 (m/m), ampliado 50000x.

5.8 ESTUDOS DE ABSORÇÃO DE ÁGUA E PERDA DE MASSA EM SOLUÇÃO DE SUOR ARTIFICIAL ÁCIDO, BÁSICO E TAMPÃO FOSFATO.

Biologicamente, quase todos os órgãos e tecidos podem ser caracterizados por estruturas fibrosas arranjadas em escala nanométrica. Como por exemplo, ossos, dentes, colágenos, cartilagens e pele. Muitas pesquisas sobre nanomembranas eletrofiadas têm sido focadas em várias áreas biomédicas, tais como tratamento de feridas, próteses médicas e engenharia de tecidos (CALÍOPE, 2009). Nanomembranas para curativos geralmente têm poros que variam de 500 nm a 1 mm, pequeno o bastante para proteger a ferida da invasão de bactérias e eficiente na absorção de líquidos e liberação por via cutânea (NISTA, 2012).

As nanomembranas eletrofiadas a partir da solução polimérica de Acetona/DMF 85:15 m/m a 15% de triacetato de celulose MISTO (70:30 m/m TAC Sigma®/bagaço) (Tabela 7) foram imersas em soluções de suor artificial (ácido e básico) e tampão fosfato pH 7,4 sob temperatura de 37 °C e agitação de 60 rpm. Estes ensaios foram realizados nestas condições para simular o comportamento das nanomembranas em contato com a pele e o pH fisiológico do organismo para verificar a influência destes meios na degradação dos materiais.

Foi possível observar que as nanomembranas não se dividiram ou se despedaçaram quando imersas nas soluções, mesmo aquelas imersas por mais de vinte dias, quanto maior e mais regular sua espessura melhor sua condição ao fim do experimento. O Triacetato de celulose possui “regain” de 3,5%, já o diacetato possui um “regain” de 6,5%. A absorção de umidade do diacetato é mais baixa que a do rayon viscose, mas a taxa de variação do teor de

umidade é aproximadamente a mesma da média do algodão (HEARLE & WOODINGS, 2001; PITA, 1996). Sendo as nanomembranas eletrofiadas a partir de uma mistura entre polímeros com diferentes GSs pode-se perceber a influência na variação de absorção de umidade.

A porcentagem de absorção de umidade variou bastante de acordo com a solução na qual as nanomembranas foram submersas. As nanomembranas imersas na solução que simulam suor básico apresentam uma variação significativa na absorção de umidade entre o primeiro e o segundo dia de realização do experimento, absorvendo o dobro de umidade no segundo dia, porém esta taxa se estabilizou nos demais dias de experimento. As nanomembranas imersas na solução que simula suor ácido obtiveram resultados sempre na faixa de 300% a 350% de absorção de umidade. As nanomembranas imersas na solução tampão apresentaram variação crescente na absorção de umidade durante os 10 primeiros dias de experimento (Figura 49).

Figura 48 - Gráfico de porcentagem de absorção de umidade pelas nanomembranas.

Quanto à perda de massa as nanomembranas apresentaram baixas perdas de massa durante o experimento, as maiores perdas ocorreram com as amostras imersas pelo período de um dia, as perdas de massa foram diminuindo de maneira decrescente até atingir uma estabilização a partir do sétimo dia de experimento.

As nanomembranas imersas em solução que simula o suor básico apresentaram a menor taxa de perda de massa, não ultrapassando os 9% de perda. Aquelas imersas na solução

que simula suor ácido apresentaram a maior taxa de perda de massa, em torno de 28%, no primeiro dia de experimento. As imersas em solução tampão apresentaram uma perda na faixa de 20%. A Figura 50 mostra o gráfico de perda de massa.

Figura 49 - Gráfica de porcentagem de perda de massa pelas nanomembranas.

5.9 TESTE DE CITOTOXICIDADE

Sendo as nanomembranas eletrofiadas neste estudo produzidas com fim para aplicações médicas, para garantir a segurança desse material, foram realizados testes de citotoxicidade para avaliar a biocompatibilidade das nanomembranas. A biocompatibilidade pode ser definida como a capacidade de um material de exercer suas funções específicas quando aplicado em tecidos vivos de determinado hospedeiro, sem causar danos ou prejuízo a este (NISTA, 2012).

Os testes realizados *in vitro* apresentam algumas vantagens em relação aos realizados *in vivo*, uma vez que podem limitar o número de variáveis experimentais, obter dados significativos mais facilmente e em muitos casos ser efetuado em um período de teste menor. De acordo com estudos feitos com estes métodos, os testes com culturas celulares podem ser utilizados com sucesso, visto que são reprodutíveis, rápidos, sensíveis e financeiramente acessíveis para a execução do estudo de biocompatibilidade *in vitro* (NISTA, 2012).

5.9.1 Redução do MTT

No período de 24 horas notou-se que a viabilidade celular dos grupos tratados com o meio condicionado com as nanomembranas eletrofiadas a partir da solução polimérica de Acetona/DMF 85:15 m/m a 15% de triacetato de celulose MISTO (70:30 m/m TAC Sigma®/bagaço) (Tabela 7), tanto com o extrato bruto como a diluição de 50%, variou muito, inclusive em relação aos grupos controles. Em geral todos os grupos foram inferiores aos controles positivo e negativo no período de 24 horas. No período de 48 horas houve um panorama bastante semelhante, com o grupo controle positivo e grupos 1 e 2 com as maiores taxas de viabilidade. O último período, 72 horas, apresentou uma continuação dos resultados obtidos nos períodos anteriores. Os grupos controle positivo e grupo 2 apresentaram as maiores leituras de absorbância, seguidos pelo grupo 1 (no experimento com o extrato bruto). Para o experimento com o extrato diluído (50%) os grupos 1 e 2 foram superiores ao controle positivo. Figura 51 (Gráficos 1a e 1b).

Figura 50 - Análise da redução do MTT de células NIH3T3 tratadas com meio condicionado com as bandagens (a) Extrato Bruto e (b) diluição 50%); além dos controles positivo e negativo, nos períodos de 24, 48 e 72 horas. * = $p < 0,05$.

5.9.2 Cristal violeta

Os resultados com o cristal violeta foram bastante semelhantes aos testes do MTT. No período de 24 horas notou-se que a viabilidade celular dos grupos tratados com o meio condicionado com as nanomembranas, tanto com o extrato bruto como a diluição de 50%, oscilou, inclusive em relação aos grupos controles. Em geral todos os grupos foram inferiores aos do controle positivo no período de 24 horas. Figura 52 (Gráficos 3a e b). No período de

48 horas houve um panorama bastante semelhante, com o grupo controle positivo e grupos 1 e 2 com as maiores taxas de viabilidade. O último período, 72 horas, apresentou uma continuação dos resultados obtidos nos períodos anteriores. Os grupos controle positivo e grupo 2 apresentaram as maiores leituras de absorbância, seguidos pelo grupo 1 (no experimento com o extrato bruto). Para o experimento com o extrato diluído (50%) os grupos 1 e 2 foram superiores ao controle positivo (Figura 52).

Figura 51 - Análise da redução do MTT de células NIH3T3 tratadas com meio condicionado com as bandagens (a) Extrato Bruto e (b) diluição 50%); além dos controles positivo e negativo, nos períodos de 24, 48 e 72 horas. * = $p < 0,05$.

Independentemente do método escolhido os resultados obtidos indicaram a biocompatibilidade das nanomembranas eletrofiadas a partir das soluções precursoras de TAC 15% m/m 70/30 m/m Sigma®/Bagaço acetona/DMF 85:15 m/m (Grupo 1) e TAC Sigma® 15% m/m acetona/DMF 85:15 m/m (Grupo 2). Assim como foi relatado por Nista, (2012) que resultados de biocompatibilidade obtidos com o teste de exclusão com corante vital azul de Trypan para as nanomembranas de Acetato de Celulose, preparadas através das soluções precursoras de Ácido Acético/Água 70:30, Acetona/Água 85:15, DMAc/Acetona 1:2 e DMAc/Acetona/Água 32:63:5 demonstraram um aumento no número de população viável de células em todos os grupos experimentais, quase igual ao do grupo controle (poliestireno), assim indicando que as nanomembranas de Acetato de Celulose são biocompatíveis independente do solvente utilizado na eletrofição.

5.10 ESTUDO DE IMOBILIZAÇÃO DA BROMELINA NAS NANOMEMBRANAS

A enzima bromelina foi utilizada neste estudo principalmente em função de suas propriedades medicinais na indústria farmacêuticas (problemas digestivos, flebites, sinusites e como auxiliar de cura após cirurgia, tratamento de insuficiência venosa crônica, equimoses, gota, etc.) (FERREIRA 2007). As nanomembranas obtidas a partir da solução polimérica de TAC 15% m/m 70/30 m/m Sigma®/Bagaço acetona/DMF 85:15 m/m foram utilizadas para imobilização da enzima bromelina por ligações covalentes.

Foram tratadas seis amostras das nanomembranas mistas (70/30 m/m Sigma®/Bagaço) com aminopropiltrietoxisilano 2,5% (v/v) a 30°C por 24h e posteriormente foram imersas uma solução glutaraldeído 1% (v/v). As amostras 1, 2 e 3 permaneceram na solução de glutaraldeído por 4h e as amostras 4, 5 e 6 por 24 horas. Os materiais foram lavados e imersos na solução de bromelina.

A Tabela 8 mostra os rendimentos em termos de proteína e atividade da enzima bromelina imobilizada nas nanomembranas para as amostras 1, 2, 3, 4, 5 e 6, resultados obtidos por meio dos dados de Recuperação em Proteína (RP) e recuperação em termos de atividade enzimática (RA).

Os melhores resultados de imobilização em termos de atividade foram obtidos para as amostras 1, 2 e 3, os rendimentos obtidos foram de 65, 67,9 e 69,8% respectivamente e para as amostras 4, 5 e 6 os rendimentos foram de 15, 27 e 29% respectivamente. Os resultados obtidos mostraram que o tempo de 24 horas de contato com a solução de glutaraldeído promoveu uma redução de aproximadamente 4 vezes no rendimento de atividade em relação ao tempo de 4 horas.

O glutaraldeído em função de suas propriedades bifuncionais tem sido um dos reagentes mais empregados na imobilização de enzimas, devido à formação de ligações covalentes entre a enzima e o suporte sólido, conferindo à enzima maior estabilidade (OLIVEIRA; VIEIRA, 2006). Devido a suas propriedades bifuncionais, realiza o bloqueio dos grupos amino presentes na cadeia polimérica por grupos aldeído presentes no agente reticulante, formando grupos imino rapidamente (TORRES, 2006).

Tabela 8 - Resultados de imobilização da bromelina incorporada nos géis para produção das nanomembranas.

Amostras	RP (%)	RA (%)
1	36,3	65,0
2	92,5	67,9
3	69,6	69,8
4	2,5	15,0
5	20,5	27,2
6	12,8	25,9

5.11 ESTUDO DE LIBERAÇÃO DA ENZIMA BROMELINA

Neste estudo a enzima bromelina foi incorporada no gel de acetato de celulose que foi utilizado no processo de eletrofiação. Foram realizados testes de liberação controlada *in vitro* para avaliar semi-quantitativamente a liberação da enzima bromelina em tampão fosfato (PBS) pH $7,4 \pm 0,2$.

A Figura 53 mostra a atividade da bromelina liberada das nanomembranas na solução de PBS durante o período de incubação de 10 dias à 37°C. Por meio da análise dos resultados obtidos pode-se perceber que no primeiro e segundo dias ocorreram a liberação de $0,8 \text{ mmol.mL}^{-1} \text{ min}^{-1}$ e $0,6 \text{ mmol.mL}^{-1} \text{ min}^{-1}$. A partir do terceiro dia a liberação permanece constante e em torno de $0,3 \text{ mmol.mL}^{-1} \text{ min}^{-1}$, mostrando desta forma que o processo de liberação total completa-se em três dias.

Figura 52 - Atividade da bromelina liberada das nanomembranas na solução de pbs durante o período de incubação de 10 dias à 37°C.

6 CONCLUSÃO

- A celulose obtida do bagaço de cana-de-açúcar foi convertida em TAC com sucesso, por meio do método de sistema homogêneo;
- O grau de substituição do triacetato produzido a partir do bagaço de cana-de-açúcar ficou em torno de 2,8.
- Os resultados do processo de conversão da celulose de bagaço de cana-de-açúcar assim como da celulose comercial Sigma® em TAC foram confirmados por meio das análises de DSC e FTIR;
- O rendimento médio obtido para a conversão foi de 1,3g de TAC para cada 1g de celulose utilizada.
- O TAC produzido a partir da celulose de bagaço da cana-de-açúcar foi utilizado em associação ao AC comercial Sigma® para a eletrofição de nanomembranas;
- Por meio das imagens de MEV pode-se confirmar a formação de nanofibras;
- O aspecto macroscópico das amostras foi o de uma membrana porosa de acordo com o esperado;
- As nanomembranas produzidas se mostraram não tóxicas e altamente absorventes, macias e íntegras quando úmidas, características interessantes quando aplicadas a áreas biomédicas na produção de curativos entre outros produtos;
- Foram testados dois métodos distintos para a incorporação da enzima bromelina:
 - Por meio da imobilização na solução precursora de TAC, sendo este método o que obteve os melhores resultados, e
 - E por meio da imobilização da bromelina nas nanomembranas previamente eletrofiadas. O melhor resultado para a imobilização foi obtido para solução de glutaraldeído (1% v/v) por 4 h;
- As amostras foram mais ativas, em ambos os métodos de imobilização, no primeiro dia de liberação da enzima.
- Por meio deste estudo conclui-se que o aproveitamento do bagaço da cana-de-açúcar um resíduo do setor sucroalcooleiro, para a produção de acetatos é promissora e poderá dar origem a outros produtos de interesse como fibras, membranas para tratamento de efluentes e filtros e ainda nanomembranas para diversas finalidades, como a produção de têxteis técnicos médicos e cosméticos, entre outros;

- O TAC de bagaço de cana-de-açúcar se mostrou adequado como matéria-prima em misturas com AC comercial Sigma® na produção de nanomembranas eletrofiadas para aplicações biomédicas entre outras aplicações.

PERSPECTIVAS FUTURAS

- Estudar os processos de obtenção de celulose a partir do bagaço triacetato de celulose com melhor grau de pureza;
- Estudar outras condições para parâmetros da eletrofiação de nanomembranas a partir do triacetato de celulose;
- Avaliar outras aplicações e funções para as nanomembranas de triacetato de celulose, com a imobilização de outras enzimas e fármacos.

REFERÊNCIAS

- ABÍLIO, G. M. F.; HOLSCHUH, H. J.; BORA, P. S.; OLIVEIRA, E. F. **Extração, Atividade da Bromelina e Análise de Alguns Parâmetros Químicos em Cultivares de Abacaxi**. Rev. Bras. Frutic., Jaboticabal - SP, v. 31, n. 4, p. 1117-1121, Dezembro 2009.
- ALVES FILHO, M. **Unicamp e USP agregam suas pesquisas sobre biomassa da cana**. Disponível em: www.unicamp.br/unicamp_hoje/fu/fevereiro_2003/fuu203pg03atml. Acesso em: 06/05/2007.
- ASTM D 271-48 - **Americam Standard Test Methods** - Standard test methods for lignin in wood, 1956.
- BERNAL, C.; COUTO, A. B.; BREVIGLIERI, S.T.; CAVALHEIRO, E. T. G. **Influência de alguns parâmetros experimentais nos resultados de análises calorimétricas diferenciais DSC**. Rev. Química Nova., v. 25, n. 5, p. 849-855, 2002.
- BIZARRIA, M. T. M.; D'ÁVILA, M. A.; JUNIOR, L. A. F.; MARQUES M. C. S.; MEI L. H. I. **Desenvolvimento de membranas baseadas em nanofibras de blendas de quitosana/poli(óxido de etileno) pelo processo de eletrofiação**. 10º Congresso Brasileiro de Polímeros Foz do Iguaçu – PR, 2009.
- BONDANCIA, T. J.; CORRADINI, E.; TEIXEIRA, E. M.; TEODORO, K. B. R.; MATTOSO, L. H. C. **Influência do tempo de extração ácida na estabilidade térmica de nanofibras de medula de bagaço de cana-de-açúcar**. VII Congresso Brasileiro de Análise Térmica e Calorimetria – São Pedro – SP - Abril de 2010
- BORRACINI, H.M.P. **Estudo do processo de extração da bromelina por micelas reversas em sistema descontínuo**. Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2006. Dissertação Mestrado.
- BOTAS, A. M. P. **Membranas Fluorescentes para fototerapia regenerativa: produção e caracterização**. Dissertação (Mestre em Engenharia Biomédica) – Faculdade de Ciências e Tecnologias da Universidade Nova de Lisboa. Lisboa, Portugal 2012.
- BRADFORD, M. M. **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding**. Analytical Biochemistry, v. 72, 1976, p. 248-254.
- BUSINESS WIRE. Disponível em: <http://www.businesswire.com/news/home/2011030106190/en/Research-Markets-Cellulose-Acetate---Global-Strategic>. Acesso em: 06 nov. 2011.
- CABRAL, Emanuelli L. et al. **Síntese de nanofibras poliméricas por diversas técnicas para usona área médica**. X Salão de Iniciação Científica PUCRS – 2009

CALÍOPE, P. B. **Caracterização de nanofibras através de técnicas de processamento de imagens.** Tese (Doutorado em Engenharia Elétrica) – Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, São Paulo. 2009

CANDIDO, R. G. **Utilização da celulose de resíduos lignocelulósicos para obtenção de produtos de alto valor agregado.** Dissertação (Mestre em Ciências – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial na Área de Conversão de Biomassa) – Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo. Lorena, SP 2011.

CARVALHO, L. C. **Obtenção de Acetato de Celulose Proveniente do Bagaço de Cana-de-Açúcar e Avaliação de Sua Aplicação em Sistemas de Difusão Controlada.** Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) Universidade Estadual de Campinas, Campinas 2009.

CERQUEIRA D. A.; FILHO G. R.; CARVALHO R. A.; VALENTE A. J. M. **Caracterização de Acetato de Celulose Obtido a Partir do Bagaço de Cana-de-açúcar por ^1H -RMN.** Polímeros. Vol. 20, nº2, p 85-91. São Carlos 2010. Disponível em: http://www.scielo.br/pdf/po/v20n2/aop_0569.pdf. Acessado em : 29/jul/2011.

CONAB Companhia Nacional de Abastecimento, **Acompanhamento da safra brasileira: Cana-de-çúcar safra 2013/2014 segundo levantamento.** Brasília 2013 Disponível em: http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/13_08_08_09_39_29_boletim_cana_portugues_abril_2013_1o_lev.Pdf. Acesso em: 20/10/14.

CONAB Companhia Nacional de Abastecimento, **Produção nacional de grãos sobe para 157,8 milhões de toneladas.** 2008 Disponível em: <http://www.conab.gov.br>. Acesso em: 10/03/12.

CONAB Companhia Nacional de Abastecimento, **Acompanhamento da safra brasileira: Cana-de-çúcar V. 1 – safra 2014/2015 terceiro levantamento.** Brasília 2014 Disponível em: <http://www.conab.gov.br>. Acesso em janeiro de 2015

COSTA, S.A., REIS, R.L. **Immobilization of catalase on the surface of biodegradable starch-bases polymers as a way to change its surface characteristics.** Journal of Materials Science: Materials in Medicine, v.15, 2004, p. 335-342.

COSTA, S.M. **Caracterização de polpas químicas obtidas de um pré-tratamento biológico do bagaço de cana-de-açúcar em biorreator de 20L.** Faculdade de Engenharia Química de. Lorena. Departamento de Biotecnologia p. 199, 2005. Tese (doutorado).

COSTA; S.M COSTA, S. A. PAHL, R., MAZZOLA, P. G., MARCICANO, J. P.P ; PESSOA A. **Textile fiber produced from sugarcane bagasse cellulose: an agro-industrial residue.** International Journal of Textile and Fashion Technology, v. 2, p. 15-28, 2013.

CRUZ, A. C. **Síntese e caracterização de partículas de acetato de celulose, a partir do caroço da manga, para produção de matrizes de liberação controlada de drogas.** Universidade Federal de Uberlândia, Instituto de química. Uberlândia, Junho 2010. p.19. Disponível em: http://www.bdtu.ufu.br/tde_busca/arquivo.php?codArquivo=3208. Acesso: 29/jul/2011.

DENARD, G. **Principles of Polymerization** College of Staten Island City University of New York, Staten Island, New York Published by John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey. Published simultaneously in Canada. 2004;

ENGEL, A. B. **Síntese e caracterização de membranas compostas de triacetato de celulose através da técnica de electrospinning**. Escola de Engenharia Departamento de Engenharia Química – Universidade federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2011.

FENGEL, D., WEGENER, G. **Wood: Chemistry, Ultrastructure, Reactions**. Berlin: Walter de Gruyter, 1991. p. 133-145.

FERRAZ, A. Aplicações da biotecnologia na produção de papel e celulose. In: LIMA, U.A., AQUARONE, E., BORZANI, W., SCHMIDELL, W. (ed) **Biotecnologia Industrial**. São Paulo: Edgard Blucher Ltda, 2001, v. 3 p. 465-484.

FERREIRA, J. F. **Caracterização E Purificação Da Enzima Bromelina Em Sistema De Duas Fases Aquosas Peg/Fosfato**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química na área de Concentração: Sistemas de Processos Químicos E Informática) Universidade Estadual de Campinas da Faculdade de Engenharia Química. Campinas, 2007.

FREY, M. W. **Electrospinning Cellulose and Cellulose Derivatives**. Department of Fiber Science and Apparel Design, College of Human Ecology, Cornell University, Ithaca, NY 2008. Disponível em: <<http://www.informaworld.com/smpp/title~content=t713597276>>. Acesso em: 06 jan. 2011.

GALEMBECK, F; BARBOSA, C. A. S.; SOUSA, R. A. **Aproveitamento sustentável de biomassa e de recursos naturais na inovação química**. Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, CP 6154, 13083-970 Campinas - SP, Brasil. Química Nova, Vol. 32, No. 3, 571-581, 2009.

GALLIFUOCO, A., D'ERCOLE, L., ALFANI, F., CANTARELLA, M., SPAGNA, G., PIFFERI, P. G. **On the use of chitosan-immobilized β -glucosidase in wine-making: kinetics and enzyme inhibition**. Process Biochemistry, v. 33, n. 2, 1998, p. 163-168.

GUERRINI, L.M.; BRANCIFORTI, M.C.; BRETAS, R.S.E.; OLIVEIRA, M.P. **Eletrofição do poli(álcool vinílico) via solução aquosa**. Polímeros: ciência e tecnologia. Vol 16, nº4, São Carlos, out./dez. 2006. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-14282006000400007&lang=pt. Acesso em: 08/jan/2011.

HEARLE, J. W. S.; WOODINGS, C. (Ed.). **Regenerated cellulose fibres**. 1ª Edição. Cambridge: Woodhead Publishing Ltd., 2001. 156p.

IHS. Disponível em: <http://www.sriconsulting.com/CEH/Public/Reports/580.0400/>. Acesso em: 06 nov. 2011.

IZIQUE C. **Tecnologia contra o aquecimento global. Brasil sai na frente com etanol, biodiesel e plantio direto**. Ciência e tecnologia no Brasil, Pesquisa FAPESP, nº. 136, p.34-37, 2007.

JI-HUAN H.; YONG L.; LU-FENG M.; YU-QIN W.; LAN X. **Electrospun Nanofibres and Their Applications**. Shawbury, Shrewsbury, Shropshire, SY4 4NR,UK - Reino Unido: iSmithers A wholly owned subsidiary of The Smithers Group. 2008.

JOHNSON T. F. N.; **Regenerated cellulose fibres**. 1ª Edição. Cambridge: Woodhead Publishing Ltd., 2001. 273-289p. Editado por Calvin Woodings.

KAWANO, Y. **Apostila de análises termicas**. Instituto de Química IQ – USP São Paulo, 2000.

KLOCK, U.; MUÑIZ, G. I. B.; HERNANDEZ, J. A.; ANDRADE, A. S. **Química da Madeira** 3ª Edição Revisada – Universidade do Paraná - Curitiba, 2005.

KUENG, W.; SILBER, E.; EPPENBERGER, U.; **Quantification of cells cultured on 96-well plates**. Anal Biochem. 1989;182(1):16-19.

KONWARH, R. ; KARAK, N. ; MISRA, M. **Electrospun cellulose acetate nanofibers: The present status and gamut of biotechnological applications**. Research review paper. 0734-9750/\$ – see front matter © 2013 Elsevier Inc. All rights reserved. 2013.

KUNITZ, M. Crystalline soybean Trypsin Inhibitor, II. General properties. **Journal of General Physiology** , v. 30, n. 4, p. 291-310, 1947.

LANIEVE, H. L. **Handbook of fiber chemistry**. 3ª Edição. Estados Unidos: Taylor & Francis Group. Editado por Menachem Lewin, p.773-808, 2007.

LIM, Y.M.; GWON, H.J.; JEUN, J.P.; NHO, Y.G. **Preparation of Cellulose-based Nanofibers Using Electrospinning**. **Nanofibers**. Ed. Ashok Kumar, 2010. Disponível em: <http://www.intechopen.com/articles/show/title/preparation-of-cellulose-based-nanofibers-using-electrospinning>. Acesso em: 06/jan/2011.

LIU, C. F., SUN, R.C., QIN, M., HANG, A.P., REN, J.L., XUB, F., YE, J., WU, S.B. **Chemical modification of ultrasound-pretreated sugarcane bagasse with maleic anhydride**. Industrial Crops and Products, v.26, p. 212–219, 2007.

MACHADO L. D. B., MATOS, J. R. **Apostila de análises termicas**. Instituto de Química IQ – USP São Paulo, 2000

MEIRELES, C. S. **Síntese e caracterização de membranas de acetato de celulose, obtido do bagaço de cana-de-açúcar, e blendas de acetato de celulose com poliestireno de copos plásticos descartados**. Dissertação (Mestrado em química) – Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia/MG, 2007.

MEIRELES, C. S. **Síntese e caracterização de membranas assimétricas de acetato de celulose obtido a partir da celulose do caroço de manga e do jornal**. Tese (Doutorado em química - Programa multiinstitucional de Doutorado em Química – UFG/UFMS/UFU) – Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia MG, 2011.

MINISTERIO DA SAUDE **MANUAL DE FERIDAS**. 2002

Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_feridas_final.pdf

MONTEIRO e SILVA. **Aplicações Industriais da Biotecnologia Enzimática**. Revista Processos Químicos 2009.

MOSSMAN T. **Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays**. J Immunol Meth. 1983; 65:55-63.

MOURA, M. N. C. **Estudo da Atividade Enzimática da Bromelina Pura e do Resíduo de Abacaxi em Diferentes Ph e Temperatura Constante** Dissertação (Mestrado em Engenharia Química na área de Concentração: Sistemas de Processos Químicos E Informática) Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas. SP Campinas, 2010.

NISTA, S. V. G. **Desenvolvimento e Caracterização de Nanofibras de Acetato de Celulose para Liberação Controlada de Fármacos.** Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas SP Campinas, 2012.

NETO, P. P. A. **Fibras Têxteis Volume 1.**; SENAI-DN: SENAI-CTIQT:CNPQ:IBICT: PADCT: TIB, RJ Rio de Janeiro, 1996

ODIAN, G. **Principles of Polymerization.** 4ª Edição. Estados Unidos: John Wiley & Sons, Inc., Hoboken. College of Staten Island City University of New York Staten Island, New York, New Jersey. 2004

OGEDA, T. L.; PETRI D. F. S. **Hidrólise enzimática de biomassa.** Instituto de Química, Universidade de São Paulo - São Paulo – SP, - Quimica Nova, v. 33, Nº 7 julho de 2010.

OLIVEIRA, F. M. V. **Avaliação de diferentes pré-tratamentos e deslignificação alcalina na sacarificação da celulose de palha de cana.** 2010. 101 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena/SP, 2010.

OLIVEIRA, I. R. W. Z. de; VIEIRA, I. C. **Construção e aplicação de biossensores usando diferentes procedimentos de imobilização da peroxidase de vegetal em matriz de quitosana.** Quim. Nova, Vol. 29, No. 5, 932-939, Set/Out. 2006.

PEREIRA P. H. F.; VOORWALD H. C. J.; CIOFFI M. O. H.; MULINARI D. R.; LUZ S. M.; SILVA M. L. C. P. **Sugarcane Bagasse Pulping and Bleaching: Thermal and Chemical Characterization.** Bio Resources 6(3), 2471-2482. 2011. Disponível em: http://www.ncsu.edu/bioresources/BioRes_06/BioRes_06_3_2471_FernandesP_VCMDP_SC_B_Pulp_Bleach_Therm_Chem_Char_987.pdf. Acessado em: 10/dez/2011.

PRWEB. Disponível em: http://www.prweb.com/releases/prwebcellulose_acetate/flake_plastics_filter_tow/prweb8067438.htm. Acesso em: 06 nov. 2011.

RÁBADE, N. G. ; CORONA, J. A. B. ; BARRADAS, J. S. A. ; SALVADOR, M. D. C. O. **Production of plant proteases in vivo and in vitro — A review.** Research review paper. Biotechnology Advances 29 (2011) 983–996. 2011.

RAMOS, D.G.G. **Têxteis cirúrgicos reutilizáveis e seu impacto ambiental.** Dissertação (Mestrado em Química Têxtil) - Universidade do Minho. Guimarães, 2003.

RHODIA. **Acetow.** Disponível em: http://www.rhodia.com.br/pt/our_company/businesses/acetow/index.tcm Acesso em: 02 out 2014

ROCHA, G.J.M., SILVA, F.T, CURVELO, A. A. S., ARAÚJO, G. T. **A fast and accurate method for determination of cellulose and polyoses by HPLC.** In: BRAZILIAN 1997

RAMOS, D.G.G. **Têxteis cirúrgicos reutilizáveis e seu impacto ambiental**. Dissertação (Mestrado em Química Têxtil) - Universidade do Minho. Guimarães, 2003.

RODRIGUES, G. DA CRUZ, S.F.; PASQUINI, D.; CERQUEIRA, D.A.; PRADO, V.S.; ASSUNÇÃO, R.M.N. **Water flux through cellose triacetate films produced from heterogeneous acetylation of sugar cane bagasse**. Journal of membrane Science 2000, 177, (1-2)225-231.

SALEM, V. **Tingimento textile: Fibras conceitos e tecnologias**. Editora Edgard Bucher Ltda, 2010, p.29.

SARBU, A.; PINHO, M. N. ; FREIXO, M. R. ; GONCALVES, F. ; UDREA, I. **New method for the covalent immobilization of a xylanase by radical grafting of acrylamide on cellulose acetate membranes**. Enzyme and Microbial Technology 39 (2006) 125–130. 2005

SHISHOO, R. L. **Opportunities challenges for fibrous products in healthcare and medical applications**. Medical Textiles. International Conference ago 1999, Bolton UK; p.30-35.

SILVA, G. A. **Compatibilização de Blendas de Acetato de Celulose e Poliestireno com Vinil Triacetoxissilano: Comportamento Morfológico e Biodegradação**. Tese (Doutorado em Engenharia Química) Universidade Estadual de Campinas, Campinas Campinas 2002.

SILVA, C. G. **Bem-vindo ao mundo da nanotecnologia**. – ABQCT – Química Têxtil – nº 77/ dezembro de 2004.

SILVA, R. A. **Caracterização físico-química e purificação da bromelina do Ananas comosus (L.) Merrill (Abacaxi- Bromeliaceae)**. Dissertação (Mestrado em bioquímica e fisiologia) Universidade federal de Pernambuco. CCB. - Recife 2008.

SZCZERBOWSKI, D., PITARELO, A. P., FILHO, A. Z., RAMOS, L. P. **Sugarcane Biomass for Biorefineries: Comparative Composition of Carbohydrate and Non-Carbohydrate Components of Bagasse and Straw**. *Carbohydrate Polymers*, 2014 Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.07.052>. Acesso em: 15 ago 2014

TORRES, M. A. **Produção e caracterização de microesferas de quitosana natural e modificada quimicamente e o seu uso na adsorção das proteínas BSA e Isozima**. Tese (Doutorado) - Faculdade de Engenharia Química; Universidade Estadual de Campinas.Campinas, SP: [s.n.], 2006.

VIDAL, A. C. F. **O renascimento de um mercado: o setor de celulose solúvel**. Papel e celulose. BNDES Setorial 38, p. 79-130. 2013.
Disponível em: http://www.bndes.gov.br/SiteBNDES/export/sites/default/bndes_pt/Galerias/Arquivos/conhecimento/bnset/set3803.pdf Acesso em: 15 ago 2014

WALTER, H. E. **Proteinases: methods with hemoglobin, casein and azocoll as substrates**. In Bergmeyer, H.U. (Ed.). *Methods of Enzymatic Analysis*, v. V. Verlag Chemie, Weinheim, p. 270-277, 1984.

WAN, Y.Q.; GUO, Q.; PAN, N. **Thermo-electro-hydrodynamic model for electrospinning process.** Freund Publishing House Ltd. International Journal of Nonlinear Sciences and Numerical Simulation 5 (1) 5-8, 2004.

WANG, F. J. ; ZHANG, X. Z. ; ZHU, X. ; CHUNG, T. S. ; MOOCHHALA, S. **Cellulose acetate membranes for transdermal delivery of scopolamine base.** Research review paper. Elsevier Science B.V. Materials Science and Engineering. 2002.

http://solutions.3m.com.br/wps/portal/3M/pt_BR

http://reabmed.com.br/index.php?route=product/product&product_id=350