



ANA LUIZA GARCIA MILLÁS

**“INSTALAÇÃO DA TECNOLOGIA DE *ELECTROSPINNING*
PARA A PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE
NANOFIBRAS DE CELULOSE INCORPORADAS COM
ÓLEOS NATURAIS”**

**CAMPINAS
2012**



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA

ANA LUIZA GARCIA MILLÁS

**“INSTALAÇÃO DA TECNOLOGIA DE *ELECTROSPINNING* PARA A
PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOFIBRAS DE CELULOSE
INCORPORADAS COM ÓLEOS NATURAIS”**

Orientador/Supervisor: Prof. Dr. Edison Bittencourt

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Engenharia Química da Unicamp para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Química, na área de Ciência e Tecnologia de Materiais.

Este exemplar corresponde à versão final da dissertação defendida pela aluna Ana Luiza Garcia Millás, e orientada pelo Prof.Dr. Edison Bittencourt.

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Edison Bittencourt", is written over a horizontal line.

Prof. Dr. Edison Bittencourt- Orientador

**CAMPINAS
2012**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DA ÁREA DE
ENGENHARIA E ARQUITETURA - BAE - UNICAMP

M611i Millás, Ana Luiza Garcia, 1983-
Instalação da tecnologia de electrospinning para a
produção e caracterização de nanofibras de celulose
incorporadas com óleos naturais / Ana Luiza Garcia Millás.
--Campinas, SP: [s.n.], 2012.

Orientador: Edison Bittencourt.

Dissertação de Mestrado - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Eletrofiação. 2. Óleos essenciais. 3. Nanofibras. I.
Bittencourt, Edison, 1941-. II. Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Engenharia Química. III. Título.

Título em Inglês: Installation of electrospinning technology for production
and characterization of cellulose nanofibers embedded
with essential oils

Palavras-chave em Inglês: Electrospinning, Essencial oils, Nanofiber

Área de concentração: Ciência e Tecnologia de Materiais

Titulação: Mestra em Engenharia Química

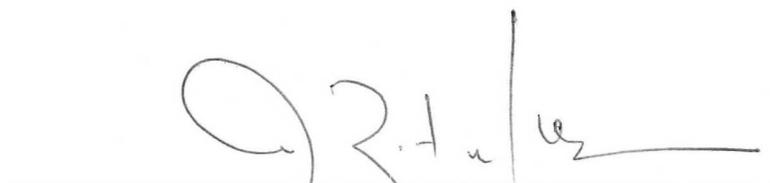
Banca examinadora: Ana Rita Morales , Marcos Akira D'ávila

Data da defesa: 04-07-2012

Programa de Pós Graduação: Engenharia Química

Dissertação de Mestrado defendida por Ana Luiza Garcia Millás e aprovada em 04 de
Julho de 2012 pela banca examinadora constituída pelos doutores:


Prof. Dr. Edison Bittencourt


Profª. Dra. Ana Rita Morales


Prof. Dr. Marcos Akira D'ávila

AGRADECIMENTOS

Pretendo expressar os meus sinceros agradecimentos ao meu orientador, Prof. Dr. Edison Bittencourt, que me deu a oportunidade para ingressar numa área diferente da minha formação e poder ajudar a construir uma linguagem interdisciplinar entre a biologia e a engenharia química.

Agradeço se igual forma ao meu colega e parceiro de trabalho, João Vinícius, pelos ensinamentos e troca de conhecimentos. E a nossa colega Louise pela ajuda e parceria.

Aos membros do Laboratório de Análises, LRAC, Kelly e Adilson, pela atenção e pelas nossas singulares discussões.

A Universidade Estadual de Campinas e ao Departamento de Tecnologia de Polímeros da Faculdade de Engenharia Química, pela formação e a possibilidade de obter o título de mestre nesta instituição.

Um especial agradecimento a todos os que direta ou indiretamente contribuíram para o progresso desse projeto, ao Prof. Marcos Akira da FEM, a Profa. Ana Rita do nosso departamento, ao Prof. Alexandre Santos do IB e ao seu aluno, Rodrigo.

Finalmente, gostaria de expressar os meus agradecimentos aos meus pais, Alice e Eduardo, as minhas irmãs Cristina e Claudia; e ao meu namorado Paulo pelo apoio durante toda esta jornada.

"Our deepest fear is not that we are inadequate. Our deepest fear is that we are powerful beyond measure. We ask ourselves, who am I to be brilliant, gorgeous, talented and fabulous? Actually, who are you not to be ? we were born to make manifest the glory of God that is within us. And as we let our own light shine, we unconsciously give other people permission to do the same." Filme: Akeelah and the Bee, 2006.

RESUMO

A ciência dos biomateriais e a nanotecnologia caminham juntas em busca de novas alternativas e da melhoria das propriedades físicas, químicas e mecânicas dos materiais, relacionadas à alta razão superfície/volume e às dimensões nanométricas que possibilitam obter ótimo desempenho com pouca quantidade de material. Esse trabalho objetivou a produção de nanofibras biodegradáveis e biocompatíveis a partir da solução de acetato de celulose a 10(%m/m) dissolvido em sistema de acetona e água (4:1). A pesquisa partiu da instalação de um equipamento de *electrospinning* e do estudo dos parâmetros que influenciam o processo e a formação de nanofibras através dessa tecnologia. Concentrações entre 1% e 15% dos óleos naturais das espécies *Copaifera langsdorffii* e *Cymbopogon nardus* com comprovadas propriedades cicatrizantes, analgésicas, antimicrobianas e de repelência a insetos foram misturadas a solução de acetato de celulose e estudou-se a influência desses compostos sobre o processo de eletrofiação e a estrutura das fibras confeccionadas. Com foco no óleo de copaíba verificou-se por cromatografia gasosa a sua presença nas nanofibras e foram feitos testes preliminares de viabilidade celular e biocompatibilidade *in vitro*. A intenção futura dessa pesquisa é a aplicação desse material na área da medicina regenerativa de tecidos, como curativos e *scaffolds*. O material foi caracterizado por Microscopia Óptica (MO), Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Análise Termogravimétrica (TGA), Calorimetria Diferencial Exploratória (DSC), Condutividade das soluções e Cromatografia Gasosa (CG).

PALAVRAS-CHAVE: Eletrofiação, Nanofibras, Acetato de Celulose, *Copaifera langsdorffii*, *Cymbopogon nardus*, biocompatibilidade, regeneração de tecidos, óleos essenciais, *scaffolds*, curativos.

ABSTRACT

The science of biomaterials and nanotechnology combine in the search of new alternatives to improve the physical, chemical, and mechanical properties of materials associated with the high surface area to volume ratio, and nanometer dimensions, that provide optimum performance with small amounts of the nano-material. This study aimed to produce biodegradable and biocompatible nanofibers from cellulose acetate at 10 (%w/w) dissolved in acetone and water system (4:1). The research started from the installation of electrospinning equipment and studying the parameters influencing the process and the formation of nanofibers through this technology. Concentrations between 1% and 15% of natural oils, such *Copaifera langsdorffii* and *Cymbopogon nardus* with proven wound healing, analgesics, antimicrobial and insect repellent properties were mixed with the solutions of cellulose acetate. The presence and the influence of these two oils on the electrospinning process and the structure of the fibers prepared were evaluated. The future intention of this work is to apply these nanofibers in the regenerative medicine field, as bandages and *scaffolds*. The material was characterized by Optical Microscopy, Scanning Electron Microscopy (SEM), Thermogravimetric Analysis (TGA), Differential Scanning Calorimetry (DSC), Conductivity and Gas Chromatography (GC). Preliminary tests of cell viability *in vitro* were performed.

KEY WORDS: Electrospinning, Nanofibers, Cellulose Acetate, *Copaifera langsdorffii*, *Cymbopogon nardus*, biocompatibility, regenerative medicine, essential oils, scaffolds, bandages

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. MOTIVAÇÕES	5
2. OBJETIVOS	7
2.1. OBJETIVO GERAL	7
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	8
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	9
3.1. HISTÓRICO DA ELETROFIAÇÃO	9
3.2. A TÉCNICA DE ELETROFIAÇÃO	11
3.3. PARÂMETROS QUE AFETAM A ELETROFIAÇÃO	16
3.3.1. Parâmetros da Solução Polimérica	16
3.3.1.1. Viscosidade da solução	16
3.3.1.2. Tensão Superficial	20
3.3.1.3. Condutividade Elétrica da Solução	21
3.3.1.4. Evaporação e Efeito Dielétrico do solvente	23
3.3.2. Parâmetros do Processo	25
3.3.2.1. Tensão Aplicada	25
3.3.2.2. Distância entre a Ponta da Agulha e o Coletor	27
3.3.2.3. Vazão da Bomba	29
3.3.2.4. Efeito do Coletor	29
3.4. CELULOSE	30
3.5. ACETATO DE CELULOSE	33
3.6. USO TERAPÊUTICO DOS ÓLEOS NATURAIS	34
3.6.1. COPAÍBA (<i>Copaifera langsdorffii</i>)	36
3.6.2. CITRONELA (<i>Cymbopogon nardus</i>)	40
3.7. ENGENHARIA DE TECIDOS (<i>SCAFFOLDS</i> E <i>CURATIVOS</i>)	41
4. MATERIAIS E MÉTODOS	47
4.1. EQUIPAMENTO DE ELETROFIAÇÃO	47

4.2. MATÉRIAS-PRIMAS.....	48
4.2.1. Celulose.....	48
4.2.3. Óleos Naturais.....	48
4.3. PRODUÇÃO DAS NANOFIBRAS.....	48
4.3.1. Nanofibras de acetato de celulose.....	49
4.3.2. Nanofibras de acetato de celulose com óleos naturais.....	49
4.4. CARACTERIZAÇÃO DO MATERIAL.....	49
4.4.1. Microscopia Óptica (MO).....	49
4.4.2. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	50
4.4.3. Análise termogravimétrica (TGA).....	51
4.4.4. Calorimetria Diferencial Exploratória (DSC).....	51
4.4.5. Condutividade das Nanofibras.....	52
4.4.6. Cromatografia Gasosa (CG).....	52
4.5. TESTES DE VIABILIDADE CELULAR DAS NANOFIBRAS.....	52
4.5.1. Cultura de Células <i>Vero</i> (fibroblastos).....	54
4.5.1.1. 1º Ensaio de Viabilidade Celular.....	55
4.5.1.2. 2º Ensaio de Viabilidade Celular.....	57
4.6. Preparo das Amostras para MEV.....	58
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	59
5.1. NANOFIBRAS DE ACETATO DE CELULOSE.....	59
5.2. NANOFIBRAS DE ACETATO DE CELULOSE E ÓLEOS NATURAIS..	62
5.3. ANÁLISES POR CROMATOGRAFIA GASOSA.....	67
5.3.1. Cromatografia Gasosa do Óleo de Copaíba.....	67
5.3.2. Cromatografia Gasosa do Óleo de Citronela.....	71
5.4. ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA.....	72
5.5. ANÁLISE CALORIMÉTRICA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC) .	75
5.6. ANÁLISES DE CONDUTIVIDADE ELÉTRICA.....	78
5.7. ENSAIOS DE VIABILIDADE CELULAR <i>IN VITRO</i>	79
5.7.1. 1º Ensaio de Viabilidade Celular <i>In vitro</i>	79
5.7.2. 2º Ensaio de Viabilidade Celular <i>In vitro</i>	80

5.8. OBSERVAÇÕES FINAIS	86
6. CONCLUSÕES	88
7. TRABALHOS FUTUROS E SUGESTÕES.....	90
BIBLIOGRAFIA	92

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Comparação entre fibras de Poli(etileno tereftalato) na escala nanométrica e um cabelo humano na escala micrométrica (FRENOT, 2003). P.2

Figura 2- Esquema representativo do *Electrospinning* proposto por Formhals (adaptado de Formhals, 1944). P. 10

Figura 3- Cone de Taylor. Fonte: <http://www.yflow.com>. P. 10

Figura 4- Esquema do aparato de eletrofiação. (adaptado de Dong et al., 2010). P. 12

Figura 5- Equipamento convencional de fiação do polímero fundido. Fonte: SALOMAO, 2006. P. 13

Figura 6: Esquemas de eletrofiação a) Nanofibras aleatórias depositadas sobre coletor estático, b) Nanofibras alinhadas depositadas sobre coletor giratório, (adaptado de VENUGOPAL *et al.*, 2007). P.15

Figura 7- Evolução da formação de fibras em função da variação da concentração do polímero: (a) menor concentração do polímero (b) concentração semi-diluída e (c) concentração ótima (GUPTA, 2005). P.19

Figura 8: [A] Na presença dos óleos o solvente se distribui sobre as cadeias do acetato de celulose emaranhadas. [B] Sem a adição dos óleos o solvente tende a se agregar sobre a ação da tensão superficial. (Adaptado de RAMAKRISHNA *et al.*, 2005). P.21

Figura 9- Evolução do *Cone de Taylor* e do jato com o aumento da tensão aplicada (PORTELA, 2010). P.26

Figura 10- Nylon 6,6 (a) 2 cm de distância para deposição e (b) 0.5cm de distância. Fonte: RAMAKRISHNA *et al.*, 2005. P.28

Figura 11- Diâmetro das fibras em função da distância entre a extremidade da agulha e o coletor (RAMOS, 2007). P.29

Figura 12 – Esquema de uma fibra lignocelulósica de *Eucalyptus sp.* Adaptado de RUBIRA et al, 2009. P.31

Figura 13 - Publicações com o termo ‘cellulose’ dos últimos anos. Fonte: (SIRÓ; PLACKETT, 2010). P.32

Figura 14- Monômero do di-acetato de celulose (CERQUEIRA et al., 2006). P.33

Figura 15- Árvore da espécie *C. Langsdorffii*. Fonte: <http://oleosessenciais.org>. P.37

Figura 16- Participação dos principais países importadores de óleo de copaíba no volume total exportado pelo Brasil (VEIGA et al., 2002). P.37

Figura 17- a) venda do produto nas feiras de Manaus/AM e b) a extração do óleo de copaíba pela população local das florestas da Amazônia. Fonte: próprio autor. P.38

Figura 18- Principais compostos do óleo de copaíba, diterpenos (ácido copálico, ácido hardwickiico, ácido caurenóico) e sesquiterpeno, cariofileno. Adaptado de VEIGA et al., 1997; <http://oleosessenciais.org>. P.39

Figura 19 - Fórmulas estruturais dos três principais constituintes terpênicos do óleo de citronela. (adaptado de PERINI, 2008). P.41

Figura 20 - Gráfico do número de publicações por ano onde se combinou os termos “polymers ou drugs ou scaffolds” e “degradable ou biodegradable ou bioreabsorbable ou absorvable ou erodible” (VERT, 2008). P.45

Figura 21 - Equipamento de eletrofiação do laboratório SINPOL/UNICAMP. P. 47

Figura 22 - Materiais e equipamentos do Laboratório de Anatomia do Instituto de Biologia utilizados nos testes de viabilidade celular das nanofibras a) Materiais; b) Estufa; c) Capela

de Fluxo Laminar; d) Autoclave; e) Microscópio Óptico; f) Centrífuga. Fonte: do próprio autor. P. 53

Figura 23: Etapa 4: Análise de adesão celular e contaminação por MO. P.56

Figura 24: Segundo ensaio de adesão celular, utilizando suportes cilíndricos acrílicos para fixar as nanofibras no fundo dos poços (Laboratório de Anatomia/IB/UNICAMP) P.58

Figura 26: Aspecto da nanofibra de acetato de celulose produzida no laboratório. Fonte: próprio autor.P.60

Figura 27 - Nanofibras de acetato de celulose produzidas com concentrações de 5, 7,5, 10, 12,5, 15 e 17,5% (m/m). O menor diâmetro de fibras foi alcançado na concentração de 10% (m/m) de AC e a menor incidência de beads na concentração de 12,5% (m/m) (Ampliação de 5.000x). P.61

Figura 28 - Micrografias de nanofibras incorporadas com 5% de óleo de citronela, 10% de óleo de copaíba e acetato de celulose puro a 10%(m/m), respectivamente. (Ampliação de 5.000x). P.63

Figura 29 - Micrografias de nanofibras de acetato de celulose incorporadas com 1%; 5%; 10% e 15% de óleo de copaíba (Ampliação de 1.500x). P.65

Figura 30 - Micrografias de nanofibras de acetato de celulose incorporadas com 1%; 5%; 10% e 15% de óleo de copaíba (Ampliação de 5.000x). P.66

Figura 31 – Cromatografia gasosa do óleo bruto da espécie *Copaifera langsdorffii*. Sesquiterpeno cariofileno indicado pelo primeiro pico em vermelho, diterpenos ácido copálico e ácido caurenóico indicados pela segunda região em vermelho e ácido hardwickiico pelo terceiro pico em vermelho. P.68

Figura 32 – Cromatografia gasosa do óleo da espécie *Copaifera langsdorffii* a 15% extraído da nanofibra de acetato de celulose. Sesquiterpeno cariofileno indicado pelo primeiro pico em vermelho, diterpenos ácido copálico e ácido caurenóico indicados pela segunda região em vermelho e ácido hardwickiico pelo terceiro pico em vermelho P.68

Figura 33 – Cromatografia gasosa do óleo bruto do gênero *Copaifera*. Sesquiterpeno cariofileno indicado pelo primeiro pico, diterpenos ácido copálico e ácido caurenóico indicados pela segunda região e ácido hardwickiico pelo terceiro pico em vermelho (BIAVATTI et al., 2006).P.69

Figura 34 - Cromatograma da espécie *Copaiba multijuga*. Primeira eluição de sesquiterpenos e segunda região de eluição de diterpenos (VEIGA et al., 1997).P.70

Figura 35 – Cromatografia gasosa do óleo da espécie *Cymbopogon nardus* a 5% extraído da nanofibra de acetato de celulose. Primeiro monoterpeneo indicado em vermelho Citronelal, segundo Citronelol (Laboratório LRAC, UNICAMP, 2011). P.71

Figura 36 – Cromatografia gasosa do óleo essencial da espécie *Cymbopogon nardus* a 5% extraído da nanofibra de acetato de celulose. Monoterpeneo indicado em vermelho Geraniol (Laboratório LRAC , UNICAMP, 2011)P.72

Figura 37 - Resultado de TGA para amostra de nanofibra de acetato de celulose puro. P.73

Figura 38 - Comparação dos resultados de TGA variando-se as porcentagens de óleo de copaíba.P.74

Figura 39 - Gráfico dos resultados de TGA para as cinco amostras de nanofibras analisadas.P.75

Figura 40 - Comparação dos resultados de DSC variando-se as porcentagens de óleo da espécie *Copaifera* sp. nas nanofibras de acetato de celulose. Curvas de 40 °C a 250 °C. P.76

Figura 41 - Comparação dos resultados de DSC variando-se as porcentagens de óleo da espécie *Copaifera* sp. nas nanofibras de acetato de celulose. Curvas de 180 °C a 250 °C. P.77

Figura 42 - Condutividade elétrica das soluções de acetato de celulose com concentrações de 0, 1, 2 e 5% de óleo da espécie *Copaifera* sp.P.79

Figura 43 - Células VERO aderidas em amostra controle. P.79

Figura 44 - Primeiro teste de viabilidade celular das nanofibras para adesão de fibroblastos: a) nanofibra de acetato de celulose com a Copaíba 10%; b) logo após lançamento das células VERO na superfície da nanofibra. (Ampliação MO: 40x), P.80

Figura 45 - Testes de viabilidade celular (fibroblastos NIH 3T3) de nanofibras de PVA e PVA/quitosana (LIANG *et al.*, 2009). P.81

Figura 46 - Imagens de microscopia eletrônica de varredura (Ampliação de 10.000x). Nanofibras de acetato de celulose após teste de viabilidade celular *in vitro* com fibroblastos (células VERO): a) nanofibra incorporada com 15% de óleo de copaíba; b) nanofibra incorporada com 10% de óleo de copaíba; c) nanofibra de acetato de celulose puro (10%*m/m*); d) nanofibra incorporada com 5% de óleo de citronela. P.83

Figura 47 - Imagens de microscopia eletrônica de varredura (Ampliação de 6.000x). Nanofibras de acetato de celulose após teste de viabilidade celular *in vitro* com fibroblastos (células VERO): a) nanofibra incorporada com 15% de óleo de copaíba; b) nanofibra incorporada com 10% de óleo de copaíba; c) nanofibra de acetato de celulose puro (10%*m/m*); d) nanofibra incorporada com 5% de óleo de citronela. P.84

Figura 48 - Imagens de microscopia eletrônica de varredura (Ampliação de 1.000x). Nanofibras de acetato de celulose após teste de viabilidade celular *in vitro* com fibroblastos (células VERO): a) nanofibra incorporada com 15% de óleo de copaíba; b) nanofibra incorporada com 10% de óleo de copaíba; c) nanofibra de acetato de celulose puro (10%*m/m*); d) nanofibra incorporada com 5% de óleo de citronela. P.85

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 – Biopolímeros provenientes de fontes naturais. P. 3
- Tabela 2- Condutividade elétrica dos solventes usados na eletrofição. P.22
- Tabela 3- Constante Dielétrica dos solventes usados na eletrofição. P.24
- Tabela 4 - Dimensões da Nanocelulose. P.32
- Tabela 5 - Número de diterpenos encontrados nos óleos de copaíba autênticos, P.39
- Tabela 6 - Relação entre atividades farmacológicas e constituintes químicos do óleo de copaíba. P.40
- Tabela 7 - Polímeros eletrofiáveis e o diâmetro das fibras formadas: P.43
- Tabela 8 - Critérios a serem respeitados para potenciais polímeros candidatos a aplicações *in vivo* por tempo limitado: P.44
- Tabela 9 - Lista de reagentes e solventes utilizados.P.55
- Tabela 10 - Amostras de nanofibras para o teste de viabilidade celular. P.57
- Tabela 11 - Porcentagem de cristalinidade das amostras de nanofibras. P.77
- Tabela 12 - Amostras de nanofibras para o teste de viabilidade celular. P.81

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1.

$$\tau = \mu \frac{\partial u}{\partial y}$$

Equação 2.

$$[h] = K.M^a$$

Equação 3.

$$\%C = \frac{\Delta H_f}{\Delta H_f^o} \times 100$$

NOMENCLATURA

Latinas

f	Coeficiente de fricção ou de atrito
Tg	Temperatura de transição vítrea
Tm	Temperatura de fusão cristalina
Pa.s	Unidade de viscosidade, pascal segundo

Gregas

θ	Ângulo de contato
γ	Energia de superfície
P	Unidade de Viscosidade (<i>poise</i>)

Abreviaturas

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ASTM	American Society for Testing and Materials

DTA *Derivative Thermogravimetric Analysis* – Derivada da Análise Termogravimétrica

DSC *Differential Scanning Calorimetry* – Calorimetria Diferencial Exploratória

MEV Microscopia Eletrônica de Varredura

PAN Poli(acrilo nitrila) ou poliacrilonitrila

TGA *Thermogravimetric Analysis*– Análise Termogravimétrica

1. INTRODUÇÃO

A demanda por respostas, remédios, vacinas e meios preventivos a novas doenças tem crescido a cada dia, como a própria sigla LOHAS sugere, “lifestyles of health and sustainability”, busca-se hoje o bem-estar global. Através dos planos estratégicos sustentáveis e compartilhados que trabalham com o tripé da consciência social, econômica e ambiental conjuntamente, (KIM et al., 2009), presume-se que as soluções devam seguir um viés ambientalmente sustentável, *eco-friendly* e que utilizem materiais naturais, biodegradáveis e renováveis.

Nada mais plausível do que procurar tais soluções dentro da própria natureza. Como se sabe, a natureza tem o dom para o mundo miniaturizado, as suas estruturas mais complexas e de maior perfeição estão nanometricamente arquitetadas. Foi a partir da observação e do entendimento das formas e da biogênese da natureza, que se criou o conceito de *biomimética* (BENYUS, 2005), um ramo que tem crescido mundialmente e que busca reproduzir materiais de alta performance com igual ou similar complexidade que a natureza é capaz de produzir.

A essência da nanotecnologia é a concepção e a utilização de materiais e dispositivos ao nível dos átomos, moléculas, e estruturas supramoleculares, que possuem no mínimo uma dimensão menor ou igual a 100nm. Sendo que o setor comercial permite a mesma conotação para fibras menores que 500nm como materiais nanoestruturados (RAMAKRISHNA et al., 2005). Na Figura 1 nota-se a diferença entre os diâmetros de uma fibra em escala nanométrica e um fio de cabelo humano em escala micrométrica:

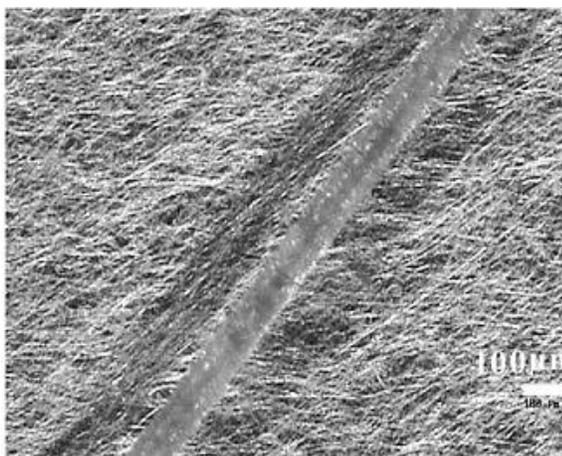


Figura 1 - Comparação entre fibras de Poli(etileno tereftalato) na escala nanométrica e um cabelo humano na escala micrométrica (FRENOT, 2003).

Devido às pequenas dimensões e a alta razão de aspecto, a nanotecnologia (TANIGUCHI, 1974) é capaz de conferir novas propriedades aos materiais ou melhorá-las amplamente em termos físicos (carga de ruptura, módulo, abrasão, resistência térmica); químicos (catalisadores, trocas iônicas, membranas); biológicos (antimicrobianos, biocompatibilidade), e eletrônicos (propriedades ópticas, elétricas e magnéticas).

Foi a partir dessa necessidade que esse trabalho se projetou, tomando a nanotecnologia, a biomimética e a técnica de eletrofiação para a produção de micro e nanofibras como matérias subliminares a toda criação e metodologia utilizadas.

Os biomateriais têm sido largamente utilizados em sistema diagnósticos e terapêuticos (AMARAL et al., 2003; LANGER et al, 2004), de natureza natural ou sintética, podem ser usados temporária ou definitivamente, com a finalidade de melhorar ou substituir, parcial ou totalmente, tecidos ou órgãos (WILLIAN, 1987). Muitas vezes é interessantes que esses biomateriais possuam uma matriz tridimensional, porosa e nanometricamente arquitetada para aumentar a interação entre as células e tecidos (NERURKAR et al., 2007) e otimizar o papel de carreadores de funções biológicas que ocorrem em escala molecular com alto grau de especificidade (SUI et al., 2007). O primeiro objetivo da engenharia de tecidos para *scaffolds* é simular a matriz extracelular (LIAO et al., 2006).

A eletrofiação, mais conhecida como *electrospinning* (FORMHALS, 1934), tem recebido bastante atenção no ramo da engenharia de tecidos, primeiramente pela facilidade em se produzir fibras ultrafinas, com alta razão superfície/volume sem a necessidade de uma instrumentação cara e complexa (RENEKER *et al.*, 1996); segundo por se aplicar a uma grande variedade de polímeros, naturais e sintéticos; e terceiro pela possibilidade de se controlar o diâmetro, a disposição aleatória ou alinhada dos filamentos, a porosidade e a topografia das fibras, variando-se as condições do processo (equipamento) e da solução polimérica (DEITZEL *et al.*, 2001; RAMAKRISHNA *et al.*, 2005).

Os polímeros naturais disponíveis no mercado para a produção de micro e nanofibras podem ser de origem vegetal, animal ou microbiana (*Ver* Tabela 1) e as suas propriedades são passíveis de serem alteradas por diferentes métodos físicos e químicos. Isto permite a seleção das propriedades desejadas tais como capacidade de absorção de água, cinéticas de degradação, ou propriedades mecânicas com especificações apropriadas a determinadas aplicações (MATSUI, 2007). Muito do interesse nesses polímeros naturais vem da característica de biocompatibilidade, relativa abundância, disponibilidade comercial e “fácil” processamento (KHANG *et al.*, 2011).

Tabela 1 – Biopolímeros provenientes de fontes naturais.

Plantas/Algas	Animais	Bactérias	Font
Amido (amilose, amilopectina)	Ácido hialurônico	Quitina	
Celulose	Quitina	Quitosana	
Pectina	Quitosana	Xantano	
Alginato		Poligalactosamina	
Carraginato		Gelano	
Gomas		Dextrano	
Soja, glúten de trigo			
Caseína, soro de albumina			
Sedas			
Elastina			
Polihidroxialcanoatos			

e: KAPLAN, 1998.

Os produtos naturais celulósicos possuem características como a viabilidade da utilização de micro e nanofibras, e de materiais particulados. A alta razão superfície/volume das nanofibras produzidas faz delas um interessante veículo para a produção de curativos e

scaffolds visando a cicatrização e a enxertia de pele artificial, capazes de competir com materiais sintéticos consolidados comercialmente no ramo da engenharia de tecidos (HAYASHI, 1994).

A dificuldade em se trabalhar com a celulose pura está relacionada a natureza altamente cristalina e ordenada de suas cadeias o que dá lugar a um problema técnico na escolha do solvente adequado que consiga acessar as regiões cristalinas e diminuir as interações intermoleculares, essencial ao preparo das soluções na eletrofição. Esse fato tornou a utilização do acetato de celulose mais viável a pesquisa, pela facilidade de manipulação e dissolução em solventes como acetona e água.

Nos últimos anos aumentou o número de pesquisas que buscam métodos para funcionalizar ou tornar as nanofibras bioativas (JI, 2011), seja através da adição de biomoléculas, agregando as propriedades físicas dos *scaffolds* às propriedades biológicas de fatores de crescimento (VENDRAMIN et al. 2006) ou genes terapêuticos (LUU et al., 2003) ou através da técnica de eletrofição coaxial (ZHANG et al., 2006), onde dois ou mais componentes podem ser eletrofiados por diferentes canais de capilaridade e exercerem sinergicamente suas funções.

Foi pensando na produção de nanofibras bioativas que garantissem as propriedades de biocompatibilidade, hidrofiliabilidade e biodegradabilidade que a idéia de incorporar óleos naturais e essenciais as matrizes nanofibrosas com comprovadas ações terapêuticas, cicatrizantes, analgésicas e antimicrobianas das espécies *Copaifera langsdorffii* e *Cymbopogon nardus* se projetou. Portanto, além do desempenho físico fornecido pela escala nanométrica que oferece superfície suficiente ao crescimento celular e ao contato entre os filamentos e da superfície porosa que beneficia a penetração do meio extracelular e das próprias células no tecido; com a adição dos óleos, buscou-se também melhorar o desempenho biológico.

O conceito de sinergia (do grego *synergía*, cooperação *syn*, juntamente com *érgon*, trabalho) se aplica a idéia desse trabalho de criar um nanocompósito que busca unir as qualidades dos seus diferentes componentes, onde sinergia “É definida como o efeito ativo

e retroativo do trabalho ou esforço coordenado de vários subsistemas na realização de uma tarefa complexa ou função” (CORNING, 1983).

1.1. MOTIVAÇÕES

O método empregado para a produção das nanofibras foi a técnica de fiação eletrostática, ou *electrospinning*, uma tecnologia incipiente no Brasil e considerada mundialmente uma das melhores alternativas para a produção de nanofibras, por ser relativamente simples e barata. (RAMAKRISHNA, 2005).

Baseado no número de publicações científicas nesta área e tomando como base o número crescente de implantações da eletrofiação em escala mundial, tanto no campo acadêmico quanto industrial, esse aumento progressivo é entusiasmante à pesquisa.

Ainda, evidenciada pela sua multidisciplinaridade, o processo requer a reunião de diferentes áreas acadêmicas, como as teorias relativas ao campo elétrico, à mecânica dos fluidos, à eletrodinâmica e à química e biologia dos polímeros. Dada a variedade de disciplinas intervenientes, o comportamento do processo é considerado instável, pois há uma variedade de parâmetros que o influenciam e que devem ser estudados conjuntamente já que são interdependentes.

Esta técnica primariamente foi pensada para aplicações na indústria têxtil, que até agora emprega preferencialmente processos de alongação mecânica de materiais fundidos a determinadas temperaturas para a produção de fios ou fibras com diâmetros de aproximadamente 10 μ m, como é o caso do poliéster (CHOI, 2008), enquanto a eletrofiação é capaz de produzir fibras com diâmetros menores que 2 μ m (HAAS et al., 2010) Quando propriedades como maior resistência mecânica ou maior estabilidade hidrodinâmica são requeridas, é aconselhável o uso da eletrofiação já que é uma técnica capaz de produzir fibras com diâmetros menores que 500nm e alto desempenho mecânico (KOWALEWSKI, 2005).

Posteriormente as aplicações têxteis surgiram motivações para a utilização dessas nanofibras na área da biomedicina, como *scaffolds* ou curativos no campo da engenharia de tecidos para regeneração cutânea, diagnóstico, dispositivos para liberação controlada de fármacos, próteses, biomembranas, etc. Essas nanoestruturas revelam características interessantes, nomeadamente a biocompatibilidade, a biofuncionalidade, a flexibilidade, a degradação controlada e aspectos morfológicos da superfície fibrosa, como porosidade e tridimensionalidade (LIAO et al., 2006, VERT et al., 2008).

O aspecto inovador dessa pesquisa está em trabalhar com óleos naturais com comprovadas propriedades terapêuticas e incorporá-los as nanofibras biocompatíveis que servirão como suportes de tecidos cutâneos lesionados.

Em síntese, o fato de o projeto estar envolto num ambiente acadêmico, não retira o objetivo de expandir as funcionalidades a ambientes de produção industrial, dada a oportunidade de desenvolver estruturas funcionais e diferenciadas pelos diâmetros ultrafinos das fibras.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

O objetivo desse trabalho foi a instalação de um sistema de eletrofição orientado para a produção de nanofibras a partir do acetato de celulose, verificando e levantando os parâmetros e variáveis do equipamento e da solução polimérica que influenciam o processo e a estrutura das fibras formadas. As nanofibras foram incorporadas com óleos naturais das espécies *Copaifera langsdorffii* e *Cymbopogon nardus*. Esse projeto visa à aplicação futura na área da medicina regenerativa de tecidos (*scaffolds* e curativos).

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Revisão bibliográfica da técnica de *electrospinning*/eletrofiação;
2. Montagem e instalação do equipamento no laboratório, seguindo as etapas de projeto, implementação e controle de alguns parâmetros do sistema.
 - O projeto refere-se à aquisição dos dispositivos necessários à montagem do equipamento, o estudo da disposição ideal dos dispositivos na bancada, a definição dos parâmetros a ajustar continuamente durante o processamento, a identificação das variáveis, e, por último, o estudo dos métodos de controle adequados. Para a automatização do sistema é dada a possibilidade de controlar: o fluxo de saída da solução polimérica, a diferença de potencial aplicada pela fonte de alta tensão e a distância e posição da agulha relativamente ao coletor.
3. Determinação das melhores condições de processamento;
4. Análise das diferentes metodologias de dissolução da celulose pura e seleção do acetato de celulose como matéria prima a ser utilizada no trabalho;
5. Definição da melhor concentração de acetato de celulose e do sistema de solventes utilizado para as melhores condições de processamento;
6. Incorporação de 1, 2, 5, 10 e 15% de concentração dos óleos das espécies: *Copaifera langsdorffii* e *Cymbopogon nardus*, as soluções de acetato de celulose pré-eletrofiadas;
7. Verificação da influência desses óleos sobre o processo de eletrofiação e a estrutura das fibras depositadas;
8. Caracterização dos materiais produzidos quanto as suas propriedades, por: microscopia eletrônica de varredura (MEV), ensaios termodinâmicos (TGA, DSC), condutividade e Cromatografia Gasosa (CG).
9. Obtenção de metodologia para os testes preliminares de viabilidade celular (adesão e proliferação) *in vitro* das nanofibras incorporadas com os óleos naturais, visando à aplicação futura como *scaffolds* e curativos para regeneração de tecidos.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. HISTÓRICO DA ELETROFIAÇÃO

Como relatado por Stanger *et al.* (2005) em 1500 Willian Gilbert observou que quando uma porção de âmbar¹ devidamente friccionada (acumulando força eletrostática) entrava em contato com uma gota de água sobre uma superfície seca ela se tornava cônica, essa teoria foi mais tarde complementada por Lord Rayleigh que demonstrou a instabilidade de gotas líquidas quando na presença de um campo elétrico.

O jato que se formava quando séries de gotas se juntavam em consequência da instabilidade de cargas eletrostáticas que superavam a tensão superficial das gotas, permitiu, em 1902 nos Estados Unidos, que John Cooley patenteasse o sistema de *electrospraying* que se intitulou "*Apparatus for electrically dispersing fibres*", e consiste em uma câmara preenchida com um fluido que carregado eletricamente pela aplicação de alta voltagem, produz fibras que são coletadas em uma segunda câmara (JAWOREK, 2008).

O *electrospinning* foi patenteado em 1934 por Anton Formhals com o título de "*Process and apparatus for preparing artificial threads*" (FORMHALS, 1934), ele utilizou o acetato de celulose como o polímero da fiação e empregou como solvente, uma solução de acetona/álcool a uma diferença de potencial de 57 kV (DEITZEL, 2001-2). O primeiro aparato desenvolvido por Formhals era composto por um reservatório para fornecimento da solução, um dispositivo coletor para o alongamento e alinhamento das fibras depositadas e uma fonte de alta tensão em corrente contínua com dois eletrodos posicionados entre a saída da solução e o coletor. Em 1944, Formhals patenteou um novo processo no qual a solução de polímero se depositava diretamente sobre uma base móvel, a partir de um conjunto de agulhas contendo a mesma solução (FORMHALS, 1944), como pode ser observado na Figura 2:

¹ Âmbar: gênero de resina fóssil com propriedade de adquirir cargas elétricas pela fricção.

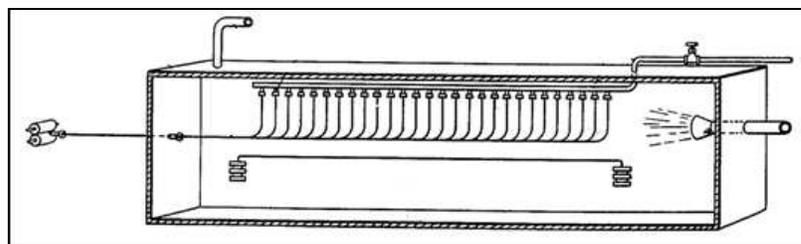


Figura 2- Esquema representativo do *Electrospinning* proposto por Formhals (adaptado de Formhals, 1944).

Entre 1964 e 1969, Geoffrey Taylor observou que quando um fluido era colocado sobre um campo de alta voltagem (TAYLOR, 1964), a carga injetada produzia uma força oposta a tensão superficial do líquido e quando o campo elétrico aplicado aumentava ainda mais, a superfície da solução se alongava formando um cone, chamado *Cone de Taylor* (Figura 3) (POPAT, 2011).

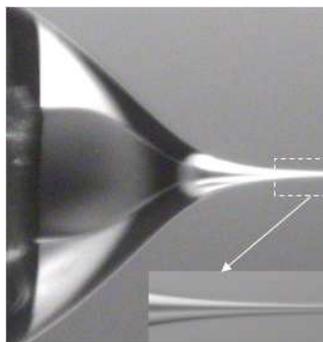


Figura 3- Cone de Taylor. Fonte: <http://www.yflow.com>

Em 1971 Baumgarten iniciou estudos sobre como os parâmetros e variáveis do equipamento e da solução tinham influência sobre a estrutura e a disposição das fibras, investigando a correlação entre o diâmetro das fibras, o comprimento do jato, a viscosidade da solução, o fluxo e o gás do meio.

Doshi e Reneker em 1995 trouxeram uma visão mais voltada para o campo da nanotecnologia, dedicando-se ao potencial do *electrospinning* em produzir materiais nanoestruturados. Doshi utilizou poli(óxido etileno) (PEO) como solução para montar um modelo matemático sobre a formação das fibras e Reneker utilizando câmeras de vídeo de

alta velocidade, verificou como o jato se ramificava ao longo do caminho entre a agulha e o coletor. A partir daí o número de publicações descrevendo a influência das condições de processamento aumentou.

3.2. A TÉCNICA DE ELETROFIAÇÃO

A técnica consiste em produzir nanofibras a partir de um polímero fundido, ou de uma solução polimérica eletricamente carregada, que segundo Haas *et al.* (2010) é capaz de produzir fibras com diâmetros entre 10 μ m e 10nm. Em geral, o sistema de deposição consiste em três componentes básicos: uma fonte de alta tensão em Corrente Contínua (CC) ligada eletricamente a um fluido (polímero diluído ou fundido), um dispositivo de infusão (“bomba”) para realizar a injeção do fluido armazenado numa seringa de vidro dotada de uma agulha com ponta cortada perpendicularmente ao comprimento e um coletor de material condutor, de cobre ou alumínio.

Através da aplicação de alta voltagem (5-30kV) e baixa corrente (0,1-1 μ A) (PORTELA, 2010), um campo elétrico é criado entre a agulha e o coletor, ao mesmo tempo em que a bomba injetora força uma determinada taxa de saída da solução polimérica que é também carregada eletricamente. Quando a quantidade de cargas na solução é suficientemente grande para atingir um valor crítico e superar a tensão superficial, o *Cone de Taylor* se forma na ponta da agulha, de onde se origina o jato que será atraído por diferença de potencial elétrico para o dispositivo coletor, aterrado (LARRONDO *et al.*, 1981). No caminho entre a agulha e a placa coletora, o jato passa por uma região de menor potencial e à medida que se distancia da ponta da agulha o solvente evapora e o diâmetro dos feixes reduz. Esse aparato básico do *electrospinning* está mostrado na Figura 4:

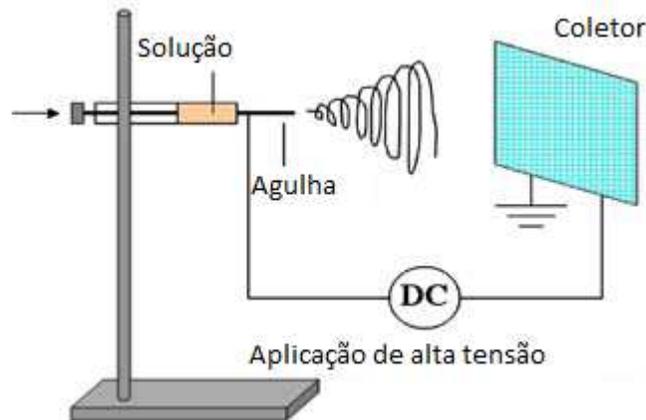


Figura 4- Esquema do aparato de eletrospinning. (adaptado de Dong et al., 2010).

Embora conceitualmente seja um processo relativamente simples, o *electrospinning* tem desafios significativos, sendo um deles a exposição em ambientes industriais. Uma das principais críticas à técnica é a baixa taxa de produtividade, quando comparada aos processos convencionais de produção de fibras. Sugestões vêm sendo experimentadas na tentativa de aumentar o campo de fibras formadas, como a utilização de mais seringas ou mais agulhas acopladas a uma seringa com volumes maiores de material injetado, além da aplicação de fluxos de vazão maiores, como a 24ml/h, vazão testada com a policaprolactona (LIAO, 2006).

As técnicas hoje existentes para a produção de nanofibras são: *drawing*, *templated synthesis*, separação de fases, *self-assembly* e eletrospinning. A eletrospinning ainda é considerada a técnica mais viável, pois produz matrizes longas e contínuas de nanofibras com mais facilidade e por um baixo custo quando comparada as outras técnicas.

As técnicas convencionais, como a fiação úmida (*wet-spinning*), a fiação seca (*dry-spinning*) ou a fiação do fundido (*melt-spinning*) (Figura 5), produzem fibras com diâmetros da ordem de 50 μ m, podendo chegar a 2 μ m como referenciado por Salomão (2006). Essas técnicas dependem da força mecânica de extrusoras que bombeiam a solução ou o polímero fundido através de fendas com milhares de orifícios (FLEMING, 2011) e à medida que a fibra se forma, os filamentos se solidificam ou coagulam (SHANMUGASUNDARAM, 2004). O “*dry spinning*” fabrica filamentos à taxa de 200 –

1500 m min⁻¹, enquanto os filamentos criados pelo processo de *electrospinning* são obtidos a uma taxa de 30 m min⁻¹.

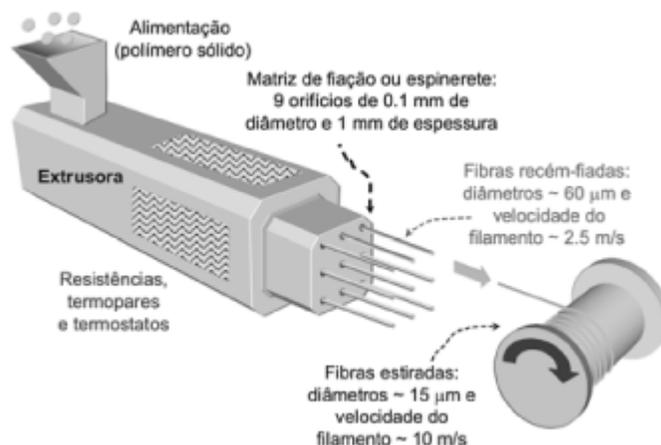


Figura 5- Equipamento convencional de fiação do polímero fundido. Fonte: SALOMAO, 2006.

Portanto, o desenvolvimento de novas tecnologias para a produção de fibras em escala nanométrica é um importante foco de investigação no campo da ciência de materiais, incluindo as áreas da medicina, têxtil, a indústria química, farmacêutica, de embalagens, eletrônica e odontológica. Além de ser uma tecnologia ainda incipiente no Brasil.

A vantagem do *electrospinning* é que nanofibras podem ser produzidas diretamente a partir da solução polimérica e se aplica a uma ampla variedade de polímeros, tanto sintéticos, quanto naturais, como proteínas biogênicas estruturais e polissacarídeos; além da possibilidade de copolimerização ou blends, através da mistura de diferentes polímeros a outros materiais solúveis, como óleos essenciais, fármacos, fatores de crescimento celular, resinas, etc. Além da fácil manipulação para controle da arquitetura fibrilar, como diâmetro, morfologia, topografia superficial (PAPENBURG *et al*, 2011) e porosidade (RAMAKRISHNA *et al*, 2005). Portanto, é uma tecnologia flexível, versátil e viável do ponto de vista do custo-benefício, de equipamento e de produção, se destacando por ser a técnica mais difundida mundialmente (JI *et al.*, 2011), mas ainda incipiente no Brasil.

Tanto para os métodos convencionais de produção de fibras, quanto para a eletrofição faz-se necessário o uso de variedades especiais de polímeros. A solução polimérica a ser usada deve ser preparada com acurada composição de solventes e solutos; além da adequada distribuição de peso molecular entre as cadeias macromoleculares para assegurar uma viscosidade ideal e, ao mesmo tempo, elevada elasticidade. No entanto, devido à grande variedade de materiais poliméricos, as propriedades das fibras obtidas podem variar muito e a escolha de cada material depende da aplicação a que se destina.

Empiricamente, os solventes precisam ter três requisitos primordiais para o sucesso da eletrofição, dentre os quais, devem ser: (i) solventes semi-condutíveis com capacidade de carga moderada; onde normalmente são utilizados solventes orgânicos devido a suas constantes dielétricas e a condutividade que permitem que a solução fique eletricamente carregada, (ii) pressão de vapor ou volatilidade do solvente deve ser adequada para que ele evapore rápido o suficiente para manter a integridade da fibra quando atingir o alvo, mas não tão rápido para impedir que a fibra endureça antes de chegar à escala nanométrica, e (iii) a capacidade de dissolver os polissacarídeos com menores interações intermoleculares possíveis. (OHKAWA, 2009).

A evaporação do solvente produz fibras sólidas que, na maioria das vezes se deposita no coletor metálico na forma de não-tecidos devido à deposição aleatória das fibras. A obtenção de uma malha com fibras ordenadas ou alinhadas é possível e depende do coletor desse material (SUNDARAY *et al.*, 2004; YANG *et al.*, 2005). Venugopal *et al.* (2005) cita a utilização de um coletor de alumínio giratório para a deposição de fibras alinhadas (ver Figura 6.b), mas ressalta que nesse aparato o diâmetro das fibras é maior (750-850nm) que o diâmetro das fibras aleatórias produzidas pelo coletor estático (125-600nm) (ver Figura 6.a). Em trabalhos futuros pretende-se adaptar um coletor giratório ao equipamento onde esta pesquisa está sendo realizada.

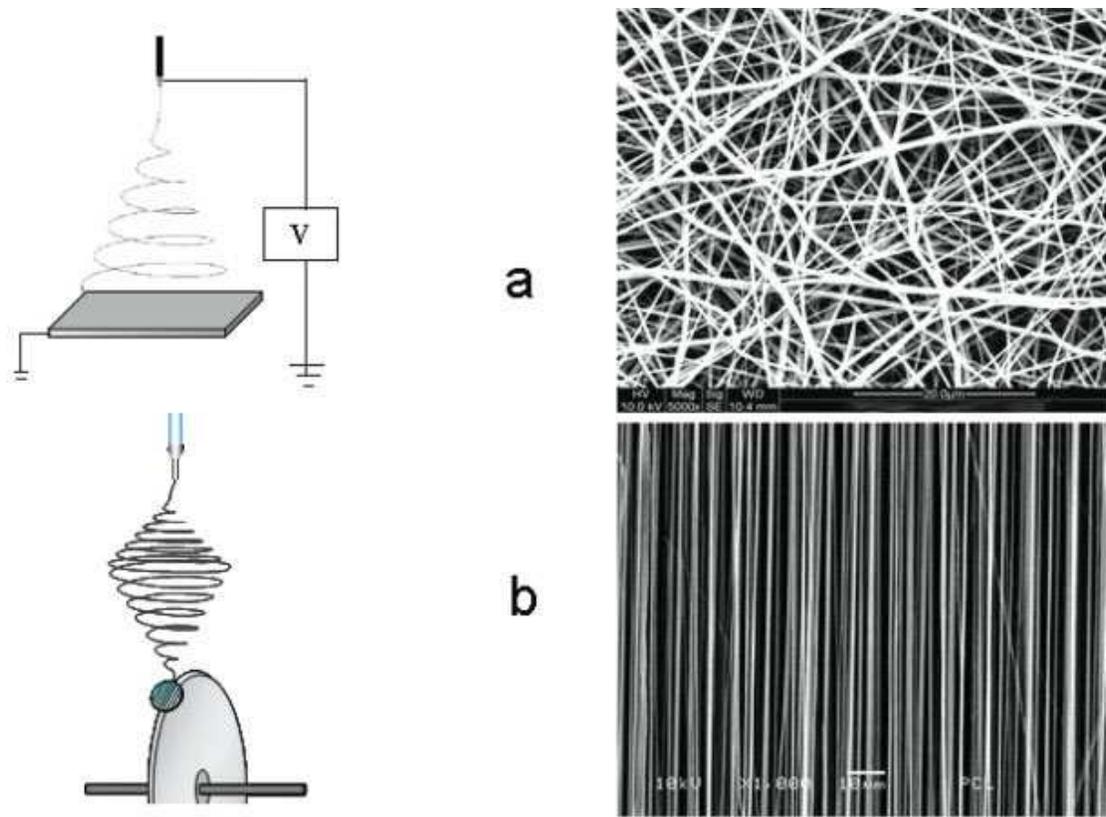


Figura 6: Esquemas de eletrofiação a) Nanofibras aleatórias depositadas sobre coletor estático, b) Nanofibras alinhadas depositadas sobre coletor giratório, (adaptado de VENUGOPAL *et al.*, 2007).

O poliéster (PET), as poliamidas (PA) e o polipropileno (PP), por apresentarem elevadas propriedades mecânicas, estabilidade térmica e química, são os polímeros mais utilizados e aprendidos pela indústria têxtil (SALOMAO, 2006). Neste trabalho, por três razões principais o polímero estudado foi a celulose, primeiro por ser um recurso renovável e abundante na natureza, segundo pela aplicação que se pretende dar ao material produzido: na área da biomedicina é interessante que o polímero utilizado tenha as propriedades de biocompatibilidade e biodegradabilidade, e terceiro pelas propriedades estruturais, morfológicas e bioquímicas vantajosas a aplicação. Além dos ainda insuficientes estudos na área.

3.3. PARÂMETROS QUE AFETAM A ELETROFIAÇÃO

Existem dois grupos de parâmetros que podem ser controlados e que afetam o processo de eletrofiação e a arquitetura morfológica das fibras resultantes, são os parâmetros da solução polimérica, como a viscosidade, tensão superficial, condutividade e constante dielétrica, e os parâmetros do equipamento, como a tensão aplicada, vazão da seringa, distância da ponta da agulha ao anteparo e o efeito do material do coletor. Todas essas variáveis são interdependentes; procurar otimizá-las e combiná-las é essencial para alcançar a morfologia e tamanho de fibra desejadas.

Deve-se considerar também que cada equipamento tem a sua peculiaridade e depende muito do polímero e do solvente utilizados.

No próximo item cada uma das variáveis que influenciam o processo e a estrutura do material será discutida separadamente. As condições atmosféricas, como umidade e temperatura também podem influenciar a eletrofiação (DE VRIEZE et al., 2009), mas não serão discutidas nesse trabalho.

3.3.1. Parâmetros da Solução Polimérica

A viscosidade, a tensão superficial, a condutividade da solução e a constante dielétrica do solvente estão intimamente ligados e desempenham papel crucial na formação das fibras durante a eletrofiação. A extensão do alongamento do jato entre a ponta da agulha e o coletor, o efeito sobre o diâmetro das fibras resultantes e a formação de grânulos '*beads*' ou pequenas gotas solidificadas ao longo do comprimento da fibra podem ser controlados através dessas quatro variáveis.

3.3.1.1. Viscosidade da solução

A viscosidade é a propriedade física que caracteriza a resistência de um fluido ao escoamento ou a deformação por cisalhamento em função da temperatura. No sistema internacional, a unidade de viscosidade é pascal segundo (Pa.s). Contudo, a unidade de

viscosidade mais usada em artigos de investigação é o *poise* (P), em homenagem ao fisiologista francês Jean Louis Poiseuille (1799 – 1869).

Define-se pela lei de Newton, onde a constante μ é o *coeficiente de viscosidade*, *viscosidade absoluta* ou *viscosidade dinâmica*. :

$$\tau = \mu \frac{\partial u}{\partial y} \quad \text{Eq.1}$$

Para as soluções poliméricas, como demonstra a equação de Staudinger-Mark-Houwink, a configuração das cadeias afeta a viscosidade intrínseca da solução, que representa o volume hidrodinâmico das cadeias, dado pelo peso molecular médio (M) do polímero, pela constante de proporcionalidade, K , que é característica do polímero, do solvente e pela exponencial α , função da configuração da cadeia polimérica em solução. Quanto mais favorável for a interação polímero-solvente (bom solvente) maior será a viscosidade intrínseca (RAMAKRISHNA et al, 2005). A relação entre viscosidade intrínseca e massa molar é dada pela equação 2:

$$[h] = K.M^\alpha \quad \text{Eq.2}$$

Normalmente a viscosidade intrínseca é alta em “bons” solventes e baixa em solventes “pobres” (ALFREY, 1946). Quando ocorre uma dissolução favorável, as cadeias poliméricas tendem a tomar uma configuração esticada e energeticamente estável, pois o solvente entra na sua estrutura e impede o contato entre elas, sem causar perturbações; a viscosidade intrínseca nesse caso tende a ser maior. Esse é o caso da acetona usada como solvente do acetato de celulose nesse trabalho.

Quando o solvente não é adequado ao polímero usado ocorre um processo endotérmico e energeticamente instável; as cadeias se enovelam, pois expulsam o solvente que está entre as suas estruturas, fazendo com que elas entrem em contato e a viscosidade intrínseca diminua (CANEVAROLO, 2002).

Baumgarten em 1971 foi o primeiro a demonstrar que o diâmetro das fibras e o comprimento do jato eram tanto maiores quanto mais viscosa fosse a solução. Ele ainda demonstrou que a umidade atmosférica tem efeito sobre a evaporação dos solventes e que o tipo de atmosfera, os gases presentes no meio também tem efeito sobre o diâmetro das fibras.

O entrelaçamento entre as cadeias e a viscosidade são, portanto, determinantes sobre alguns aspectos da fibra resultante, como a formação de pequenos grânulos ‘beads’ na superfície das fibras quando em solução de baixa viscosidade e pouco entrelaçamento (SHENOY *et al* , 2005). Com o aumento da viscosidade, o diâmetro das fibras aumenta (FONG H. *et al*, 1999), mas também pode dificultar o escoamento da solução através da seringa (KAMEOKA *et al*, 2003). Além disso, quando a viscosidade é muito alta, a solução pode secar na ponta da agulha antes de formar o jato (ZHONG X.H. *et al*, 2002).

A interação entre a intensidade do campo elétrico formado e as cargas elétricas do jato determina a distribuição dos diâmetros das fibras obtidas e a formação ou não de jatos secundários, que se ramificam a partir do jato principal e formam fibras de menor diâmetro (RENEKER *et al.*, 2000). Isso pode explicar a diferença na distribuição de diâmetro das fibras observadas em alguns casos. No entanto, quando a viscosidade é alta o suficiente, duas coisas podem acontecer: a alta viscosidade pode desencorajar a formação de jatos secundários, contribuindo para o aumento do diâmetro dos filamentos ou a fibra se deposita em uma área menor do coletor, pois como não ocorre instabilidade na flexão do jato, não há dispersão dos feixes que saem da ponta da agulha (RAMAKRISHNA *et al.*, 2005).

O alongamento do jato sem que se rompa antes de chegar ao anteparo depende do entrelaçamento das cadeias do polímero. Uma solução monomérica ou de cadeias muito pequenas de polímero, por exemplo, não formam um jato contínuo, nem fibras (RAMAKRISHNA *et al*, 2005).

Existe uma relação entre a viscosidade e a tensão superficial de uma solução (*item* que será discutido adiante). Em uma solução de menor viscosidade há maior quantidade de moléculas de solvente que se aglomeram e o entrelaçamento entre as cadeias também é menor, o que significa que a tensão superficial é mais baixa e isso influencia a formação do

jato. Quando a viscosidade é maior significa que as cadeias estão mais emaranhadas, a tensão superficial tende a ser maior, portanto mais carga sobre o jato da eletrospinação é capaz de esticar a solução com as moléculas de água distribuídas entre as cadeias poliméricas. Com o aumento da viscosidade, o diâmetro das fibras aumenta também (DEMIR *et al.* 2002).

A viscosidade e a tensão superficial do solvente devem ser adequadas, nem muito altas evitando que o jato se forme, nem demasiadamente pequenas para permitir a drenagem da solução de polímero no corpo da seringa e a formação do jato.

Uma maneira de aumentar a viscosidade e alterar a tensão superficial da solução é aumentar a concentração de polímero (LIU *et al.*, 2002), alternativa experimentada nesse trabalho com o acetato de celulose e demonstrada por Gupta *et al.*(2005) que utilizou três concentrações diferentes de acetato de celulose. A uma baixa concentração (Figura 7a) não houve formação de fibras, somente a deposição de gotas de solução no coletor; a uma concentração média do polímero (Figura 7b) houve deposição de fibra, mas ainda há gotas ‘beads’ na estrutura; e a uma concentração ótima (figura 7c) os filamentos se depositaram uniformemente e não houve formação de ‘beads’:

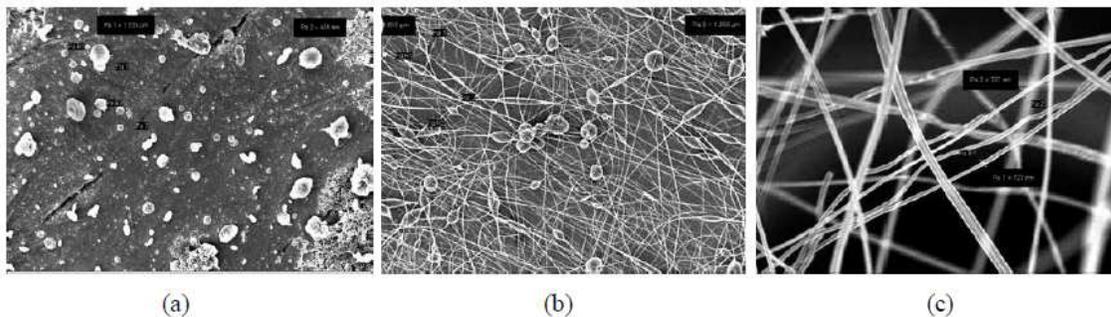


Figura 7- Evolução da formação de fibras em função da variação da concentração do polímero: **(a)** menor concentração do polímero **(b)** concentração semi-diluída e **(c)** concentração ótima (GUPTA, 2005).

Larrondo e Manley (1981) obtiveram fibras através da fusão de Polietileno (PE) e Polipropileno (PP). O resultado demonstrou diâmetros superiores aos obtidos a partir das soluções de cada um dos polímeros. Adicionalmente, descobriram que a temperatura de

fusão dos polímeros é inversamente proporcional ao diâmetro das fibras, sendo este também influenciado pela tensão aplicada e a viscosidade do polímero fundido.

3.3.1.2. Tensão Superficial

A tensão superficial tem o efeito de diminuir a área da superfície por unidade de massa de um fluido, dada por N/m. Um fluido em contacto com uma superfície sólida toma uma forma, determinada pela relação entre três forças: a força da gravidade, a força da interação entre as suas moléculas (forças de coesão) e a força de interação entre essas moléculas e as partículas da superfície sólida (forças de aderência). Quando a solução se encontra num estado de equilíbrio, as moléculas no interior dela são solicitadas igualmente em todas as direções pelas forças de atração das moléculas vizinhas. As moléculas da superfície do fluido sofrem apenas atração lateral e inferior. Devido à interação conjunta destas forças, existe uma tensão na superfície que faz a mesma comportar-se como uma membrana elástica, originando uma forma curva.

O início da eletrofiação requer que a solução carregada eletricamente pela aplicação de um campo elétrico supere a tensão superficial da gota que se forma na ponta da agulha e sob a influência das cargas eletrostáticas, as moléculas de solvente tendem a se espalhar sobre as cadeias emaranhadas do polímero (DOSHI, 1995). No entanto, no caminho do jato ao coletor, a tensão superficial pode provocar a formação de ‘beads’, que são moléculas de solvente livres que se unem e formam aglomerados que se depositam no anteparo coletor. Normalmente a viscosidade mais elevada da solução significa que há maior interação entre as moléculas de solvente e polímeros, evitando que isso ocorra.

Segundo Fong H. *et al* (1999) o etanol por ser um solvente de baixa tensão superficial pode ser adicionado para incentivar a formação de fibras lisas e mais uniformes. Outra sugestão proposta por Zeng *et al* (2003) para reduzir a tensão superficial é a adição de surfactante à solução. Ele diz que mesmo quando um surfactante insolúvel é disperso em uma solução na forma de pó fino, a morfologia das fibras também é melhorada. Teoria também confirmada por Lin T. (2004) que observou alterações na reologia e na condutividade, além da tensão superficial quando adicionado um surfactante.

Os surfactantes diminuem a tensão superficial da solução e ajudam a aumentar a interação entre o solvente e as cadeias do soluto (ver Figura 8), evitando a ocorrência de grânulos (*beads*) na superfície das fibras. Pode ser que os óleos naturais incorporados as nanofibras neste trabalho façam esse papel; diminuindo a tensão superficial as cadeias ficam mais esticadas e interconectadas por solvente e óleo, numa relação estável e pouco energizada, não endotérmica.

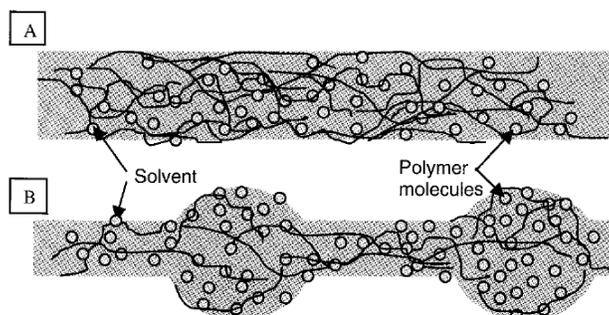


Figura 8: [A] Na presença de surfactantes o solvente se distribui sobre as cadeias do polímero emaranhadas. [B] Sem a adição de surfactantes o solvente tende a se agregar sobre a ação da tensão superficial. (Adaptado de RAMAKRISHNA *et al*, 2005).

3.3.1.3. Condutividade Elétrica da Solução

“A condutividade de uma solução é determinada pela capacidade de movimento (em massa) dos íons presentes na solução ou ainda, a facilidade com que a solução é capaz de conduzir uma corrente elétrica” (PORTELA, 2010). Soluções com alta condutividade terão maior capacidade de carga do que soluções com baixa condutividade. Doshi e Reneker (1995) foram os primeiros a analisar matematicamente esse parâmetro, recorrendo a solução de poli (óxido etileno) (PEO) (DOSHI, 1995).

Dentre as três características que os solventes devem ter para o sucesso da eletrofição, Ohkawa *et al.* (2009) citou a semi-condutividade ou capacidade de carga moderada. A Tabela 2 informa o índice de condutividade de alguns solventes utilizados na eletrofição. Os solventes orgânicos embora conhecidos pela baixa condutividade, muitos deles têm certo nível de condutividade (são semi-condutíveis), como a acetona utilizada

nesse trabalho e indicada na Tabela 2 pelo valor de 0,0202mS/m. Geralmente, soluções preparadas com esse tipo de solvente formam fibras mais uniformes e evitam a formação de grânulos ‘beads’ ao longo da superfície do material, enquanto que nenhuma fibra é formada em solução com condutividade próxima a zero.

Tabela 2- Condutividade elétrica dos solventes usados na eletrofição.

Solvent	Conductivity (mS/m)	Reference
1,2-Dichloroethane	0.034	Jarusuwannapoom et. al. (2005)
Acetone	0.0202	Theron et. al. (2004)
Butanol	0.0036	Prego et. al. (2000)
Dichloromethane/ Dimethylformamide (40/60)	0.505	Theron et. al. (2004)
Dichloromethane/ Dimethylformamide (75/25)	0.273	Theron et. al. (2004)
Dimethylformamide	1.090	Jarusuwannapoom et. al. (2005)
Distilled Water	0.447	Theron et. al. (2004)
Ethanol	0.0554	Prego et. al. (2000)
Ethanol (95%)	0.0624	Theron et. al. (2004)
Ethanol/Water (40/60)	0.150	Theron et. al. (2004)
Methanol	0.1207	Prego et. al. (2000)
Propanol	0.0385	Prego et. al. (2000)
Tetrahydrofuran/Ethanol (50/50)	0.037	Theron et. al. (2004)

Fonte: RAMAKRISHNA *et al.*, 2005.

A eletrofição envolve o estiramento da solução que sai da ponta da agulha, causado pela repulsão das cargas da sua superfície e movimento de corrente elétrica no seu interior; esses efeitos completam o circuito elétrico que proporcionam a energia necessária para manter o fluxo.

Quando as cadeias poliméricas não são totalmente esticadas, há formação de ‘beads’ e fibras não uniformes. Alguns autores experimentaram adicionar íons como sal ou polieletrólitos, ou ainda, adicionar drogas ou proteínas que normalmente formam íons quando dissolvidos em água, para aumentar a condutividade e observar os efeitos sobre a estrutura das fibras (SON *et al.* 2004). Zhang *et al.* (2005) adicionou íons de NaCl (variando de 0,05 a 0,2%) à solução de PVA/água, e notou que o diâmetro médio diminuiu de 214 ± 19 nm para 159 ± 21 nm (ZHANG, 2005).

Uma outra maneira de aumentar a condutividade da solução para diminuir o tamanho das fibras e a incidência de grânulos (*beads*) é mudar o pH da solução. Em pH básico, a eletrofição da solução de acetato de celulose resulta em redução significativa no diâmetro das fibras em comparação a solução com pH neutro (SON W.K. *et al.* 2004). O acetato de celulose sofre desacetilação em condições de pH básico, os íons OH formados são capazes de exercer maior influência na condução e no esticamento da solução.

O aumento de carga favorece a formação de fibras mais finas. No entanto, existe um limite para a redução do diâmetro, a interação entre o reagente que é adicionado para melhorar a condutividade da solução e a solução original pode ter um impacto significativo sobre a fibra resultante. Por exemplo, a adição de sal iônico pode causar um aumento da viscosidade da solução. Assim, embora a condutividade da solução possa ser aumentada, a força viscoelástica é mais forte do que as forças de *Coulomb*, resultando em um aumento no diâmetro da fibra (CHOI *et al.* 2004, GENG, X. Y. *et al.*, 2005).

A influência da condutividade de uma solução polimérica na dimensão das fibras ou no comportamento do jato foi abordada em diversas investigações. Hayati *et al.* testemunhou que soluções altamente condutoras revelavam-se extremamente inconstantes na presença de fortes campos elétricos, manifestando aumento do diâmetro do jato e das fibras depositadas. Por outro lado, semi-condutores e isolantes líquidos, como óleos parafínicos, apresentaram fibras relativamente sólidas e uniformes, embora possuam poucas cargas livres na superfície do líquido (PORTELA, 2010).

3.3.1.4. Evaporação e Efeito Dielétrico do solvente

A constante dielétrica de um solvente é a capacidade que ele tem de reduzir a intensidade do campo elétrico em torno de uma partícula carregada imersa na sua solução. A polaridade forte da água é indicada por uma constante dielétrica de 80 conforme a Tabela 3 e de 20,7 para a acetona, já o dimetilsulfóxido (DMSO) utilizado como solvente em trabalhos paralelos tem constante dielétrica indicada por 46,7. Solventes com uma

constante dielétrica menor que 15 são geralmente considerados apolares e não são adequados a eletrofiação.

A constante dielétrica de um solvente tem uma influência significativa sobre a eletrofiação. Geralmente, uma solução com maior constante dielétrica reduz a formação de grânulos ‘beads’ e do diâmetro das fibras resultantes (SON W.K. *et al*, 2004). A instabilidade do jato também aumenta quanto maior é a constante dielétrica. Isso é demonstrado pelo aumento da área de deposição das fibras. A constante dielétrica de alguns solventes comuns utilizados na eletrofiação é mostrada na Tabela 3.

Tabela 3- Constante Dielétrica dos solventes usados na eletrofiação.

Solvent	Dielectric constant	Reference
2-Propanol	18.3	MERCK technical data sheet
Acetic acid	6.15	Wannatong et. al. (2004)
Acetone	20.7	Berkland et. al. (2004)
Acetonitrile	35.92-37.06	Wannatong et. al. (2004)
Chloroform	4.8	Berkland et. al. (2004)
Dichloromethane	8.93	Yang et. al. (2004c)
Dimethylformamide	36.71	Yang et. al. (2004c)
Ethyl acetate	6.0	Berkland et. al. (2004)
Ethanol	24.55	Yang et. al. (2004c)
m-Cresol	11.8	Wannatong et. al. (2004)
Methanol	32.6	MERCK technical data sheet
Pyridine	12.3	MERCK technical data sheet
Tetrahydrofuran	7.47	Wannatong et. al. (2004)
Toluene	2.438	Wannatong et. al. (2004)
Trifluoroethanol	27.0	Berkland et. al. (2004)
Water	80.2	MERCK technical data sheet

Fonte: RAMAKRISHNA *et al*, 2005.

Além disso, para ocorrer a formação das fibras, é necessária a presença de um solvente com alta pressão de vapor (HE *et al*. 2005). Sistemas que utilizam água misturada a outro solvente também funcionam. Contudo, se a pressão de vapor não for suficientemente alta, pode haver a formação excessiva de grânulos ‘beads’ (gotículas presas as fibras).

3.3.2. Parâmetros do Processo

Os parâmetros do processo ou também chamados de ‘externos’ (RAMAKRISHNA, 2005) são também importantes, pois junto com os parâmetros da solução discutidos na sessão anterior, afetam a formação e a morfologia das fibras. Aqui serão discutidos: a tensão (voltagem) aplicada, a vazão da bomba de deslocamento positivo, a distância da ponta da agulha ao coletor e o efeito do material do coletor.

Apesar das variáveis como temperatura, umidade, tipo de atmosfera (gases), pressão, características da seringa e o diâmetro da agulha utilizada também influenciarem, serão parâmetros a serem discutidos em trabalhos futuros.

3.3.2.1. Tensão Aplicada

A diferença de potencial elétrico entre os dois eletrodos do equipamento e a indução de cargas na solução pela aplicação de alta voltagem, desencadeiam a formação do *Cone de Taylor* e a eletrofiação se inicia. Conforme Papenburg (2011) a voltagem varia entre 10 e 30 kV. Quando a força eletrostática da gota na ponta da agulha supera a tensão superficial o jato se inicia. As cargas repulsivas do jato, forças de *Coulomb*, esticam a solução viscoelástica. Se a tensão aplicada é maior, uma quantidade maior de cargas faz com que o jato passe a acelerar mais rápido e mais volume de solução deve ser disponibilizado na ponta da agulha para formar o jato, caso contrário, a insuficiência de solução pode resultar em *Cones de Taylor* instáveis e menores (ZHONG X.H. *et al.* 2002). Quando visualmente a velocidade de deposição das fibras sobre o coletor é maior que a oferta de solução a partir da fonte, o *Cone de Taylor* pode recuar para a agulha (DEITZEL *et al.*, 2001). A figura 9 mostra a evolução do *Cone de Taylor* e do jato com o aumento da tensão aplicada:

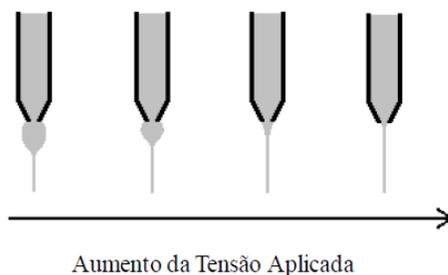


Figura 9- Evolução do *Cone de Taylor* e do jato com o aumento da tensão aplicada (PORTELA, 2010).

A tensão aplicada (corrente elétrica) e o campo elétrico (kV/cm) criado têm influência no estiramento e na aceleração do jato, que, por conseguinte, irão interferir na morfologia das fibras obtidas. Na maioria dos casos, a maior tensão conduzirá ao melhor estiramento da solução devido ao aumento das forças de eletrostáticas no jato, e ao forte campo elétrico criado. Esse efeito reduz o diâmetro das fibras (BUCHKO *et al.* 1999). Quando uma solução de baixa viscosidade é utilizada, uma tensão maior pode favorecer a formação de jatos secundários que reduzem o diâmetro das fibras (RENEKER *et al.*, 2000; DEMIR *et al.* 2002). Outro fator que pode influenciar o diâmetro das fibras é o tempo de voo do jato. O aumento do tempo de voo dará mais tempo para que a fibra estique e se alongue antes de se depositar no coletor. Assim, quando aplicada uma tensão mais baixa, há redução da aceleração do jato e do campo elétrico, o que aumenta o tempo de voo e favorece a formação de fibras mais finas. Deitzel (2001) observou que altas tensões aumentam a tendência para a formação de grânulos '*beads*'. O aumento na densidade de '*beads*' devido ao aumento da tensão pode ser devido ao aumento na instabilidade do jato, como quando o *cone de Taylor* recua para a agulha e interrompe o jato (ZHONG X.H. *et al.* 2002).

O efeito da alta tensão não é apenas sobre o aspecto físico das fibras, como comentado por Zhao *et al.* (2004), ela também influencia na cristalinidade das fibras de polímero. O campo eletrostático pode fazer com que as macromoléculas do polímero se orientem durante o *electrospinning* induzindo maior cristalinidade. No entanto, acima de certa voltagem, a cristalinidade da fibra é reduzida. Com a tensão crescente, a aceleração

das fibras aumenta e isso reduz o tempo de vôo a ponto de não dar tempo das cadeias poliméricas se orientarem antes da deposição (ZHAO et al. 2004).

Como a eletrofiação ocorre graças as cargas presentes no jato e a diferença de potencial criada, essas cargas podem ser influenciadas por campos elétricos externos ao equipamento, o que afeta o caminho do jato e o processo em si. Assim, é de suma importância o completo isolamento do equipamento para que não haja influências elétricas externas.

3.3.2.2. Distância entre a Ponta da Agulha e o Coletor

O tempo que o jato leva para alcançar o coletor e a intensidade do campo elétrico gerado pela aplicação de alta tensão são variáveis cruciais e interdependentes, calculadas na eletrofiação pela unidade kV/cm. O solvente precisa evaporar antes de chegar ao coletor, a diminuição da distância entre a ponta da agulha e o coletor e o aumento da voltagem aplicada surte o mesmo efeito, já que aumentam a intensidade do campo elétrico (RENEKER, 1996).

Quando a distância entre a ponta da agulha e o coletor é reduzida demais não há tempo para o solvente se evaporar e pode ocorrer a formação de grânulos '*beads*' ao longo da superfície da fibra ou o excesso de solvente faz com que os filamentos depositados se fundam, como mostra a figura 10. Além disso, quanto menor for a distância, a intensidade do campo elétrico aumenta, o que torna a velocidade do jato maior e o diâmetro dos filamentos tende também a aumentar.

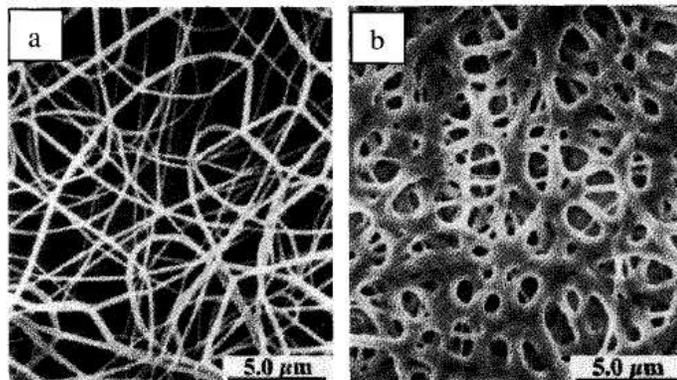


Figura 10- Nylon 6,6 (a) 2 cm de distância para deposição e (b) 0.5cm de distância. Fonte: RAMAKRISHNA *et al*, 2005.

Pela literatura revisada costuma-se trabalhar a uma distância que varia entre 5 e 25cm, mas esse valor depende das características da solução, o efeito da variação da distância pode ou não ter efeito significativo sobre a morfologia da fibra (RENEKER *et al*, 2000). Se a distância (variável na ordem de milímetros) entre a agulha e o coletor é reduzida, o jato desloca-se diretamente para o coletor quase em linha reta; se a distância for ampliada, o jato torna-se instável e se ramifica (DOSHI, 2000) até contatar o coletor, ou como mais tarde foi observado por Reneker (2001) através de uma câmera filmadora de alta resolução, nessa área de instabilidade o jato forma uma espiral.

Ramos et al. (2007) fez esse estudo para uma solução de Poli(acrilo nitrila) (PAN). A relação do diâmetro médio das fibras em função do afastamento da agulha ao coletor é observada na Figura 11. Observa-se que a partir de 14cm de distância, o diâmetro das fibras não sofre mais significativa alteração, provavelmente devido a diminuição do campo elétrico, da velocidade do jato e do estiramento das cadeias, forças que impedem a redução do diâmetro das fibras.

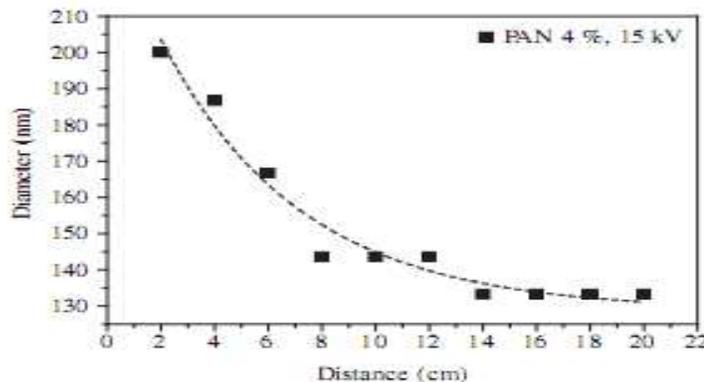


Figura 11- Diâmetro das fibras em função da distância entre a extremidade da agulha e o coletor (RAMOS, 2007).

3.3.2.3. Vazão da Bomba

A vazão irá determinar a quantidade de solução disponível para o *electrospinning*. Para uma dada tensão há uma vazão correspondente que faz com que o *Cone de Taylor* se mantenha estável e não deixe a solução se solidificar na ponta da agulha, nem pingar na superfície do equipamento por excesso de solução antes do jato se formar. Quando a vazão é maior, há um aumento no diâmetro da fibra, porém existe um limite para isso, pois a vazão tem que ser correspondente à taxa que a solução é levada pelo jato, que é correspondente ao aumento de cargas (ZHONG *et al.* 2002). Devido ao grande volume de solução que sai da ponta da agulha, o jato leva um tempo maior para evaporar. Os solventes residuais podem se fundir as fibras, formando redes. A menor vazão é mais desejável para o solvente ter tempo para evaporar (YUAN *et al.* 2005).

3.3.2.4. Efeito do Coletor

A placa coletora deve ser de material condutor como cobre ou alumínio, pois é necessário um campo elétrico entre a seringa e o coletor. Nesse trabalho optou-se por trabalhar com alumínio. A placa é eletricamente aterrada de modo que haja uma diferença de potencial estável entre a seringa e o coletor. No caso, quando um material não-condutor é usado como coletor, rapidamente as cargas se acumulam no coletor, o que resulta em menos fibras depositadas (RAMAKRISHNA *et al.*, 2005).

3.4. CELULOSE

O termo "celulose" foi pela primeira vez usado em 1838 por Anselme Payen, quando descobriu que os tecidos de plantas, *linters* de algodão, pontas de raízes e os óvulos das flores quando purificados com ácido de amônia, seguido da extração da água, um material fibroso se formava. Desde então, a celulose foi aceita como uma cadeia polimérica linear constituída por unidades de D-anidroglicose, ligadas por ligações β (1 \rightarrow 4) B-glucopiranosose $[C_6H_{10}O_5]_n$ (NISHIYAMA et al., 2002).

A celulose é o composto orgânico mais abundante presente na natureza (CRAWFORD, 1981; UPDEGRAFF, 1969), é inodoro, biodegradável, insolúvel em água e na maioria dos solventes orgânicos. O seu monômero, glucose é solúvel em água, diferentemente da celulose e apenas trinta anéis desse monômero são suficientes para representar essa característica da celulose. Apesar de ser um material hidrofílico, é difícil de dissolver em soluções aquosas, devido à presença de fortes ligações inter e intramoleculares por ponte de hidrogênio e forças de Van der Waals (HEINZE et al., 2005).

Trata-se de um polímero cristalino com aproximadamente 65 a 70% de fase cristalina e 30 a 35% amorfa. Por se tratar de um material estrutural de células fibrosas com alto módulo e nível de rigidez por unidade de peso, pode ser utilizada como reforço para materiais compósitos. Em sua forma de nanofibras possui desempenho muito superior que outros materiais como o Kevlar[®] e o aço em suas propriedades mecânicas.

Presentes na forma de fibras lignocelulósicas compostas por três constituintes principais: a lignina, uma macromolécula de cadeia carbônica ainda pouco compreendida com uma estrutura altamente complexa, constituída de componentes alifáticos e aromáticos, formando bainhas ao redor das fibras naturais o que mantém a estrutura da constituição da fibra que corresponde a 20-28%; a hemicelulose com 20-30% que serve como componente compatibilizante entre as cadeias de celulose e de lignina, formadoras do compósito lenhoso e a celulose em maior porcentagem variando de 40-90%. Além desses componentes existem compostos inorgânicos e moléculas facilmente extraíveis com

solventes orgânicos, como: graxas, pectinas, carboidratos simples, gomas, resinas, alcalóides, terpenos e polifenólicos (RUBIRA *et al*, 2009).

A fibra lignocelulósica tem uma estrutura de três camadas complexas, cada uma com função e estruturas diferenciadas em espessura e orientação das microfibrilas, dando proteção, suporte mecânico e transporte. Há uma camada primária inicialmente depositada durante o crescimento das células, que circunda uma parede secundária, composta por três subcamadas (S1, S2 e S3). O lúmen é protegido por essas camadas e contem os nutrientes a serem transportados, representadas na Figura 12.

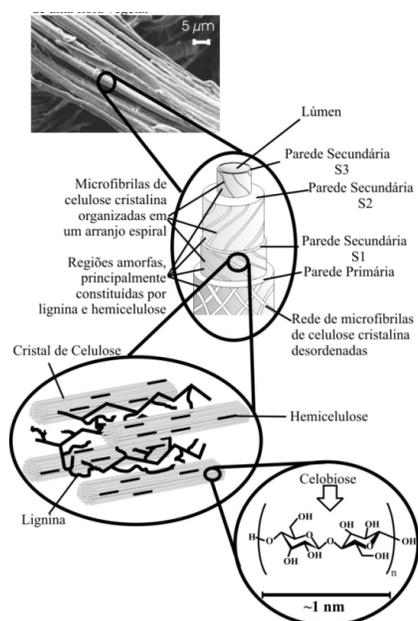


Figura 12 – Esquema de uma fibra lignocelulósica de *Eucalyptus sp.* Adaptado de RUBIRA *et al*, 2009.

As fibras de celulose podem ser naturais e nativas ou modificadas pelo homem, as chamadas celulosas regeneradas ou derivatizadas. Através das estruturas cristalinas se diferencia a celulose natural, da celulose regenerada como celulose I e II, respectivamente. Na celulose I as cadeias dentro da célula unitária estão paralelas umas as outras e em antiparalelo na celulose II.

A celulose pode ser desintegrada em partículas micrométricas ou nanométricas, pela separação dos elementos fibrilares, utilizando hidrólise ácida ou enzimática, seguida de exposição ultrassônica. Estes elementos fibrilares apresentam grande área superficial por unidade mássica. Isso possibilita sua aplicação em diversos campos, como a agricultura, a silvicultura, as indústrias químicas, farmacêuticas, têxteis, de embalagens, plásticos, tendo amplo potencial para aplicação industrial. As fibras exibem uma hierarquia de estruturas fibrilares, de natureza fractal, de diferentes diâmetros em escala nano, como listado na Tabela 4.

Tabela 4 – Dimensões da Nanocelulose.

Estrutura da celulose	Diâmetro (nm)	Comprimento (nm)	Razão de aspecto (L/d)
Microfibrila	2 – 10	>10.000	>1,000
Celulose microfibrilar	0 – 40	>1.000	100 – 150
Whisker	2 – 20	100 – 600	10 – 100
Celulose microcristalina	>1.000	>1.000	~1

Fonte : Samir et al. 2005; Tanem et al. 2006; Hubbe et al. 2008 *in* Siró e Plackett, 2010.

Segundo Siró e Plackett (2010), a limitada aplicação de nanofibras de celulose ainda hoje, resulta em parte, do fato de que a separação de fibras vegetais em dimensões nanométricas constitui-se num processo desafiador, devido à alta demanda de energia para separar as estruturas fibrilares em dimensões nano, embora haja uma crescente atividade na forma de publicações, conforme indica o gráfico da Figura 13.

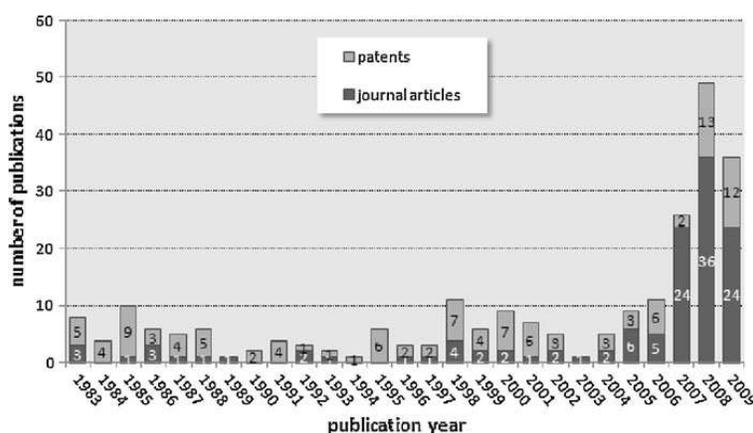


Figura 13 - Publicações com o termo 'cellulose' dos últimos anos. Fonte: (SIRÓ; PLACKETT, 2010).

3.5. ACETATO DE CELULOSE

Derivados da celulose encontram diversas aplicações. O acetato de celulose é utilizado na fabricação de fitas magnéticas para gravadores, em isolantes elétricos e filmes cinematográficos à prova de fogo. Foi pela primeira vez obtido por Paul Schutzenberger, em 1885, mas só em 1894 que Charles Cross e Edward Bevan criaram um método de preparação do derivado. Durante a primeira guerra mundial filmes e *lacquers* de acetato de celulose dissolvido em acetona serviram como reforço a prova de água para os tecidos que recobriam as asas dos aviões.

O acetato de celulose é um polímero termoplástico rígido com alguma flexibilidade devido às pontes de hidrogênio originadas pelos grupos hidroxila existentes na estrutura, fácil de dissolver pela maior acessibilidade do solvente as regiões da fibra e não exige o uso de solventes fortes. É produzido industrialmente a partir da reação da celulose, com anidrido acético e ácido acético (acetilação da celulose) na presença de ácido sulfúrico que atua como catalisador, onde ocorre a substituição dos grupos hidroxila da celulose pelo radical acetil do anidrido acético (Figura 14), o que leva a materiais com diferentes graus de substituição (GS) (CERQUEIRA D.A. et al., 2006).

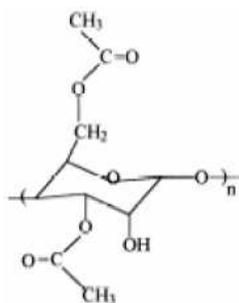


Figura 14- Monômero do di-acetato de celulose (CERQUEIRA et al., 2006).

O GS é o número médio de radicais acetil em cada unidade glicosídica da celulose, de modo que um material completamente substituído terá um GS de 3. As propriedades químicas e físicas de acetatos de celulose, como por exemplo, a sua solubilidade e grau de

cristalinidade, dependem do GS. A cristalinidade, por exemplo, aumenta com o GS da amostra, uma vez que quanto mais substituído é o acetato de celulose, maior a uniformidade e empacotamento das cadeias.

Cerqueira et al. (2006) estudou a cristalinidade do acetato de celulose utilizando Difração de Raio X de alto ângulo (WAXS) e Calorimetria Diferencial Exploratória (DSC). Sabendo que a cristalinidade dos polímeros é importante porque afeta as propriedades mecânicas e químicas dos materiais; para o cálculo da porcentagem de cristalinidade das nanofibras serão utilizados os resultados de DSC, através da relação entre o calor de fusão do material em estudo e o calor de fusão de um cristal perfeito de acetato de celulose, como mostrado na equação 3. O valor da entalpia de fusão (ΔH_f°) do cristal de acetato de celulose é de 58,8 J/g (CERQUEIRA et al., 2006).

$$\%C = \frac{\Delta H_f}{\Delta H_f^\circ} \times 100$$

Eq.3

3.6. USO TERAPÊUTICO DOS ÓLEOS NATURAIS

A fitoterapia, etimologicamente vem da palavra grega *Phyton* (plantas) e *Therapeia* (tratamento), ou seja, tratamento através das plantas.

A medicina popular, ou também chamada, medicina alternativa utiliza plantas e óleos essenciais para a terapia curativa e preventiva, e é extremamente difundida no Brasil, devido ao elevado custo dos medicamentos industrializados no país, a grande biodiversidade e miscigenação das culturas: indígenas, negra, cabocla, oriental e européia que difundem costumes e conhecimentos sobre o assunto (PIERI, 2009).

Mundialmente estima-se, que a porcentagem da população que utiliza tratamentos não convencionais, inclusive a fitoterapia, é de 10% na Dinamarca, 33% na Finlândia, 49% na Austrália e 48% nos Estados Unidos (NATALIA, 2003). Na América Latina, estes

valores não são exatos pela dificuldade de contabilizar o uso desses produtos utilizados indiscriminadamente, mas os valores tendem a ser ainda mais altos (ARNOUS, 2005).

O povo tradicional da região Amazônica tem o costume de usar a fitoterapia de maneira intensiva por duas razões primordiais, primeiro pelo fato dos conhecimentos tradicionais serem passados de geração a geração e segundo por ser uma das regiões do Brasil que mais sofre com a falta de assistência médica e hospitalar. Entretanto, grande parte deste uso é realizada de forma indiscriminada, por falta de estudos e provas clínico-científicas sobre os riscos de toxicidade e efeitos colaterais desses metabólitos no organismo.

Com a valorização da medicina popular e o incentivo ao uso de produtos renováveis e biodegradáveis, houve um aumento do interesse em pesquisas científicas sobre os agentes fitoterápicos objetivando a produção de fármacos e dispositivos médicos mais baratos e com efeitos semelhantes ou melhores que os convencionais. Mais de 25% dos medicamentos em uso são derivados naturais ou produtos semissintéticos de origem natural. (VALDERRAMAS, 2006).

Nesse trabalho há a união da fitoterapia utilizada desde tempos imemoráveis e da nanotecnologia, um dos ramos mais recentes e promissores da ciência; unidas na incorporação de óleos naturais com propriedades terapêuticas a nanofibras de acetato de celulose, um recurso renovável.

Considerando que o Brasil é reconhecido internacionalmente por possuir a maior reserva florestal diversificada do planeta e ciente do potencial da sua flora para o uso na medicina, foram criteriosamente selecionados dois óleos naturais com elevadas propriedades fitoterápicas, das espécies: *Copaifera langsdorffii* (VEIGA et al. 2002; PAIVA LA et al., 1998, 2004, LOTUFO et al., 2002, MACIEL et al., 2007, PIERI et al, 2009, SILVA et al., 2009) e *Cymbopogon nardus* (PERINI, 2008).

Os óleos essenciais são metabólitos secundários produzidos por espécies vegetais e constituídos por misturas complexas de componentes, onde predominam altas concentrações de isopreno ou também chamados terpenos: monoterpenos, diterpenos,

sesquiterpenos e os fenilpropenos. Esses compostos líquidos normalmente exalam odores, são solúveis em solventes orgânicos e tem solubilidade limitada em água. Atuam como mecanismos de defesa a predação de microorganismos (bactérias, fungos, vírus e protozoários), insetos e herbívoros (SIMÕES et al., 1999).

Ainda é incipiente o que existe de trabalhos científicos sobre esses óleos (MACIEL et al., 2002). A maior parte das publicações são ensaios empíricos baseados no dito popular (MALAFAIA *et al.*, 2006). Sobre óleos incorporados a nanofibras, há uma patente depositada em 2009 (Ref. WO2009/045042 A1) (KIM et al. 2009) que não cita os gêneros aqui propostos.

3.6.1. COPAÍBA (*Copaifera langsdorffii*)

O óleo de copaíba é utilizado para fins medicinais desde o século XVI e hoje muito empregado pelos povos da Amazônia topicamente ou por ingestão para o tratamento de enfermidades tais como feridas, queimaduras, inflamações, cistites, bronquites, diarreias crônicas, reumatismo e psoríase (ver Tabela 5). Existem 35 espécies do gênero *Copaifera* (*Leguminosae*) encontradas principalmente em áreas tropicais da América do Sul (especialmente no Brasil, Argentina, Bolívia, Guiana, Colômbia, Peru e Venezuela). Sendo que as principais espécies utilizadas para fins medicinais são: a *C. Langsdorffii*, encontrada principalmente nos cerrados do Brasil Central e a espécie utilizada nesse trabalho, a *C. Reticulata* da região amazônica, e *C. Officinalis* que ocorre amplamente na América do Sul, incluindo a Amazônia (VEIGA Jr. *et al.*, 1997).



Figura 15- Árvore da espécie *C. Langsdorffii*. Fonte: <http://oleos essenciais.org>.

Esse óleo teve seu primeiro registro na medicina europeia em 1625 e foi trazido de volta ao Brasil pelos jesuítas, conhecido como bálsamo jesuíta. Nos Estados Unidos, foi uma droga oficial na Farmacopéia EUA 1820-1910. O etnobotânico Mark Plotkin relata que óleo de copaíba tem sido usado nos Estados Unidos como produto antibacteriano, anti-inflamatório, desinfetante, diurético, laxativo e estimulante, além de ser usado em cosméticos e sabonetes (VEIGA, et al., 2002).

% Exportações por país

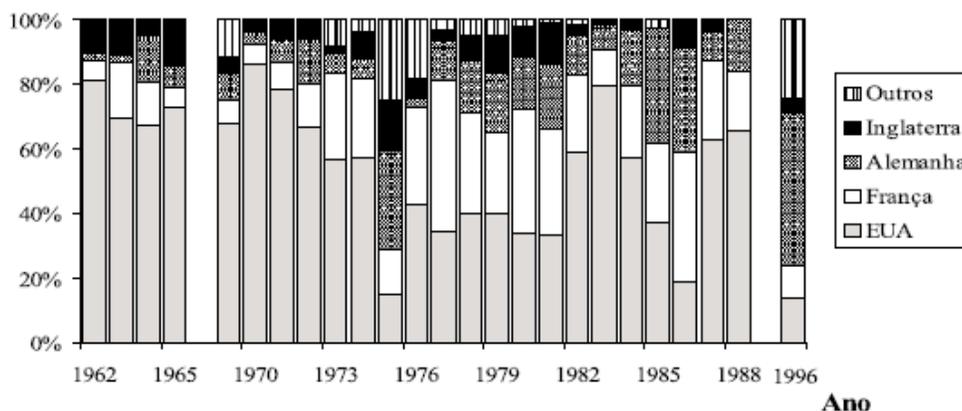


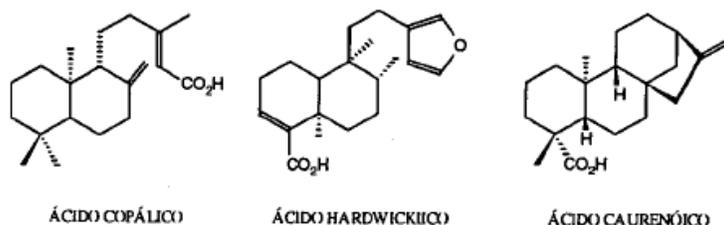
Figura 16- Participação dos principais países importadores de óleo de copaíba no volume total exportado pelo Brasil (VEIGA et al., 2002).

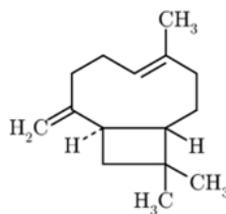
Pelo manejo extrativista e sustentável podem ser extraídos 40 litros de óleo-resina por ano de cada árvore de copaíba que chega a 30 m de altura. A extração é feita por incisões ou perfurações no tronco e a sua coloração amarelada a marrom depende do grau de oxidação que sofreu em contato com o ar. A figura 17 mostra a extração do óleo pela população local das florestas da Amazônia e a venda do produto nas feiras de Manaus/AM.



Figura 17- a) venda do produto nas feiras de Manaus/AM e b) a extração do óleo de copaíba pela população local das florestas da Amazônia. Fonte: próprio autor.

O analito extraído da *C. langsdorffii* é referido como um óleo-resina, pois é constituído por 45% de óleos essenciais voláteis e ácidos, e 55% de resina. As estruturas químicas predominantes desse óleo-resina são compostos diterpênicos (ácido copálico, ácido hardwickiico, ácido caurenóico, principalmente) (Figura 18), sesquiterpenos (cariofileno) e ácido polilático, responsáveis pelo efeito analgésico, antiinflamatório, antisséptico e cicatrizante, quando aplicados via oral ou tópica (VEIGA Jr. *et al.*, 1997). O cariofileno (Figura 18), um dos principais constituintes, tem sido documentado com fortes efeitos anti-inflamatórios.





CARIOFILENO

Figura 18- Principais compostos do óleo de copaíba, diterpenos (ácido copálico, ácido hardwickiico, ácido caurenóico) e sesquiterpeno, cariofileno. Adaptado de VEIGA et al., 1997; <http://oleosessenciais.org>.

Aos diterpenos é atribuída a maioria das propriedades terapêuticas, fato já comprovado cientificamente por Maciel *et al.*(2007). Como mostra a Tabela 5, a maior incidência de diterpenos é encontrada na espécie *C. langsdorffii* utilizada nesse trabalho:

Tabela 5- Número de diterpenos encontrados nos óleos de copaíba autênticos:

Óleos autênticos	Número de diterpenos detectados	Local de Coleta
<i>Copaifera multijuga</i> I	4	Reserva Ducke - Manaus-AM
<i>Copaifera multijuga</i> II	6	Reserva Ducke - Manaus-AM
<i>Copaifera sp.</i> BA I	5	Interior da Bahia
<i>Copaifera sp.</i> BA II	5	Interior da Bahia
<i>Copaifera sp.</i> MG	7	São Lourenço - MG
<i>Copaifera sp.</i> AM	3	Reserva Ducke - Manaus-AM
<i>Copaifera langsdorf</i> 1	9	Jardim Botânico do Rio de Janeiro - RJ
<i>Copaifera langsdorf</i> 2	7	Jardim Botânico do Rio de Janeiro - RJ

Fonte: VEIGA et al., 1997.

O óleo da espécie *C. Langsdorffii* foi estudado em 1985 por El Nunzio e citado na literatura como agente bactericida das espécies *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* (El NUNZIO, 1985). Tappin et al. (2004) fez um levantamento de dados da literatura, sobre a composição do óleo e o efeito farmacológico (Tabela 6). Interessam nesse trabalho os efeitos antiinflamatórios, analgésicos e cicatrizantes da copaíba.

Tabela 6- Relação entre atividades farmacológicas e constituintes químicos do óleo de copaíba.

Espécie	Certificação botânica	Atividade farmacológica	Modelo farmacológico (Dose)	Frações, substâncias caracterizadas/isoladas	Resultado / Referências
Vários espécimens	Não efetuada	Antiinflamatória	(i) edema de pata/carragenina (0,70-2,69 mL/kg) (ii) granulona (doses repetidas, 6 dias 1,26 mL/kg) (iii) permeabilidade vascular/histamina	β -cariofileno, β -cubebeno, β -bisaboleno, outros	(30-40% eficácia); DL ₅₀ 3,79 mL/kg (18)
8 amostras comerciais	-	Antiinflamatória	(i) edema de pata/carragenina (30 mg/kg) (ii) edema de pata/bradicinina (30 mg/kg)	β -bergamopteno, β -cariofileno, α -aromadendreno nas frações ativas	Inibições: 14-56% em (i) e 37-62% em (ii) (17)
-	-	Analgésica	(i) contorção abdominal por ácido acético (ii) difusão peritonial de azul de Evans	Ácido copálico	Menos potente que indometacina (19)
<i>Copaifera cearencis</i>	Não citada	Antiinflamatória, analgésica	(i) edema de pata/carragenina (500 mg/kg) (ii) contorção abdominal por ácido acético (iii) difusão peritonial de azul de Evans	Não citado (ácido copálico?)	Menos potente que indometacina; dose-dependência observada (16)
<i>Copaifera langsdorffii</i>	Não citada	Antiinflamatória	Edema de orelha/óleo de cróton: modelos oral e tópico	Óleo bruto (OB) e fração volátil (FV)	OB eficaz em aplicação oral; FV eficaz em tópica (20)
<i>Copaifera langsdorffii</i>	Não citada	Antinociceptiva	(i) contorção abdominal por ácido acético (ii) teste da placa quente (200 e 400 mg/kg)	Óleo bruto (OB) e fração volátil (FV)	Inibições (27% e 53%) significantes em (i) (21)
<i>Copaifera langsdorffii</i>	Exsicata 24461, Herb. Prisco Bezerra, UFCE	Efeito gastroprotetor	Lesões gástricas induzidas por etanol, indometacina e estresse hipotérmico (400 mg/kg)	Não há	Eficácia no aumento do suco gástrico (22)
<i>Copaifera langsdorffii</i>	Exsicata 24461, Herb. Prisco Bezerra, UFCE	Cicatrizante	(i) aceleração de cicatrização em feridas abertas (ii) aceleração de cicatrização em incisões	70% diterpenos, sesquiterpenos, ácidos caurenóico e poliáltico	Aceleração até o 9º dia em (i) e até o 5º dia em (ii) (23)

Fonte: Tappin et al., 2004.

As propriedades cicatrizantes de feridas e úlceras do óleo de copaíba foram estudadas em óleos comerciais por Brito et al.(1998) e nos óleos de *Copaifera langsdorffii*, por Paiva et al. (1998).

3.6.2. CITRONELA (*Cymbopogon nardus*)

O capim citronela é originário do Ceilão e sul da Índia; muito utilizado na Indonésia como chá calmante e digestivo. O gênero *Cymbopogon* pertence à família *Poaceae*, subfamília *Panicoideae* e é constituído de oitenta e cinco espécies (CASTRO et al., 2007).

O capim citronela tem sido utilizado na fabricação de perfumes e cosméticos, além do uso como repelente de mosquitos (MARTINS et al. 1998). Apresenta comprovada atividade antifúngica e bactericida. Possui alto teor de geraniol e citronelal. O citronelal é utilizado como material básico para a síntese de importantes compostos químicos denominados iononas e para a síntese de vitamina A (PERINI, 2008).

Os compostos monoterpênicos (limoneno, citronelal, geraniol e neural) atuam na defesa química da planta contra a ação de predadores. O geraniol também possui atividade antisséptica, inibindo o crescimento de fungos e bactérias (PERINI, 2008).

Em estudos realizados por Castro et al. (2007) foram identificados quinze compostos no óleo essencial de citronela, divididos entre monoterpênicos e sesquiterpenos. Os compostos monoterpênicos majoritários do óleo essencial foram o citronelal (36,67%) e o geraniol (25,05%). Entre os compostos sesquiterpenos, o elemol foi o composto encontrado em maior concentração (ver Figura 19).

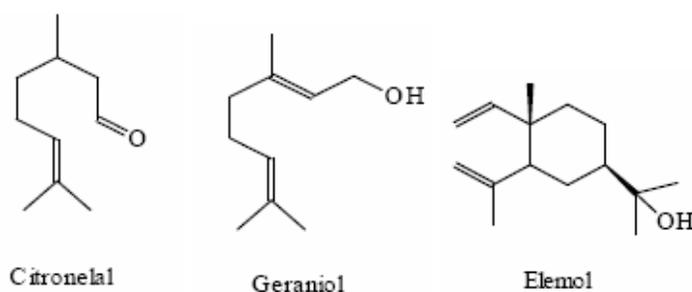


Figura 19 - Fórmulas estruturais dos três principais constituintes terpênicos do óleo de citronela.
(adaptado de PERINI, 2008).

3.7. ENGENHARIA DE TECIDOS (SCAFFOLDS E CURATIVOS)

O organismo além de células é constituído de espaços extracelulares, que são preenchidos por uma extensa rede de macromoléculas (SHI, 2006), dentre polissacarídeos e

proteínas (ex.: colágeno), que dão suporte físico as células e tecidos. Shi (2006) chama essas estruturas extracelulares de materiais *bio inspirados*.

Os colágenos tipo I e tipo III, como dois dos principais constituintes da matriz extracelular, promovem resistência mecânica, transmitem e dissipam cargas, mantêm a estrutura do tecido e compartimentam as células e tecidos em unidades funcionais (SILVER, 1987; MATTHEWS et al., 2002).

Os materiais nanoestruturados têm propriedades específicas e desempenham funções relacionadas ao seu tamanho. Dentre as várias aplicações que estão sendo dadas as nanofibras, uma delas é o desenvolvimento de tecidos tridimensionais (3D), como curativos e “*scaffolds*” que procuram mimetizar a arquitetura da matriz extracelular dos tecidos humanos (VENUGOPAL et al, 2005, 2007).

Como afirma Zeltinger et al. (2001) a alta razão superfície/volume, combinada a estrutura porosa das nanofibras fornece espaço suficiente à acomodação, proliferação, migração e diferenciação celular, além de aumentar a eficiência no transporte de nutrientes e excreção de metabólitos entre a matriz da fibra e o ambiente externo. Huang et al. (2007) fala em uma faixa de diâmetro para *scaffolds* de 100-300nm e Kumbar et al. (2008), especificando o tipo celular, propõe uma faixa de 350-1100nm para a maior proliferação de fibroblastos em fibras. Essas características morfológicas são semelhantes à matriz extracelular dos tecidos naturais, que apresentam larga faixa de distribuição de poros, alta porosidade, propriedades mecânicas efetivas e propriedades bioquímicas específicas.

Os curativos para feridas normalmente são materiais hemostáticos indolores ao paciente e fáceis de serem removidos, protegem o local, fornecem e mantêm o ambiente úmido, absorvem o excesso de exsudados da cicatrização e servem como barreira bacteriana e fúngica, além de promoverem uma melhor aparência do local. (ZHANG et al., 2005).

Os curativos produzidos por eletrofiação nesse trabalho, graças a estrutura nanométrica e a adição de agentes terapêuticos, como os óleos naturais, cumprirão todos os requisitos para um curativo citados acima e possivelmente melhorarão as propriedades de

barreira antimicrobiana pelas qualidades dos óleos, além da alta porosidade das nanofibras beneficiar a permeação de gases e a oxigenação necessária a cicatrização (VENUGOPAL, 2007).

Quando se fala em matrizes que substituirão a pele, como *scaffolds*, outras propriedades devem ser atendidas. Um implante, como um *scaffold* precisa cumprir funções mecânicas e biofuncionais no corpo para depois ser absorvido e excretado sem deixar traços, isso é, deve ser biodegradável (VERT et al., 1992) e bioreabsorvível (BARBANTI et al., 2005). Para isso a interação entre o biomaterial e as células deve ser intensamente estudada. Os implantes permanentes, como metais causam irritação, inflamações e reações locais, como trombogenicidade e disfunções endoteliais quando em aplicações cardiovasculares, inabilidade de crescimento celular, acúmulo de metal no organismo, corrosão do material e a necessidade de repetição cirúrgica. Dentre os polímeros mais utilizados para a produção de *scaffolds*, estão (ver Tabela7):

Tabela 7 - Polímeros eletrofiáveis e o diâmetro das fibras formadas:

Fibras do Polímero	Diâmetro (nm)
Policaprolactona	200-300
Poliuretano	100-500
Poli(L-ácido lático)	200-250
poli(L-ácido lático) co policaprolactona	400-1000
poli(ácido lático-co-glicólico)	200-300
Poli(óxido de etileno)	100-1500
Poli(tereftalato de etileno)	200-600
Poli(vinil álcool)	200-300
Polimetilmetacrilato	200-300
Policarbonato	200-250
Poliestireno	60-1000
Colágeno	150-300
Gelatina	250-500
Fibrinogênio	120-600
Quitosana	300-650
Fibroina de seda	30-120

Fonte: Adaptada de VENUGOPAL J. et al, 2007.

O acetato de celulose por não ser absorvido e assimilado pelo corpo é mais indicado à aplicação como curativo e não como *scaffold*. Critérios como as propriedades mecânicas, diâmetro das fibras, tempo de degradação no organismo e as exigências citadas na Tabela 8 devem ser avaliadas para a escolha adequada do polímero (WILLERTH et al., 2008):

Tabela 8 - Critérios a serem respeitados para potenciais polímeros candidatos a aplicações *in vivo* por tempo limitado:

Biocompatibilidade	Biofuncionalidade
Não-tóxico	Propriedades: mecânica, química, física, térmica e biológica, adequadas.
Não-imunogênico	Fácil de manejar
Não-carcinogênico	Esterilizável
Não-trombogênico	<i>By-products</i> degradáveis
	Estocável
	Aprovado pelas agências reguladoras (ASTM, CEN, IUPAC, ISO).

Fonte: Adaptada de VERT M., 2008.

Os polímeros sintéticos apresentam algumas vantagens frente aos polímeros naturais, como baixo coeficiente de fricção, alta reprodutibilidade decorrentes da composição química definida, possibilidade de mudança na composição e nas suas propriedades físico-químicas, fácil processabilidade e habilidade para a imobilização de células e biomoléculas na superfície ou na sua massa (WILLERTH et al., 2008). Alguns membros da família dos poliésteres alifáticos (poli(α -hidroxi éster)) (RATNER, 2004), como o Poli(ácido-glicólico) PGA, o Poli(ácido-láctico) PLA (BARBANTI et al., 2005), o co-polímero, poli(ácido láctico-co-glicólico) PLGA e a policaprolactona (PCL) são fortes candidatos a aplicações biomédicas.

Dentre as desvantagens dos polímeros sintéticos está a eliminação de monômeros ou agentes catalisadores que podem ser tóxicos ao organismo quando degradados, além disso, em alguns casos são difíceis de serem esterilizados e a facilidade de absorção de água e moléculas circundantes no meio pode atrapalhar a cicatrização do tecido (SHI et al., 2006).

Já os polímeros naturais, dentre proteínas e polissacarídeos, como colágeno, fibrina, fibrinogênio, seda, quitina, quitosana, elastina, ácido hialurônico, sulfato de condroitina, gelatina, agarose, celulose e alginato, possuem vantagens, pois tendem a ser biocompatíveis e dada a origem natural normalmente possuem *sites* para adesão celular (WILLERTH S.M. et al., 2008). A desvantagem do ponto de vista de resistência mecânica é praticamente anulada quando esses polímeros são utilizados em escala nanométrica (STIX G., 2000; WEST J.L. et al. 2000).

Como se vê há muitos compostos poliméricos utilizados atualmente como biomateriais na farmacologia e na cirurgia, como dispositivos para liberação controlada de drogas, transfecção gênica, próteses, membranas e fibras para regeneração de tecidos. O problema é que faltam mais estudos aprofundados e multidisciplinares sobre ação desses materiais sobre cada caso clínico específico, já que são inúmeros materiais e polímeros disponíveis no mercado que visam a uma aplicação de extrema nobriedade na medicina. O gráfico abaixo (Figura 20) trás o crescimento do número de publicações relacionadas aos termos “polymers ou drugs ou scaffolds” e “degradable, biodegradable, bioreabsorbable, absorbable ou erodible” nos últimos anos:

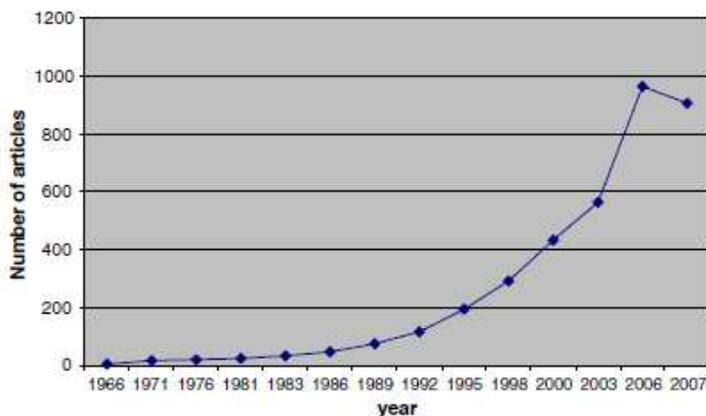


Figura 20 - Gráfico do número de publicações por ano onde se combinou os termos “polymers ou drugs ou scaffolds” e “degradable ou biodegradable ou bioreabsorbable ou absorbable ou erodible” (VERT, 2008).

Como confirma Vert (2008) muitas vezes a literatura não informa como e quais testes biológicos foram realizados; faltam dados para a validação de novos dispositivos na área da saúde. É imprescindível uma batelada de ensaios *in vitro* para daí passar aos ensaios *in vivo*, que normalmente são mais custosos que os ensaios *in vitro* e então dar prosseguimento aos testes clínicos do material em desenvolvimento. Além do necessário diálogo entre as disciplinas de biologia, química, física, engenharias e medicina.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. EQUIPAMENTO DE ELETROFIAÇÃO

O equipamento utilizado (Figura 21) foi montado pelos alunos envolvidos no projeto, com o auxílio financeiro da FAEPEX/FUNCAMP. Consiste em uma bomba de vazão controlada de deslocamento positivo, uma caixa de acrílico para ajudar no isolamento elétrico dos eletrodos e manter relativa esterilidade do material produzido, um anteparo de alumínio nas dimensões de 13cm x 7cm recoberto com papel alumínio para a deposição das amostras, e uma fonte de alta tensão com voltagem controlada de 0-30KV. A figura 21 ilustra o equipamento utilizado:

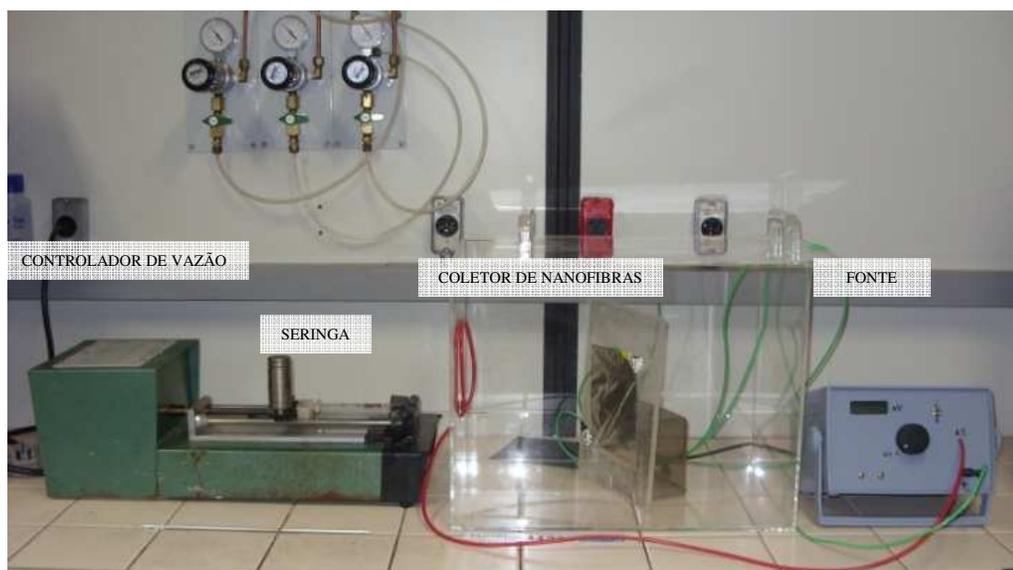


Figura 21 - Equipamento de eletrofiação do laboratório SINPOL/UNICAMP.

As condições de operação do equipamento foram estudadas e controladas, a fim de se obter alto rendimento e qualidade na produção das estruturas. As propriedades da solução polimérica tem influência significativa no processo de eletrofiação quanto a morfologia da fibra resultante. A tensão superficial, a viscosidade, a condutividade e as propriedades dielétricas da solução interferem na formação de grânulos ‘beads’ ao longo da superfície da fibra, além de determinarem a extensão do jato que se forma a partir da ponta da agulha e que tem efeito sobre o diâmetro dos filamentos (RAMAKRISHNA, 2005).

Determinadas propriedades dos solventes do polímero também foram estudadas (poder de dissolução, agressividade química, condutividade elétrica, volatilidade) (RUBIRA, 2009).

Selecionaram-se ainda três fatores externos que também influenciam na morfologia da fibra, incluindo: a tensão aplicada em kV, a vazão da seringa em ml/s e a distância da ponta da agulha ao coletor de fibras.

4.2. MATÉRIAS-PRIMAS

4.2.1. Celulose

O acetato de celulose utilizado, da Sigma-Aldrich possui 39,8% de grupos acetil, com grau de substituição dos grupos hidroxilas de aproximadamente 2.3 e $M_N=30.000$.

4.2.3. Óleos Naturais

Considerando que o Brasil é reconhecido internacionalmente por possuir a maior reserva florestal diversificada do planeta e ciente do potencial da sua flora para o uso na medicina, foram criteriosamente selecionados dois óleos naturais com elevadas propriedades fitoterápicas, das espécies: *Copaifera langsdorffii* (VEIGA et al. 2002; PAIVA LA et al., 1998, 2004, LOTUFO et al., 2002, MACIEL et al., 2007, PIERI et al, 2009, SILVA et al., 2009) e *Cymbopogon nardus* (PERINI, 2008).

Os óleos naturais com 100% de pureza das espécies *Copaifera langsdorffii* (copaíba) e *Cymbopogon nardus* (citronela) foram comprados da farmácia de manipulação de fitoterápicos Aromagia/Campinas/SP, da WNF: World's Natural Fragrances-phytotechnologies.

4.3. PRODUÇÃO DAS NANOFIBRAS

Segundo Ohkawa et al. (2009) a celulose pura pode formar estruturas altamente orientadas em solução. A destruição destas regiões cristalinas através da dissolução e da redução das interações intermoleculares no estado dissolvido são condições essenciais para o sucesso da eletrofiação. Empiricamente, os requisitos comuns do solvente para o sucesso da eletrofiação são a semicondutividade e uma capacidade de carga moderada, alta

volatilidade para estimular a rápida solidificação das fibras poliméricas e a habilidade de dissolver os polissacarídeos com baixa interação intermolecular.

Reagentes e solventes

Os reagentes e solventes utilizados estão relacionados na Tabela 9.

Tabela 9 - Lista de reagentes e solventes utilizados.

Reagente/Solvente	Marca
Acetona P. A.	Ecibra

4.3.1. Nanofibras de acetato de celulose

A técnica consistiu em produzir nanofibras com diferentes concentrações de acetato de celulose: 5%, 7,5%, 10%, 12,5%, 15% e 17,5% (m/m) dissolvido em um sistema de solventes acetona/água destilada na proporção de 4:1. Foi utilizada uma seringa de vidro de 5 ml (o vidro é resistente à degradação térmica e aos solventes utilizados no processo). A seringa foi acoplada a bomba a uma vazão a uma vazão de aproximadamente 0,0136 mL/min, com tensão aplicada de 10 kV e distância de 8 cm da ponta da agulha ao coletor. As fibras foram processadas por 1 hora.

4.3.2. Nanofibras de acetato de celulose com óleos naturais

O acetato de celulose a 10%(m/m) foi dissolvido em acetona/água (4:1), com adição dos óleos das espécies *Copaifera sp.* e *Cymbopogon sp.*, nas concentrações de 1%, 2%, 5%, 10% e 15%(m/m). A tensão aplicada variou entre 10 e 14 kV, a distância da ponta da agulha ao coletor foi de 8cm e a vazão entre 0,034 a 0,0068 ml/min visando obter as melhores condições para a eletrofição. As fibras foram eletrofiadas por 1 hora.

4.4. CARACTERIZAÇÃO DO MATERIAL

4.4.1. Microscopia Óptica (MO)

A microscopia óptica, pela facilidade de acesso e baixo custo de operação, é utilizada tanto para as caracterizações preliminares, quanto para a confirmação da formação

de não-tecidos e verificação do diâmetro das fibras. Para os testes de viabilidade celular (citocompatibilidade) o microscópio Leica-Q500IW com câmera digital acoplada a um computador e ampliação de imagem de 50x, 100x, 200x e 500x, disponível no Laboratório de Uso Comum da Faculdade de Engenharia Química (LRAC) serviu como dispositivo de verificação de adesão celular e contaminação por microorganismos das amostras.

4.4.2. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

O princípio de funcionamento baseia-se em uma fonte de elétrons direcionados a uma superfície em um ambiente a vácuo. O feixe passa através de um colimador eletromagnético que direciona os elétrons acelerados. Estes são coletados por um detector que transforma esses sinais em uma imagem.

Conforme os elétrons atingem a interface, ocorrem algumas interações que resultam na emissão de elétrons e/ou fótons a partir da superfície. Os princípios da formação de imagens do MEV podem ser classificados em três tipos: imagens de elétrons secundários, imagens de elétrons refletidos e mapas de raio-x elementar. Esses fenômenos levam em consideração os choques elásticos e inelásticos dos elétrons espalhados que atingem a superfície da amostra em uma complexa rede de interações (BRUNDLE et al., 1992).

A técnica de microscopia eletrônica foi empregada em equipamento LEO 44i disponível no Laboratório de Uso Comum da Faculdade de Engenharia Química (LRAC), utilizou-se tensão de aceleração igual a 15 kV e corrente do feixe igual a 100 pA. Com o MEV se analisou a homogeneidade de diâmetro dos filamentos, a topografia, conformação e orientação da malha numa faixa de ampliação que varia de 10x a 10.000x. Após os testes de citocompatibilidade com culturas de células, as amostras são fixadas, desidratadas, metalizadas e levadas ao microscópio eletrônico de varredura.

Para o recobrimento metálico, foi utilizado equipamento, Sputter Coater POLARON, Modelo: SC7620, Marca: VG Microtech (Uckfield, Inglaterra), O cálculo para estimativa da espessura da camada de Au: $\text{Espessura} = K.i.V.t$, onde $K=0,17 \text{ A}^\circ/\text{mA.Volt.s}$; $i=3 \text{ mA}$; $V=1 \text{ Volt}$ e $t=180\text{s}$. Portanto: $\text{Espessura}=92 \text{ A}^\circ$.

4.4.3. Análise termogravimétrica (TGA)

A decomposição térmica de polímeros é normalmente verificada pelo ensaio de termogravimetria. As curvas de TGA revelam as perdas de massa em relação ao aumento de temperatura a uma temperatura e taxa controlada. A primeira derivada desta curva (DTA) mostra a taxa da perda de massa. O pico desta última curva (DTA_{max}) pode ser considerado como a temperatura de decomposição térmica e utilizado para comparar a estabilidade térmica de diferentes materiais (TEJADO et al., 2006).

Além disso, é possível verificar a quantidade de outros materiais como umidade livre e outros voláteis presentes na amostra. Para a execução do ensaio são pesados aproximadamente 3,0 mg da nanofibra e colocados no porta amostra de alumínio do equipamento. A faixa de temperatura foi de 25 a 500°C com uma rampa de 5°C/min sob atmosfera inerte de nitrogênio. O aparelho utilizado é da marca TA Instruments modelo SDT2960.

4.4.4. Calorimetria Diferencial Exploratória (DSC)

A técnica consiste na medição de diferenças de fluxo de calor em uma amostra e em um material de referência ou uma cápsula vazia, enquanto ambos são submetidos a um aquecimento ou resfriamento controlado. A energia direcionada aos aquecedores é constantemente ajustada, de forma que ambos estejam à mesma temperatura. Com isso, a área do pico representa a energia elétrica necessária para manter a temperatura constante.

Entre as principais aplicações estão a determinação das temperaturas de transição vítrea (T_g), fusão cristalina (T_m), cristalização (T_c), grau de cristalinidade, e a cinética reacional como a degradação termomecânica, reações químicas, cura, etc. (CANEVAROLO JR., 2006).

São pesadas aproximadamente 5,0 mg de nanofibra e colocadas em porta amostras de alumínio, os quais são hermeticamente fechados para evitar perdas de massa para o ambiente externo. A amostra é colocada no equipamento modelo 2920 da TA Instruments e

aquecida a partir de 25°C a 250°C com uma rampa de 10°C/min em atmosfera inerte de nitrogênio.

4.4.5. Condutividade das Nanofibras

As condutividades das soluções de acetato de celulose puro e com 1, 2 e 5% de óleo da espécie *Copaifera langsdorffii* foram medidas pelo aluno João Vinícios Silveira na *North Carolina State University, Forest Biomaterials Department*, através de um condutivímetro (Corning conductivity meter 441) a temperatura ambiente.

4.4.6. Cromatografia Gasosa (CG)

A identificação da presença dos óleos naturais e de alguns de seus componentes nas nanofibras foi realizada por cromatografia gasosa, em equipamento Shimadzu, modelo CG 17A. A coluna cromatográfica utilizada foi do tipo capilar de sílica fundida com fase estacionária DB-5, de 0,30 x 10³m de comprimento e 0,25 x 10⁻³ m de diâmetro interno, utilizando hélio como gás carreador. As temperaturas foram de 220 °C, no injetor, e 300 °C, no detector. A temperatura do forno foi programada de 60 °C a 240 °C, com acréscimo de 3 °C a cada 60 s. A temperatura inicial foi de 60 °C por 60 s, seguido de um incremento de 3 °C por 60 s até atingir 240 °C, sendo mantida constante por 1800 s. Foi utilizado o álcool etílico como solvente para a extração dos óleos nas nanofibras por 48 horas e para a dissolução dos óleos puros (0,1%(m/m) de óleo).

4.5. TESTES DE VIABILIDADE CELULAR DAS NANOFIBRAS

O Laboratório de Cultura de Células da Anatomia do Instituto de Biologia da UNICAMP gentilmente forneceu todos os materiais esterilizados para a realização dos testes de viabilidade celular, dentre também os equipamentos, como: estufa seca com fluxo de CO₂ mantida a 37°C para a armazenagem das amostras, Capela de Fluxo Laminar, autoclave para a esterilização dos materiais utilizados, Microscópio Óptico acoplado a uma câmera para registro de imagens e resultados e centrífuga Quimisa para a sedimentação dos fibroblastos (Figura 22).

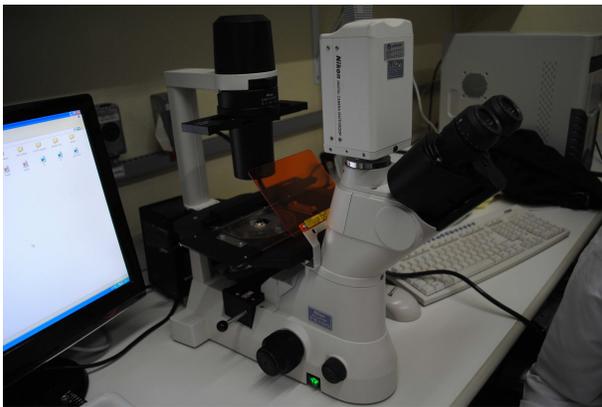
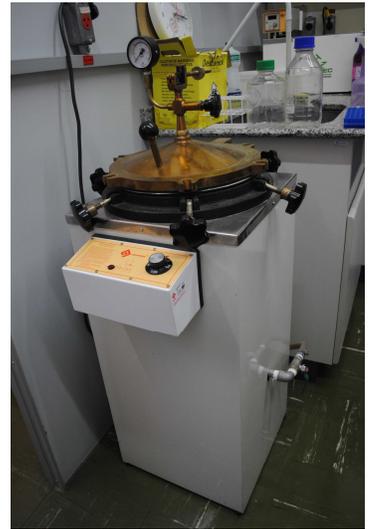


Figura 22 - Materiais e equipamentos do Laboratório de Anatomia do Instituto de Biologia utilizados nos testes de viabilidade celular das nanofibras a) Materiais; b) Estufa; c) Capela de Fluxo Laminar; d) Autoclave; e) Microscópio Óptico; f) Centrífuga. Fonte: do próprio autor.

Uma linhagem celular contínua (imortalizada) de células VERO cedidas pelo banco de células do Laboratório de Anatomia do Instituto de Biologia da UNICAMP foi a mais indicada aos primeiros testes de viabilidade celular, pois apresenta maior resistência a alterações brandas de pH e temperatura, velocidade de crescimento celular e facilidade de manutenção, em relação a uma linhagem celular primária explantada de tecidos de camundongos *in vivo*, por exemplo.

As células Vero-E6 são células fibroblásticas, provenientes do rim do macaco verde africano *Cercopithecus aethiops* (CURI, 2008).

O cultivo foi feito em frasco (garrafa) descartável de poliestireno estéril (50ml) em meio em meio F-12 (HAM), da Sigma-Aldrich, na proporção de 1:1. As células crescem em monocamadas; uma vez alcançada a confluência celular, quando as células se espriam e entram em contato entre si, ocupando toda a superfície disponível do frasco, é feito o repique, retirando uma alíquota celular que é lançada na superfície das nanofibras e deixadas por 24 horas em estufa com trocas gasosas a 37°C (temperatura requerida pelo organismo). Após esse intervalo as amostras são analisadas em Microscópio Óptico, com aumento de 10x para saber se aderiram as nanofibras ou se sofreram algum tipo de contaminação e morreram (PERES, 2009).

As células viáveis são analisadas por Microscopia Eletrônica de Varredura, após processo de fixação, desidratação por equipamento de ponto crítico, *sputtering* para a metalização e posterior análise microscópica (MEV).

4.5.1. Cultura de Células Vero (fibroblastos)

Foram incubadas células VERO de linhagem imortalizada do Banco de Células do Laboratório de Anatomia do Instituto de Biologia da UNICAMP. As células foram depositadas em frasco de cultura de tecidos de 72 cm². O meio de cultura utilizado foi o

Ham F12, contendo 10% de soro fetal bovino e 1% de penicilina (Sigma-Aldrich). O meio foi trocado a cada 2 dias e as culturas cresceram em estufa a 37°C com 5% de CO₂.

4.5.1.1. 1º Ensaio de Viabilidade Celular

Foram selecionadas seis amostras de nanofibras com diferentes composições (ver Tabela 9): uma amostra com 10% (m/m) de acetato de celulose puro, três amostras com 10% (m/m) de acetato de celulose e adição de 10% de óleo de copaíba, uma amostra com 10%(m/m) de acetato de celulose e adição 8% de óleo de citronela e uma amostra com 10%(m/m) de acetato de celulose, 1%(m/m) de alfa-celulose e 3% (m/m) de Dimetilsulfóxido (DMSO). As amostras foram esterilizadas por 40min. em luz ultravioleta (UV) dentro da capela de fluxo laminar, cortadas com lâmina nas mesmas dimensões da placa de 6 poços com diâmetro de 3cm (Figura 23, etapa 1) e as extremidades das nanofibras foram coladas na superfície dos poços com super bonder (Figura 23, etapa 2). Para a esterilização da cola foram feitos três banhos de 12 horas com 5ml de DMPBS-Flush, sem magnésio e cálcio fornecido pela Nutricell e 20µL de Penicilina (Figura 23, etapa 3). Após a última lavagem, a solução de banho foi descartada, 5x10⁵ células/ml foram lançadas por poço na superfície das nanofibras, adicionados 2,5ml de meio DMEM e 2,5ml de meio Ham-F12, com pH 7,3. A placa foi colocada em estufa a 37°C e o meio foi trocado a cada 24 horas. Análises de adesão celular e contaminação foram feitas por microscopia óptica (Figura 23, etapa 4).

Tabela 9 – Amostras de nanofibras para o teste de citocompatibilidade.

NANOFIBRAS	[ACETATO CELULOSE]	[COPAÍBA]	[CITRONELA]
POÇO 1	10% (m/m)	10%	-
POÇO 2*	10% (m/m)	-	-
POÇO 3	10% (m/m)	10%	-
POÇO 4	10% (m/m)	-	-
POÇO 5	10% (m/m)	10%	-
POÇO 6	10% (m/m)	-	8%
POÇO 7	CONTROLE	CONTROLE	CONTROLE

*Amostra 2 teve adição de 3% de Dimetilsulfóxido (DMSO) como solvente.



Etapa 1: Corte das amostras de nanofibras nas dimensões da placa de 6 poços.



Etapa 2: Colagem das extremidades de cada uma das amostras no fundo dos poços.



Etapa 3: Três lavagens com 5ml de DMPBS-Flush+Penicilina (intervalos 12h).

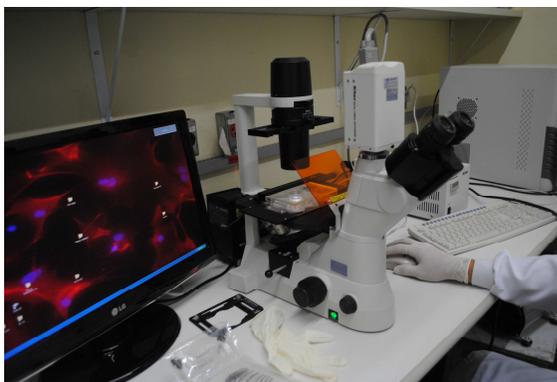


Figura 23: Etapa 4: Análise de adesão celular e contaminação por MO .

4.5.1.2. 2º Ensaio de Viabilidade Celular

Quatro amostras (ver Tabela 10) de nanofibras foram cortadas na dimensão de 1×1 cm² e fixadas no fundo dos poços de placa de 24 *-well*. Sobre as nanofibras suportes cilíndricos acrílicos foram apoiados para que não boiassem após a adição do meio (ver Figura 24). Para cada amostra foram preparados dois poços e os poços vazios foram usados como controle somente de células a uma densidade de 1×10^5 células/amostra. As amostras foram incubadas a 37°C com 5% de CO₂ por 36 horas com meio de cultura HAM F-12 trocado a cada 12 horas.

Tabela 10 – Amostras de nanofibras para o teste de viabilidade celular.

NANOFIBRAS	[COPAÍBA]	[CITRONELA]
POÇO 1	15%	-
POÇO 2	10%	-
POÇO 3	AC puro	AC puro
POÇO 4	-	5%
POÇO 7	CONTROLE	CONTROLE



Figura 24: Segundo ensaio de adesão celular, utilizando suportes cilíndricos acrílicos para fixar as nanofibras no fundo dos poços (Laboratório de Anatomia/IB/UNICAMP)

4.6. Preparo das Amostras para MEV

O procedimento usual segue a ordem: fixação, desidratação e secagem pelo método do "ponto crítico".

Devido à condição natural hidratada das amostras biológicas elas apresentam relativa complexidade de processamento; somente objetos rígidos como sementes, espículas, etc. podem ser observados no MEV com tratamento preliminar mínimo. Na sua grande maioria, o preparo das amostras inclui diversas etapas (GLAUERT, 1984).

Após três dias de cultivo as células foram fixadas com Karnovsky (2,5% de glutaraldeído e 1,5% de paraformaldeído) por 2 horas, lavadas em solução tampão fosfato 0,1M, pH 7,2-7,4, por 20 min e pós fixadas com 2% de Tetróxido de ósmio tamponado (OsO₄) por 1 hora dentro de capela bem ventilada e tomados os devidos cuidados por ser um composto extremamente tóxico e volátil. As amostras foram novamente lavadas com solução tampão e transferidas para cestas permeáveis do aparelho de ponto crítico.

A desidratação foi feita em banhos de etanol: 20, 50, 70, 90 e 100% de concentração com duração de 20 min./banho e de 2 horas o último banho em aparelho de ponto crítico com secagem.

O *sputtering* ou metalização das amostras com uma fina camada de ouro é a última etapa.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados dos métodos anteriormente citados serão apresentados neste capítulo. Baseados nos objetivos deste trabalho, os ensaios mostram o comportamento do material, a estrutura, morfologia e viabilidade celular das nanofibras.

Vale dizer que no decorrer da pesquisa e com os resultados que foram sendo obtidos, o grupo notou dois pares de parâmetros no processo de eletrospinação claramente interdependentes. O primeiro é a vazão aplicada à seringa e a concentração de polímero na solução, relacionados à viscosidade do fluido e ao diâmetro das fibras formadas. O segundo, a voltagem aplicada e a distância da ponta da agulha ao anteparo, que influenciam no tempo de evaporação do solvente e na velocidade do jato até alcançar o coletor, dada em kV/cm. O tempo e a velocidade do jato são importantes para que o solvente todo se evapore antes de chegar ao coletor. Uma voltagem muito alta ou uma distância pequena podem fazer com que a gota formada na ponta da agulha se solidifique e o jato não se forme.

5.1. NANOFIBRAS DE ACETATO DE CELULOSE

O sistema de solventes acetona/água na proporção 4:1 mostrou ser eficiente para a dissolução do acetato de celulose, permitindo a dissolução de até 17,5%(m/m) do polímero. A Figura 26 retrata o aspecto de uma nanofibra de acetato de celulose a 10%(m/m) produzida no laboratório:



Figura 26: Aspecto da nanofibra de acetato de celulose (10% m/m) produzida no laboratório. Fonte: próprio autor.

Os resultados de microscopia eletrônica de varredura (Figura 27) mostram as diferenças nas estruturas fibrilares formadas com as concentrações de: 5; 7,5; 10; 12,5; 15 e 17,5% (m/m) de acetato de celulose.

Em função da baixa viscosidade das soluções nas concentrações de 5 e 7,5% (m/m) de acetato de celulose, a obtenção de fibras ficou mais difícil. Os materiais produzidos com 5 e 7,5% (m/m) apresentaram grande quantidade de grânulos (*beads*), sendo que as concentrações de 10 e 12,5% (m/m) de AC foram as mais indicadas ao processo. Na concentração de 10% (m/m) os menores diâmetros foram alcançados e 12,5% (m/m) houve a menor incidência de *beads* (ver Figura 27). Aparentemente a viscosidade mais baixa favorece a saída mais rápida de solução da ponta da agulha, o que provoca instabilidade no jato e gotejamento da solução.

Como discutido no *item 3.: Viscosidade da solução*, em baixas viscosidades (5 e 7,5% m/m de AC) há excesso de solvente e o entrelaçamento entre as cadeias não é suficiente para que o jato se alongue uniformemente, resultando na aglomeração de partículas de solvente que se desprendem do jato e se depositam no anteparo na forma de contas '*beads*' (GUPTA *et al.*, 2005; SHENOY *et al.*, 2005). Com o aumento da viscosidade, o diâmetro das fibras aumenta (FONG H. *et al.*, 1999), mas também pode dificultar o escoamento da solução através da seringa (KAMEOKA *et al.*, 2003). Além disso, quando a viscosidade é muito alta, a solução pode secar na ponta da agulha antes de formar o jato (ZHONG X.H. *et al.*, 2002).

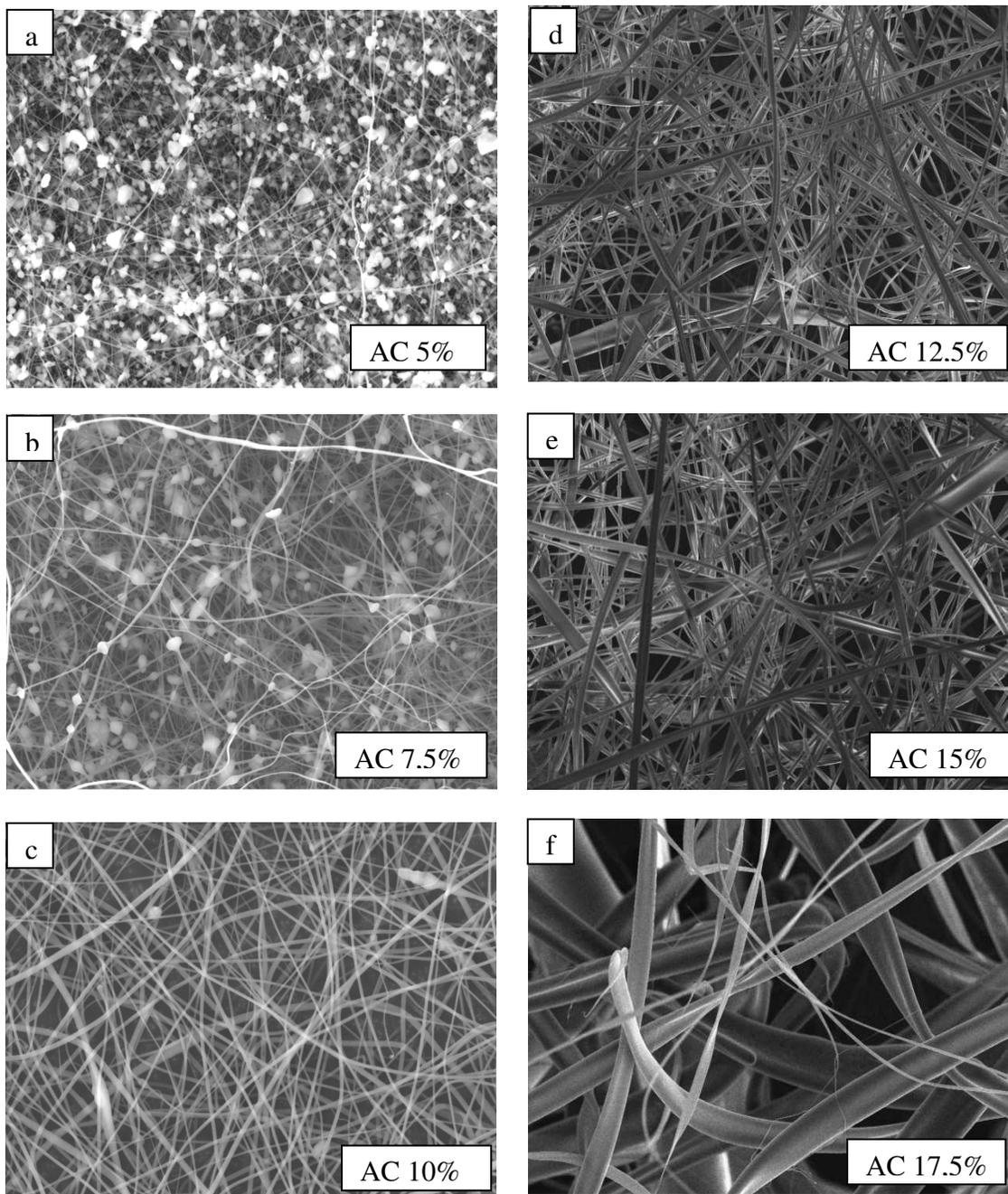


Figura 27 – Micrografias (MEV) das nanofibras de acetato de celulose nas concentrações de a)5, b)7,5, c)10, d)12,5, e)15 e f)17,5% (m/m). O menor diâmetro de fibras foi alcançado na concentração de 10% (m/m) de AC, enquanto que a menor incidência de ‘beads’ ocorreu na concentração de 12,5% (m/m) (Ampliação de 5.000x).

Embora os solventes orgânicos sejam conhecidos pela baixa condutividade, alguns deles, como a acetona, quando misturados a solventes de maior condutividade se tornam ideais ao processo de eletrofição (OHKAWA et al., 2009). Portanto, a mistura de acetona e água a uma concentração de 10%(m/m) de acetato de celulose foi adequada e mesmo quando comparada a concentração de 12,5% (m/m) apresentou melhores condições de fição, não havendo necessidade de inúmeras interrupções para limpeza da agulha por solidificação da solução.

5.2. NANOFIBRAS DE ACETATO DE CELULOSE E ÓLEOS NATURAIS

Os óleos naturais das espécies *Copaifera langsdorffii* (copaíba) e *Cymbopogon nardus* (citronela) foram incorporados com sucesso nas nanofibras de acetato de celulose e de certa forma também facilitaram o processo, melhorando as propriedades da solução em algumas concentrações dos óleos.

Com base nas análises de caracterização do material realizadas nesse trabalho e em trabalhos paralelos o grupo não conseguiu concluir quais propriedades da solução são alteradas após a adição dos óleos. Mas, segundo a teoria proposta por Zeng *et al* (2003) sobre o papel dos surfactantes nas soluções, imagina-se que os óleos possam atuar como surfactantes, diminuindo a tensão superficial da solução e aumentando as interações entre o solvente e as cadeias do soluto; essa diminuição na tensão superficial evitaria a formação de *beads* ao longo das fibras. Além disso, há um suposto aumento na viscosidade da solução que faz com que as cadeias fiquem mais esticadas e interconectadas por solvente e óleo, admitindo uma relação estável e pouco energizada, não endotérmica (teoria discutida no *item 3: Tensão Superficial*).

As medidas de viscosidade e tensão superficial foram realizadas para o óleo de citronela em trabalho paralelo e estão sendo realizadas para a copaíba, mas os resultados até agora obtidos não demonstraram alterações significativas para que conclusões sejam tiradas. Existe ainda a hipótese da migração desses óleos para a superfície das nanofibras, o que poderia explicar a formação de um jato mais estável e diâmetros mais homogêneos.

Para essa dedução testes estão sendo feitos com permanganato de potássio que oxida os óleos e por diferença de coloração pode-se observar a migração dos mesmos.

Os óleos misturados às soluções de acetato de celulose a 10%(m/m) produziram fibras com diâmetros mais regulares e ajudaram a evitar a formação de grânulos (*beads*) (ver Figura 28). Durante a eletrofição das nanofibras com 5% de óleo de citronela e 10% de óleo de copaíba (Figura 28) não houve a necessidade de inúmeras interrupções para limpeza e desentupimento da ponta da agulha, já que essas soluções não se solidificavam com a mesma frequência das soluções de acetato de celulose puro.

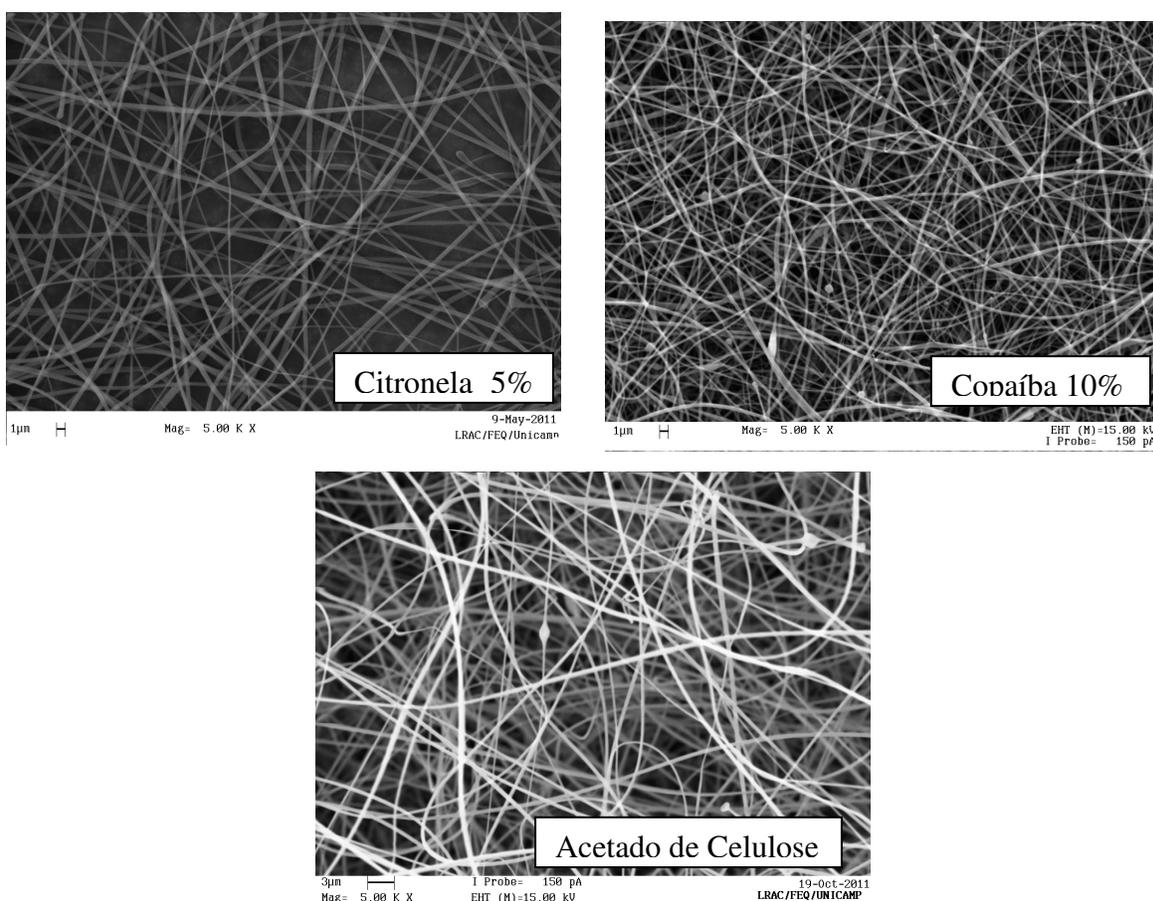


Figura 28 - Micrografias de nanofibras incorporadas com 5% de óleo de citronela, 10% de óleo de copaíba e acetato de celulose puro a 10%(m/m), respectivamente. (Ampliação de 5.000x)

As nanofibras com 5% de óleo de citronela apresentaram maior regularidade no diâmetro, com média de 400nm, seguida das nanofibras de acetato puro a 10% (m/m), com

média de 200nm em diâmetro e a copaíba a 10% com uma média de 300nm e menor regularidade, ou seja, maior faixa de diâmetros (ver Figura 28).

Devido às diferenças nas propriedades de composição e miscibilidade de cada um dos óleos, eles interagem com a solução de acetato de celulose e com a fibra de maneiras particulares. A citronela se dissolve com relativa facilidade na solução de acetato de celulose e a copaíba forma uma emulsão na solução, pode ser que essas características alterem a tensão superficial, a condutividade e a viscosidade da solução, interferindo no diâmetro das fibras depositadas.

A menor interação entre o óleo de copaíba e a solução de acetato de celulose pode ser um fator positivo que facilite a liberação controlada dos componentes terapêuticos do óleo. Como afirma Kriegel et al. (2009), essa liberação controlada de componentes se observa em sistemas que utilizam surfactantes aniônicos, como por exemplo o surfynol com baixa tensão superficial dinâmica e estável em ambientes com altas forças iônicas e polímeros aniônicos, onde as interações são mais fracas (KRIEGEL C. et al., 2009).

Como o foco desse trabalho é a incorporação do óleo de copaíba e não da citronela, a seguir a discussão se voltará as nanofibras incorporadas com a copaíba (Figuras 29 e 30).

Observa-se na Figura 30 que a maior parte dos filamentos da nanofibra com 5% de óleo de copaíba alcançou diâmetros menores que 100nm, mas nessa concentração houve grande incidência de *beads* ao longo da fibra (ver Figura 30). A nanofibra com 1% de óleo apresentou a menor faixa de diâmetro dentre as outras três amostras, entre 90 e 300nm (ver Figura 30) e menor incidência de *beads*, provavelmente devido a melhor miscibilidade do óleo na solução. A nanofibra com 10% de óleo de copaíba apresentou diâmetros na faixa de 150 a 500nm e a nanofibra com 15% de óleo apresentou uma distribuição de diâmetros mais regular, mas um pouco maiores, na faixa de 300 a 600nm.

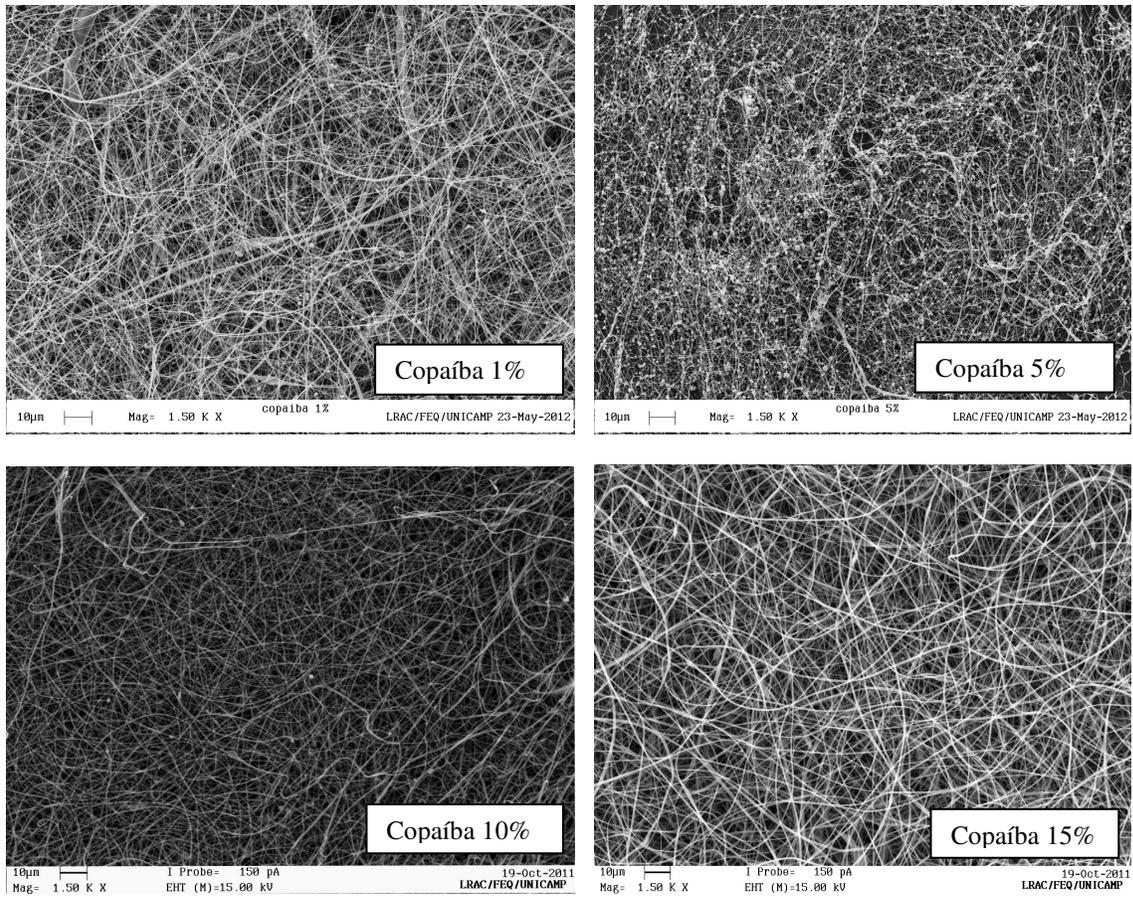


Figura 29 - Micrografias de nanofibras de acetato de celulose incorporadas com 1%; 5%; 10% e 15% de óleo de copaíba (Ampliação de 1.500x).

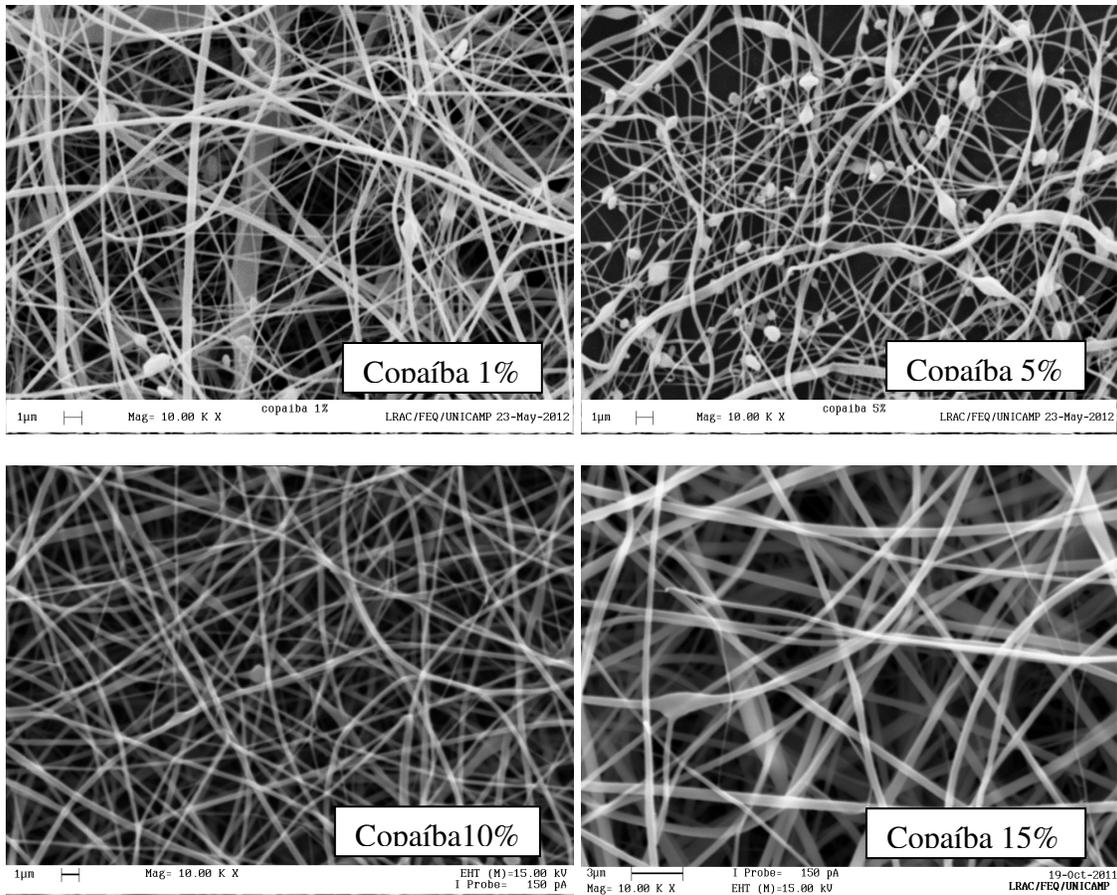


Figura 30 - Micrografias de nanofibras de acetato de celulose incorporadas com 1%; 5%; 10% e 15% de óleo de copaíba (Ampliação de 5.000x).

Portanto, dentre todas as amostras, a nanofibra com 15% de copaíba apresentou a menor incidência de *beads* e os maiores diâmetros (300 a 600nm). Já a nanofibra com 10% de óleo não apresentou quantidade de *beads* prejudicial à estrutura do material e o diâmetro na faixa de 150-500nm ficou dentro dos 100-300nm propostos por Huang et al. (2007) para *scaffolds* e um pouco abaixo da faixa de 350-1100nm mencionada por Kumbar et al. (2008) e Haas et al. (2010) para adesão e proliferação de fibroblastos em *scaffolds*.

Como será discutido no *item 5.8. Ensaio de Viabilidade Celular In Vitro*, a amostra com 15% de óleo apresentou certa toxicidade à proliferação dos fibroblastos. Além disso, as nanofibras com 10% de óleo foram as mais fáceis para eletrofiar, pois o número de interrupções para a limpeza e desentupimento da agulha foi menor e o jato teve maior estabilidade. Portanto 10% é a concentração mais indicada a uma aplicação terapêutica.

5.3. ANÁLISES POR CROMATOGRAFIA GASOSA

5.3.1. Cromatografia Gasosa do Óleo de Copaíba

Os perfis cromatográficos do óleo de copaíba bruto e do óleo de copaíba a 15% extraído com álcool etílico da amostra de nanofibra apresentaram semelhanças. Os dois cromatogramas contêm três regiões bem definidas de eluição e apresentam picos nas mesmas faixas de retenção, isso sugere que há presença do óleo na estrutura do material (ver Figuras 31 e 32).

A grande complexidade de insumos de origem natural conduziu a OMS (Organização Mundial da Saúde) a considerar e aceitar técnicas cromatográficas *fingerprint* como uma maneira de analisar a qualidade de produtos naturais, focalizando a comparação qualitativa e sistemática dos picos obtidos nas diferentes amostras (WHO, 1991). Sendo assim, comparando-se os diversos tempos de retenção obtidos pelas CGs das duas amostras (Figuras 31 e 32) com a CG obtida por Biavatti *et al.* (2006) para identificar os componentes do gênero *Copaifera* (Figura 33), detecta-se quatro componentes; na primeira região de eluição o sesquiterpeno cariofileno (maior pico das Figuras 31 e 32), na segunda região os diterpenos ácido copálico e ácido caurenóico e na terceira região, o ácido hardwickiico.

O ácido copálico é utilizado como um marcador quimiotaxonômico do óleo de copaíba por ser característico e restrito ao gênero *Copaifera* (BIAVETTI *et al.*, 2006).

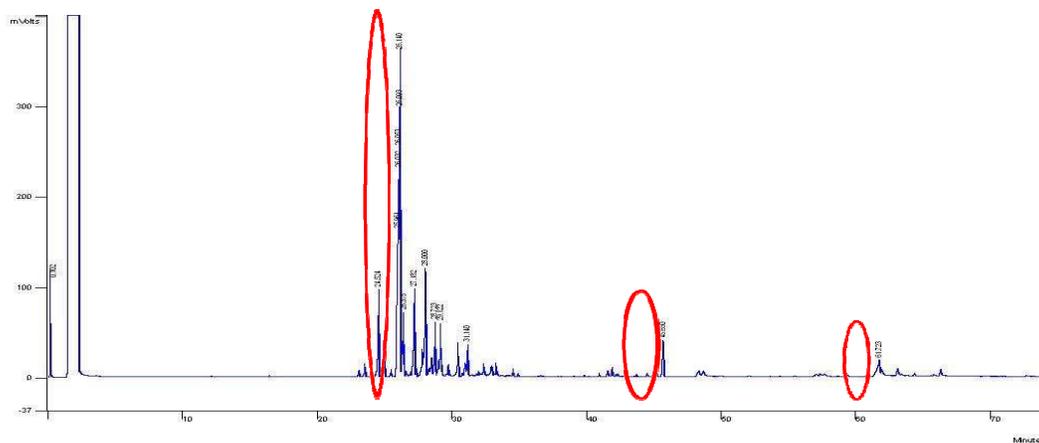


Figura 31 – Cromatografia gasosa do óleo bruto da espécie *Copaifera langsdorffii*. Sesquiterpeno cariofileno indicado pelo primeiro pico em vermelho, diterpenos ácido copálico e ácido caurenóico indicados pela segunda região em vermelho e ácido hardwickiico pelo terceiro pico em vermelho (Laboratório LRAC, UNICAMP, 2011)

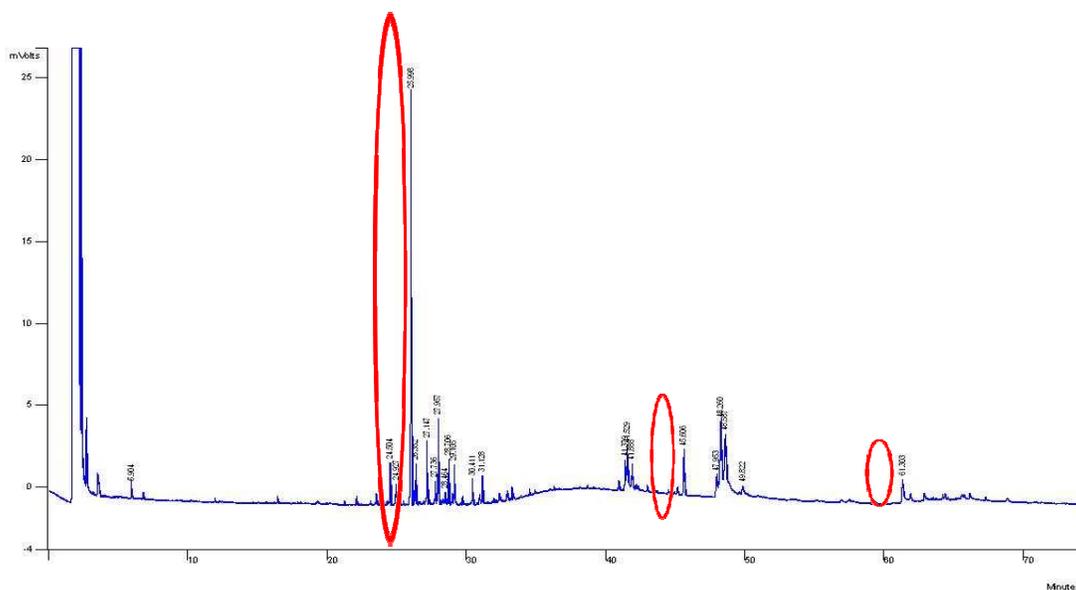


Figura 32 – Cromatografia gasosa do óleo da espécie *Copaifera langsdorffii* a 15%, extraído da nanofibra de acetato de celulose. Sesquiterpeno cariofileno indicado pelo primeiro pico em vermelho, diterpenos ácido copálico e ácido caurenóico indicados pela segunda região em vermelho e ácido hardwickiico pelo terceiro pico em vermelho (Laboratório LRAC, UNICAMP, 2011)

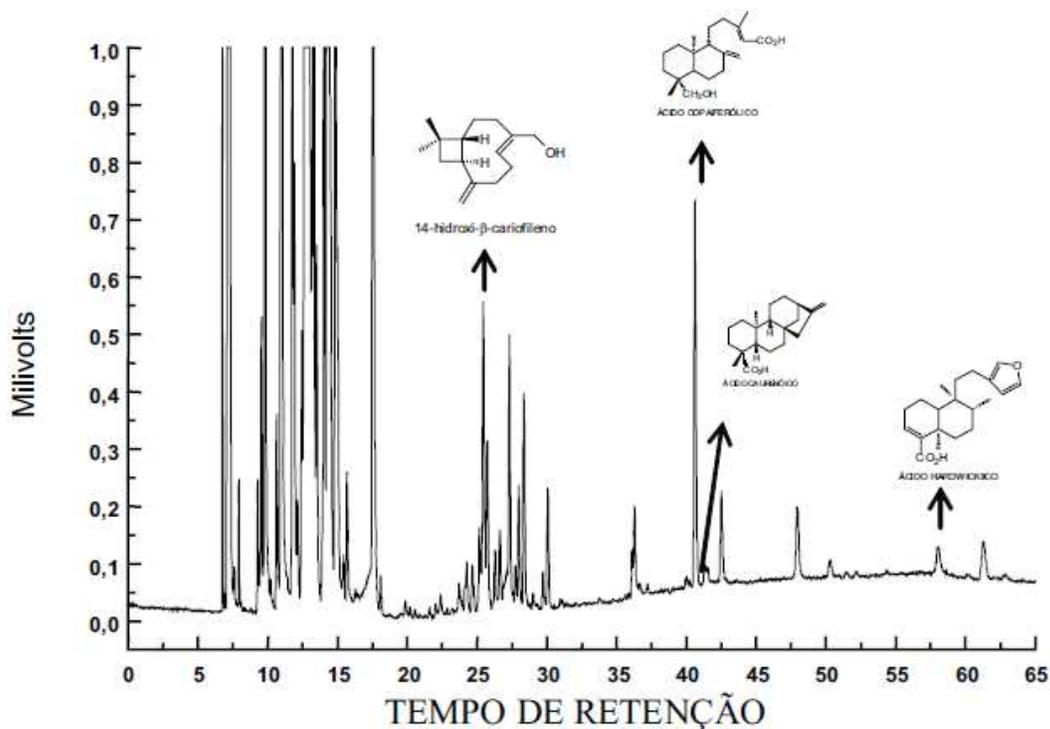


Figura 33 – Cromatografia gasosa do óleo bruto do gênero *Copaifera*. Sesquiterpeno cariofileno indicado pelo primeiro pico, diterpenos ácido copálico e ácido caurenóico indicados na segunda região e ácido hardwickiico indicado na última seta (BIAVATTI et al., 2006).

Os terpenos são classificados de acordo com o número de unidades de isopreno (u.i.) que os constitui: monoterpenos (C₁₀, duas u.i.), sesquiterpenos (C₁₅, três u.i.), diterpenos (C₂₀, quatro u.i.), sesterterpenos (C₂₅, cinco u.i.), triterpenos (C₃₀, seis u.i.) e tetraterpenos (C₄₀, oito u.i.) (CASTRO et al. 2004). Os componentes sesquiterpenos são, em geral, menos voláteis que os monoterpenos, e mais voláteis que os diterpenos, por isso os componentes sesquiterpenos do gênero *Copaifera* eluem antes dos componentes diterpenos (*ver* Figura 34) (VEIGA et al., 1997).

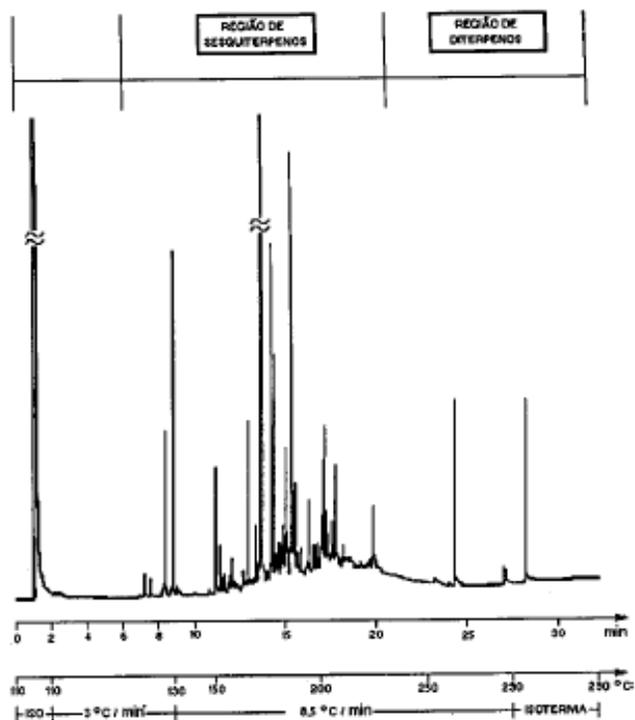


Figura 34 - Cromatograma da espécie *Copaiba multijuga*. Primeira eluição de sesquiterpenos e segunda região de eluição de diterpenos (VEIGA et al., 1997).

Nota-se que a região de eluição dos hidrocarbonetos sesquiterpênicos é muito congestionada (Figuras 31, 32,33 e 34). O grande número de picos dificulta uma análise comparativa. Por isso a maior parte dos autores procura trabalhar com a fração contendo os diterpenos. Pela ordem, nos cromatogramas aparecem, os hidrocarbonetos sesquiterpênicos, sesquiterpenos oxigenados, hidrocarbonetos diterpênicos e diterpenos oxigenados (PINTO *et al.*, 2000).

Para uma identificação mais precisa dos componentes do óleo é interessante que se faça a cromatografia gasosa acoplada a um espectrômetro de massa e que se calcule o índice de Kovats (IK), através da cromatografia nas mesmas condições de uma série de *n*-alcanos e da comparação do valor calculado de cada componente com os índices apontados na literatura, segundo Adams, 2001.

5.3.2. Cromatografia Gasosa do Óleo de Citronela

A cromatografia gasosa do óleo de citronela extraído com álcool etílico das nanofibras permitiu identificar três componentes majoritários citados por Castro *et al.* (2007): o citronelal (monoterpeno) indicado pelo primeiro pico *em vermelho* (Figura 35), o citronelol (monoterpeno) indicado pelo segundo pico *em vermelho* e o geraniol, indicado na Figura 36 pelo terceiro pico *em vermelho*. O elemol (sesquiterpeno) e os outros componentes não puderam ser identificados com precisão pela falta de um espectrômetro de massa acoplado ao cromatógrafo.

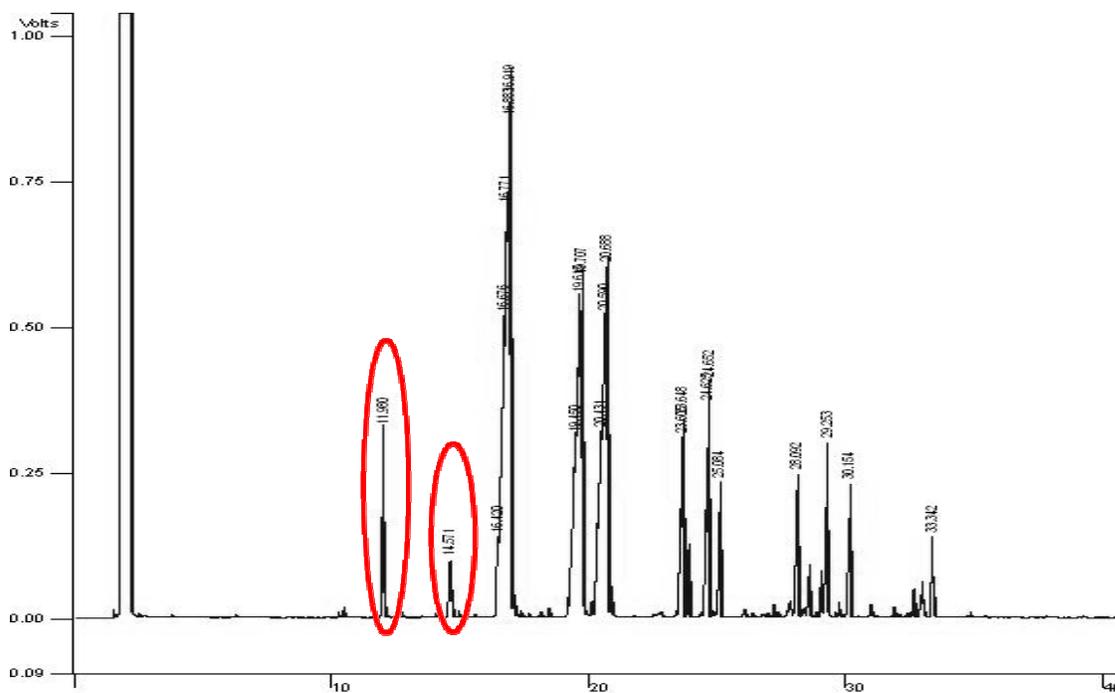


Figura 35 – Cromatografia gasosa do óleo da espécie *Cymbopogon nardus* a 5% extraído da nanofibra de acetato de celulose. Primeiro monoterpeno indicado em vermelho Citronelal, segundo Citronelol (Laboratório LRAC, UNICAMP, 2011)

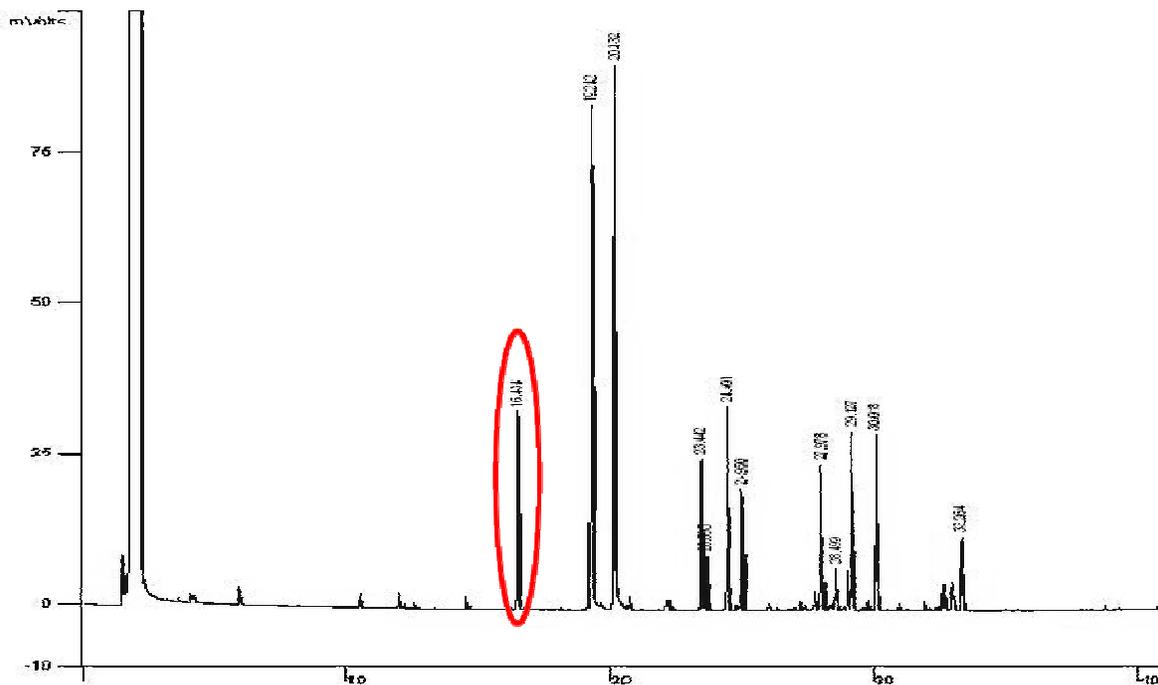


Figura 36 – Cromatografia gasosa do óleo essencial da espécie *Cymbopogon nardus* a 5% extraído da nanofibra de acetato de celulose. Monoterpeno indicado em vermelho Geraniol (Laboratório LRAC , UNICAMP, 2011)

5.4. ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA

Foram analisadas cinco amostras de nanofibras por termogravimetria (TGA), uma amostra de nanofibra de acetato de celulose puro a 10%(m/m) e quatro amostras de nanofibras com 1, 5, 10 e 15% de óleo de copaíba.

O resultado desta análise mostra que o material, mesmo após vários dias em temperatura ambiente e sem controle de umidade, não adsorve muita água e se mantém inalterado. A Figura 37 do TGA da nanofibra de acetato de celulose puro mostra que a perda de massa entre 50 e 150°C foi de menos de 1%. Ocorre um pico aos 210°C, observado na curva da derivada da massa/temperatura, onde se inicia a degradação do

material. Porém é considerada uma temperatura muito acima da temperatura de utilização do material.

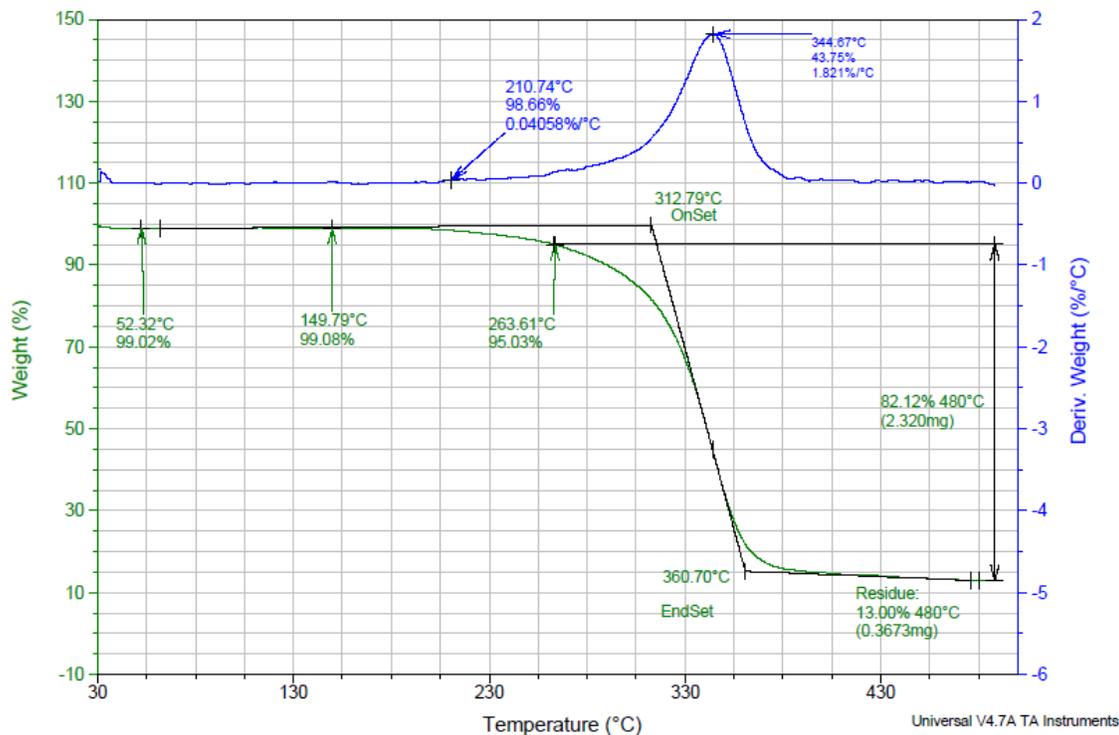


Figura 37- Resultado de TGA para amostra de nanofibra de acetato de celulose puro.

Para comparação dos resultados as curvas de TGA das cinco amostras analisadas foram plotadas em um mesmo gráfico. As curvas mostram que a nanofibra com 1% de copaíba tem maior estabilidade térmica que as outras composições, seguida da curva de acetato de celulose puro que apresenta maior estabilidade que as amostras com 5, 10 e 15% de copaíba (Figura 38). Provavelmente esse comportamento é devido à imiscibilidade total do óleo a partir de 5%.

A perda inicial de massa das curvas com 5, 10 e 15% é referente à umidade e presente nas amostras (ver Figura 38):

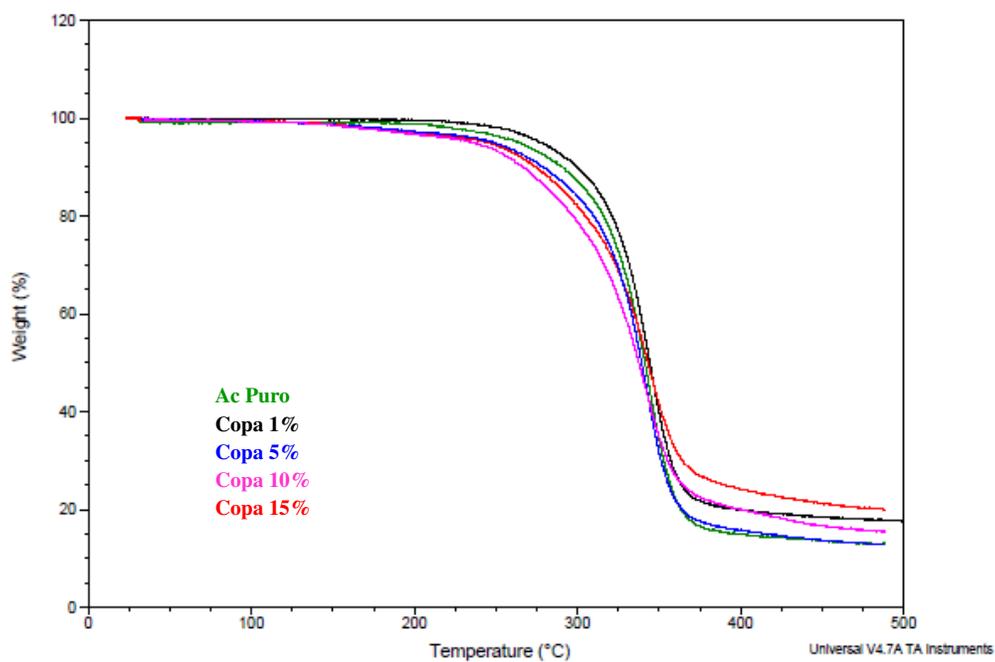


Figura 38 - Comparação dos resultados de TGA variando-se as porcentagens de óleo de copaíba.

É interessante observar na Figura 39 que a taxa residual do material a 480°C variou de uma amostra para outra, sendo que a maior taxa se apresentou na amostra com 15% de copaíba e a menor com 5% de copaíba. Devido a maior cristalinidade da amostra de acetato puro quando comparada as amostras com 1 e 5% de copaíba ela apresentou maior taxa residual a essa temperatura.

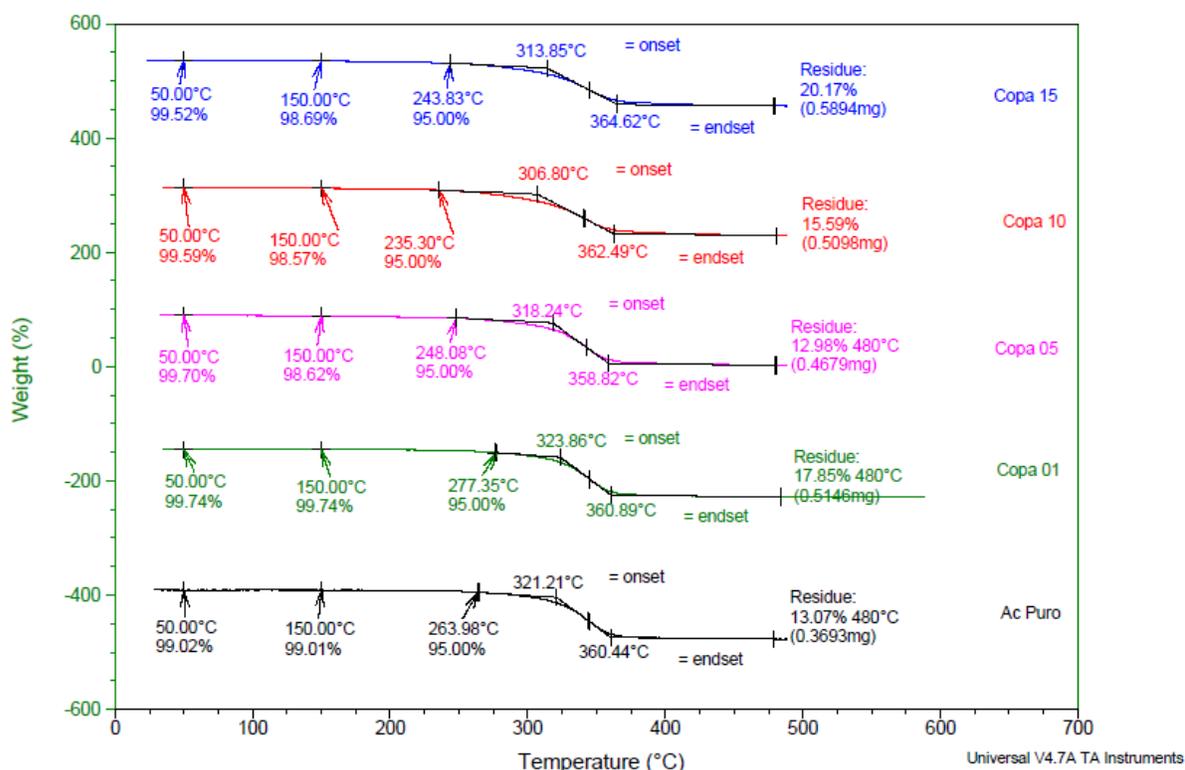


Figura 39: Gráfico dos resultados de TGA para as cinco amostras de nanofibras analisadas.

5.5. ANÁLISE CALORIMÉTRICA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC)

As curvas de DSC das amostras de nanofibras de acetato de celulose incorporadas com as concentrações de 1, 5, 10 e 15% de óleo de copaíba foram plotadas em um mesmo gráfico para comparação (Figuras 40 e 41).

As curvas de DSC deram resultados satisfatórios, de onde algumas conclusões podem ser tiradas. As amostras seguiram um mesmo padrão, todas apresentaram dois picos endotérmicos entre 40 °C e 250 °C. O primeiro pico a aproximadamente 150 °C (Figura 40) é referente à volatilização de componentes (umidade) das nanofibras, que pode ser anulado com a pré-secagem do material em estufa por 48h a 150 °C, ao invés de 100 °C. Talvez,

com as amostras secas, a linha-base fique mais nítida e dê para determinar a Tg das nanofibras.

Para a caracterização da estrutura das nanofibras o segundo pico endotérmico entre 200 e 240 °C é o evento mais importante (ver Figura 41). Esse pico indica que o aumento da concentração de óleo na estrutura diminui a cristalinidade, pois a entalpia de amolecimento decresce.

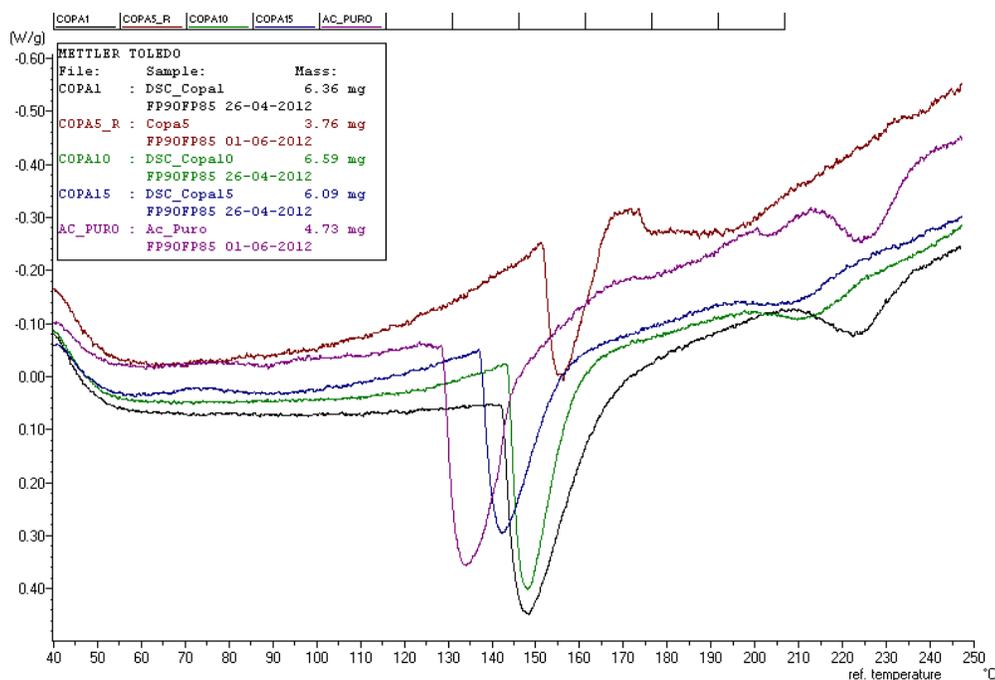


Figura 40- Comparação dos resultados de DSC variando-se as porcentagens de óleo da espécie Copaifera sp. nas nanofibras de acetato de celulose. Curvas de 40 °C a 250 °C.

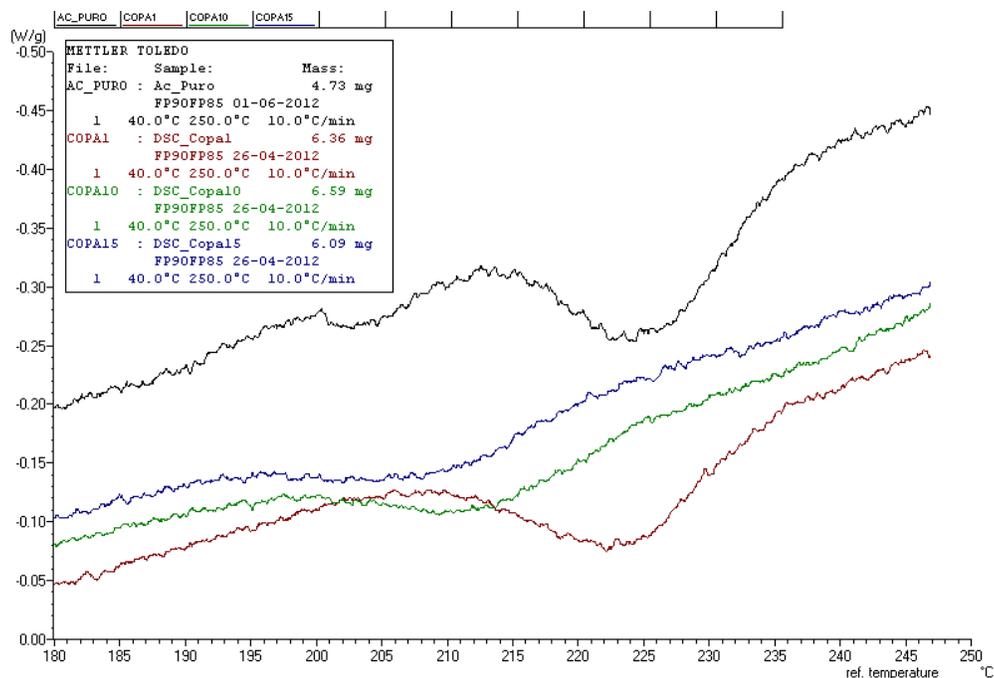


Figura 41 - Comparação dos resultados de DSC variando-se as porcentagens de óleo da espécie Copaífera sp. nas nanofibras de acetato de celulose. Curvas de 180 °C a 250 °C.

Com base na literatura temos que a entalpia de fusão (ΔH_f°) do cristal de acetato de celulose é de 58,8 J/g (CERQUEIRA D.A. et al., 2006), a partir desse valor é possível calcular o percentual de cristalinidade de cada amostra. A Tabela 11 aponta as temperaturas dos eventos endotérmicos com as respectivas energias específicas envolvidas no processo e as porcentagens aproximadas de cristalinidade de cada uma das amostras.

Tabela 11 - Porcentagem de cristalinidade das amostras de nanofibras:

Amostras	Cristalinidade (%)	Entalpia de fusão (ΔH_f°)
Acetato de Celulose	13,9	9,20 J/g
Copaíba 1%	13,7	8,08 J/g
Copaíba 10%	6,9	4,07 J/g
Copaíba 15%	5,2	3,07 J/g

Normalmente os não-tecidos eletrofiados tendem a apresentar menor resistência a tração e mais baixo módulo de Young porque durante o processo de eletrofiação as cadeias estão fracamente empacotadas e mais “frouxas”. No esticamento da solução pelo jato carregado eletrostaticamente não dá tempo das cadeias se organizarem e se ordenarem (HAAS, D. et al., 2010). Por isso, a cristalinidade do acetato de celulose eletrofiado diminui e com a adição dos óleos diminui mais ainda. Haas D. et al. (2010) cita estudos que utilizaram coletores do tipo rotativo para a produção de fibras alinhadas que conferiram maior resistência mecânica as fibras.

5.6. ANÁLISES DE CONDUTIVIDADE ELÉTRICA

A condutividade das soluções foram medidas por tratar de um requisito importante ao trabalhar com eletrofiação. Maiores condutividades elétricas da solução significam menores potenciais elétricos aplicados para o estiramento da solução. Na Figura pode-se verificar que o a concentração de copaíba na solução de acetato de celulose (10% m/m) não influencia substancialmente a condutividade da solução, mas tende a ter uma diminuição. A solução com 2 % do óleo deu um resultado inesperado, mesmo tendo sido feitas seis medições ela apresentou um valor de condutividade igual a solução de acetato de celulose puro (Figura 42).

O sistema acetona/água possui uma condutividade elétrica adequada a eletrofiação, de aprox. 6,2 $\mu\text{S}/\text{cm}$. Isso contribui para explicar a possibilidade de obter fibras quando a voltagem aplicada foi de 10 kV.

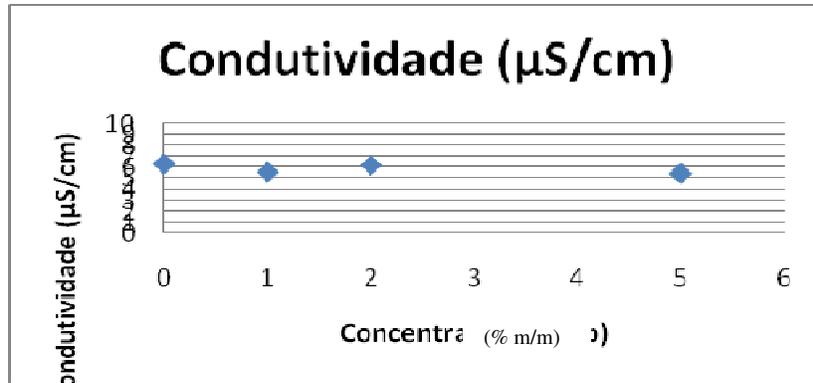


Figura 42- Condutividade elétrica das soluções de acetato de celulose com concentrações de 0, 1, 2 e 5% de óleo da espécie *Copaifera sp.*

5.7. ENSAIOS DE VIABILIDADE CELULAR *IN VITRO*

5.7.1. 1º Ensaio de Viabilidade Celular *In vitro*

O resultado que se pretendia com o teste para adesão celular foi alcançado, as células *VERO* (Figura 43) lançadas na superfície das seis nanofibras testadas no primeiro teste aderiram e começaram a se espalhar após 24 horas de experimento (Figura 44). Houve um crescimento mais acelerado das células nas amostras controle quando comparadas as taxas de crescimento celular nas nanofibras, provavelmente devido à fase *lag* de adaptação das células ao novo substrato.



Figura 43: Células *VERO* aderidas em amostra controle (Ampliação MO: 40x).

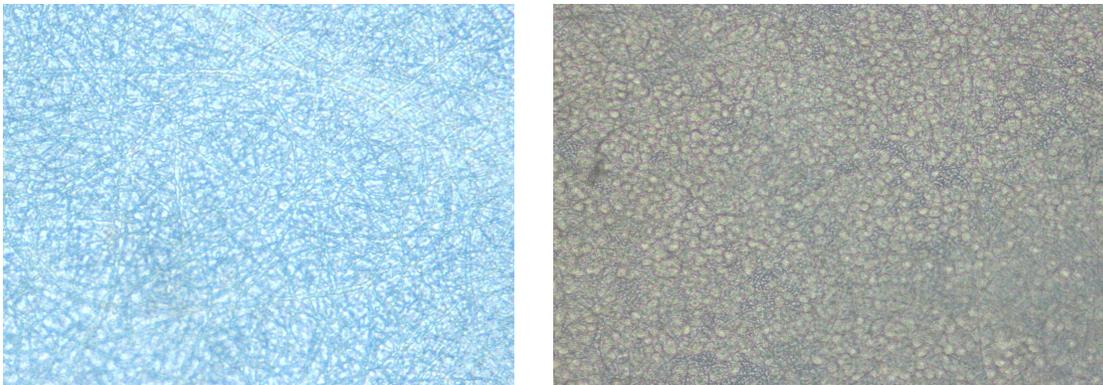


Figura 44 - Primeiro teste de viabilidade celular das nanofibras para adesão de fibroblastos: a) nanofibra de acetato de celulose com a Copaíba 10%; b) logo após lançamento das células VERO na superfície da nanofibra. (Ampliação MO: 40x)

Infelizmente as culturas do primeiro experimento foram contaminadas por bactéria e a fase de preparação para a microscopia eletrônica de varredura não pôde ser feita. Na detecção das bactérias contaminantes por microscopia óptica, as três amostras que continham porcentagem de 10% de copaíba e a amostra com 8% de citronela estavam menos contaminadas. Esse resultado permite inferir que os óleos estão desempenhando papel antibacteriano. Considerando que são resultados pré-liminares, ainda há muito a ser testado e comprovado.

5.7.2. 2º Ensaio de Viabilidade Celular *In vitro*

O acetato de celulose e os óleos, de copaíba e de citronela incorporados às matrizes (Tabela 12) não foram tóxicos a ponto de inviabilizarem a adesão celular, mas houve diferenças perceptíveis entre as amostras como demonstrado nas micrografias das Figuras 46, 47 e 48.

Tabela 12 – Amostras de nanofibras para o teste de viabilidade celular.

NANOFIBRAS	[COPAÍBA]	[CITRONELA]
POÇO 1	15%	-
POÇO 2	10%	-
POÇO 3	AC puro	AC puro
POÇO 4	-	5% (p/p)

Os fibroblastos apresentaram uma morfologia circular e pouco espreada (Figura 46), semelhante aos resultados encontrados por Liang *et al.* (2009), onde ele mostra um fibroblasto aderido a uma nanofibra de PVA após 24 horas de incubação (ver Figura 45). Liang *et al.* (2009) utilizou fibroblastos NIH 3T3, de origem diferente das células *Vero* utilizadas neste trabalho e registrou por MEV dois períodos distintos: 24 horas de incubação e 72 horas. Provavelmente as 36 horas de incubação utilizadas aqui não foram suficientes para que as células tomassem um formato mais alongado.

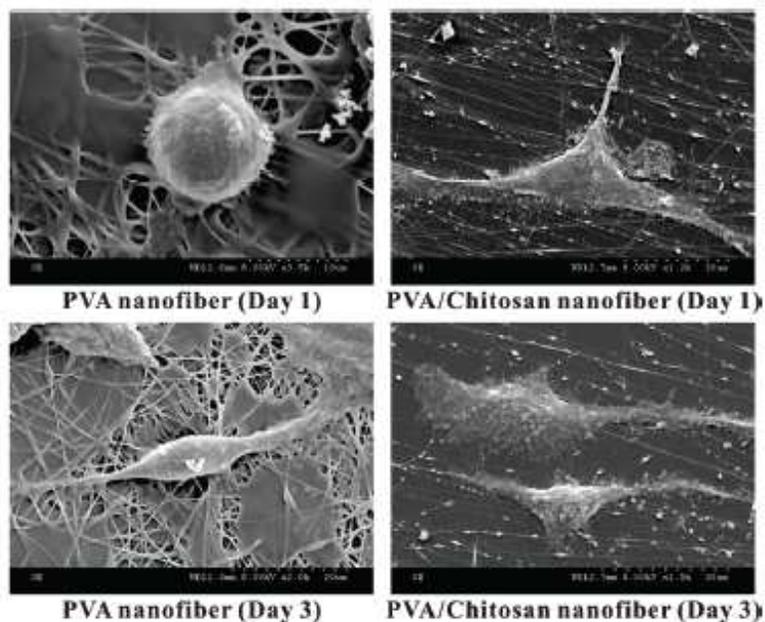


Figura 45 - Testes de viabilidade celular (fibroblastos NIH 3T3) de nanofibras de PVA e PVA/quitosana (LIANG *et al.*, 2009).

A nanofibra com 10% de copaíba foi o suporte em que os fibroblastos melhor se adaptaram, nota-se nas Figuras 46 e 47 que as células estão realmente aderidas e mais espreiadas nessa amostra que nas outras duas. Além disso, há maior densidade celular nas amostras de 10% e 15% de copaíba (Figura 48) e ainda, as células na matriz de 15% estão menores que na de 10%, provavelmente devido a certo grau de toxicidade da copaíba a 15%.

O número de células vivas após 32 horas de incubação era maior na amostra controle que nas amostras que continham as nanofibras. Após as 36 horas, o número de células do controle continuava maior, mas as amostras que continham o óleo de copaíba a 15% e 10%(p/p) apresentaram maior densidade de células que as amostras de acetato puro e citronela. Isso demonstra que as nanofibras são corpos estranhos, as células precisam de um tempo para se adaptar ao novo suporte e que as nanofibras contendo óleo de copaíba possuem melhor citocompatibilidade (Figura 48).

A partir desses resultados é possível também inferir que o diâmetro, tamanho de poro e porosidade das fibras incorporadas com o óleo de copaíba a 10% e 15% foram adequados à proliferação e infiltração celular no corpo da estrutura tridimensional do material (ver Figuras 47 e 48 a. e b.).

Na fibra incorporada com óleo de citronela as células não conseguiram crescer dentro da estrutura tridimensional, provavelmente devido à porosidade e tamanho de poros não adequados (ver Figura 46 e 47 d.).

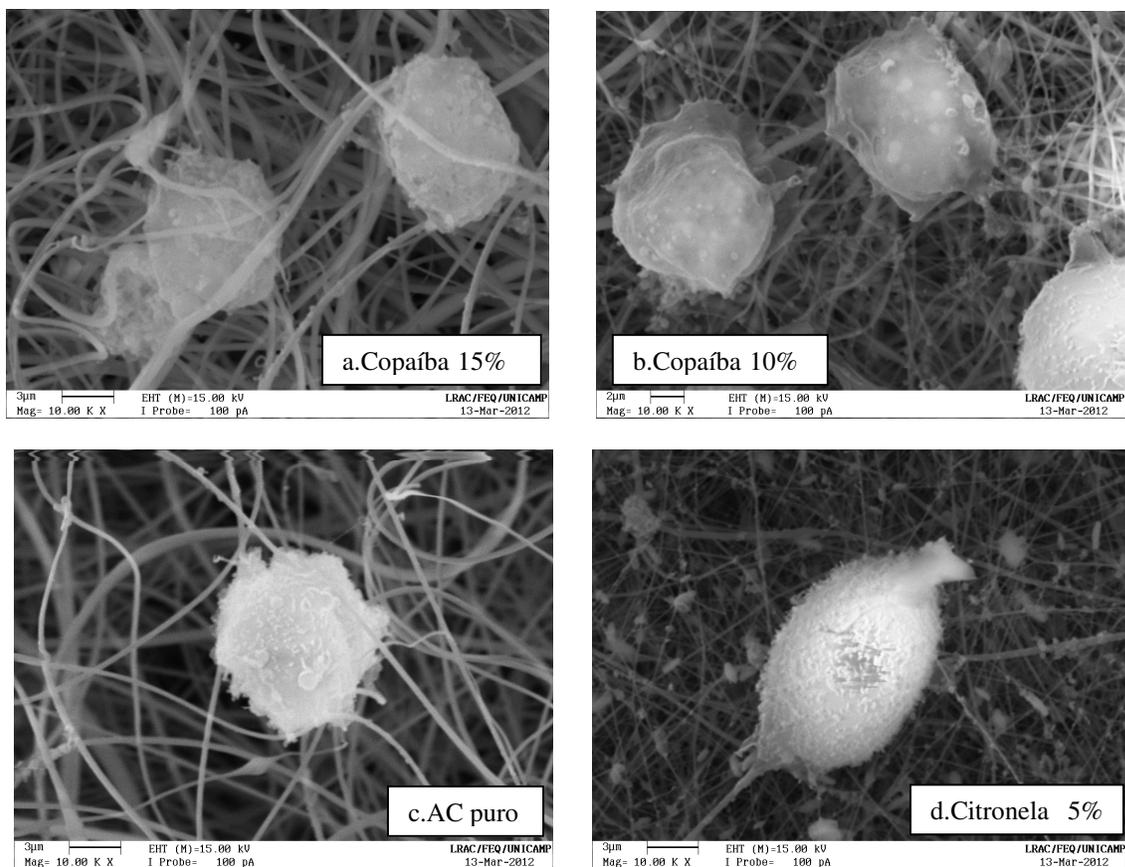


Figura 46 - Imagens de microscopia eletrônica de varredura (Ampliação de 10.000x). Nanofibras de acetato de celulose após teste de viabilidade celular *in vitro* com fibroblastos (células VERO): a) nanofibra incorporada com 15% de óleo de copaíba; b) nanofibra incorporada com 10% de óleo de copaíba; c) nanofibra de acetato de celulose puro (10% m/m); d) nanofibra incorporada com 5% de óleo de citronela.

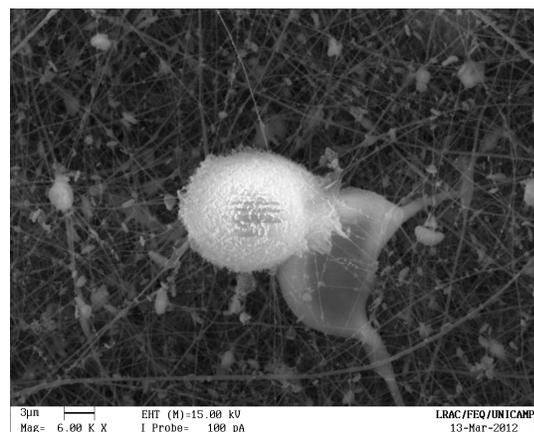
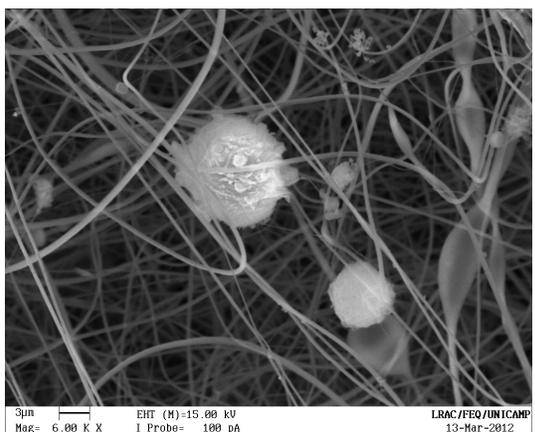
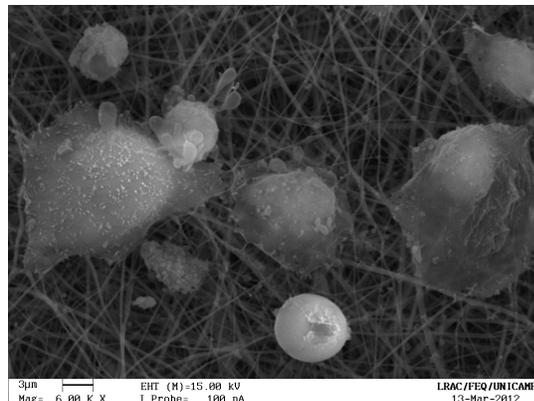
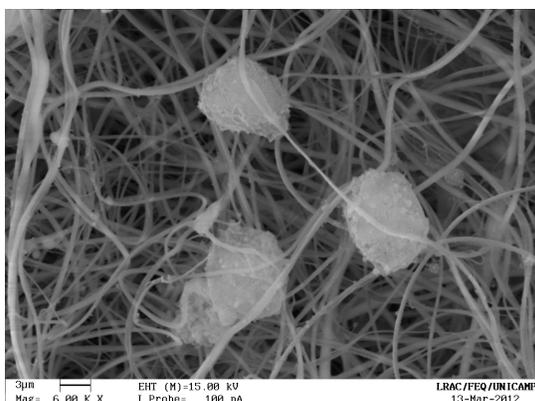


Figura 47- Imagens de microscopia eletrônica de varredura (Ampliação de 6.000x). Nanofibras de acetato de celulose após teste de viabilidade celular *in vitro* com fibroblastos (células VERO): a) nanofibra incorporada com 15% de óleo de copaíba; b) nanofibra incorporada com 10% de óleo de copaíba; c) nanofibra de acetato de celulose puro (10%*m/m*); d) nanofibra incorporada com 5% de óleo de citronela.

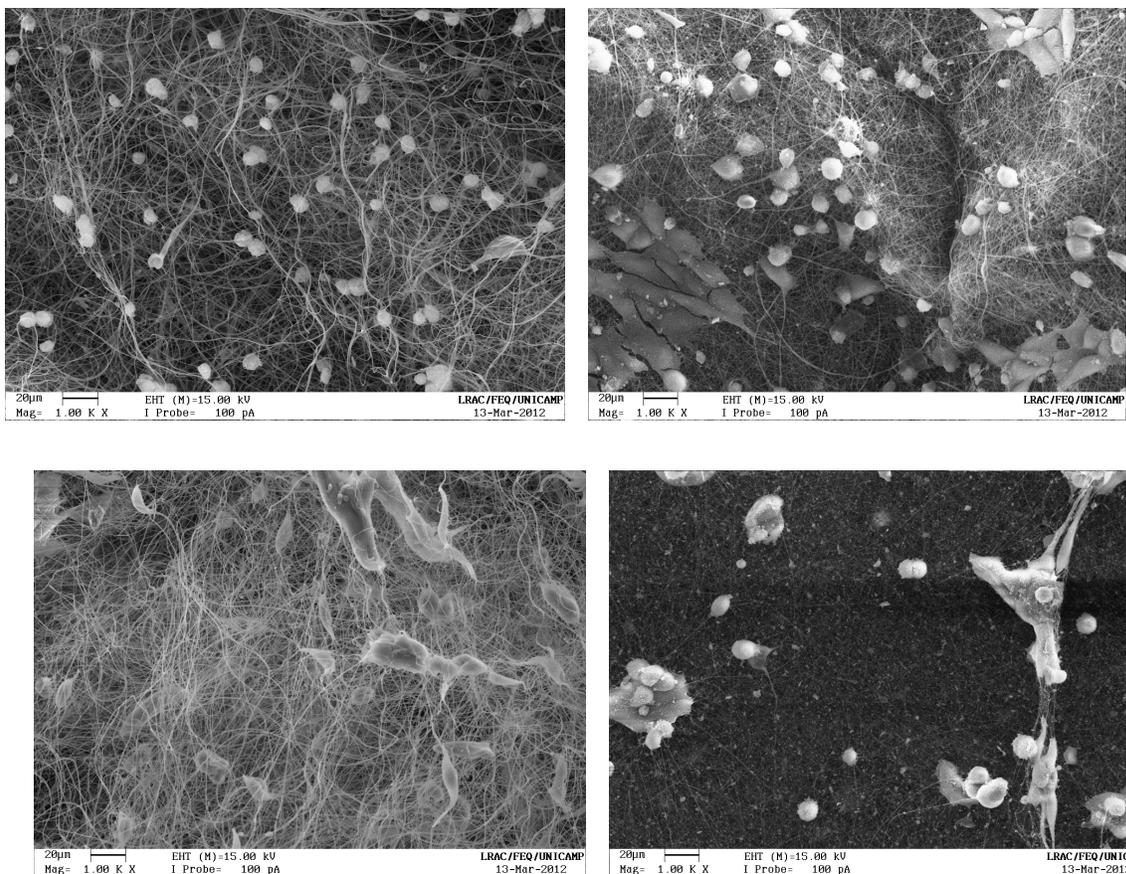


Figura 48 - Imagens de microscopia eletrônica de varredura (Ampliação de 1.000x). Nanofibras de acetato de celulose após teste de viabilidade celular *in vitro* com fibroblastos (células VERO): a) nanofibra incorporada com 15% de óleo de copaíba; b) nanofibra incorporada com 10% de óleo de copaíba; c) nanofibra de acetato de celulose puro (10% m/m); d) nanofibra incorporada com 5% de óleo de citronela.

O presente estudo sugere que a orientação dos filamentos, o tamanho e distribuição de poros e o diâmetro das fibras podem influenciar o comportamento das células e são fatores importantes para o desenvolvimento de pele artificial e outros tipos de tecidos. A primeira etapa dos resultados mostrou uma boa adesão e proliferação celular.

É interessante que se faça análises de Reações em Cadeia da Polimerase (PCR) em tempo real junto a esse tipo de teste para medir a expressão gênica do colágeno Tipo I e Tipo III. O PCR em tempo real permitirá ver se há diferenças na atividade celular em cada uma das matrizes e no suporte controle.

5.8. OBSERVAÇÕES FINAIS

Existem algumas desvantagens em se utilizar polímeros naturais em aplicações biomédicas, entre elas estão, a forte atividade fisiológica, o potencial para rejeição, a dificuldade na avaliação das taxas de degradação *in vivo* devido as diferenças nas concentrações enzimáticas em diferentes partes dos tecidos vivos e a insuficiente resistência mecânica dos polímeros naturais (HAYASHI, 1994).

Apesar de a celulose vir sendo utilizada como curativos e gazes para o tratamento de feridas, ela não possui as propriedades necessárias para o uso como *scaffolds* (implantes), já que o organismo não tem a capacidade de assimilá-la (DUEK et al., 2005). Uma alternativa a essa questão dada pelo pesquisador Bradley Swope (2010) é a incorporação de enzimas aos não-tecidos desenvolvidos por ele, que degradam a celulose em glicose e o material bioreabsorvível. Esse estudo mostrou que a enzima incorporada converte 90% do material em glicose (SWOPE, 2010).

Segundo Vert *et al* (1992) os termos, bioabsorvível e bioreabsorvível são distintos entre si, ele define os polímeros bioabsorvíveis como aqueles que podem se dissolver nos fluidos corpóreos sem que sofram quebra da cadeia macromolecular ou diminuam a massa molecular. E os polímeros bioreabsorvíveis como aqueles que são eliminados totalmente do organismo, inclusive seus subprodutos de degradação (compostos de baixa massa molar), sem efeitos colaterais residuais. A celulose é um polímero biodegradável devido à degradação macromolecular que sofre, mas que nem sempre é interessante, pois acaba muitas vezes dispersando produtos no organismo que não são eliminados (DUEK, 2005).

O problema dos curativos é que precisam ser retirados do local da injúria durante o processo de cicatrização e as feridas que ficam abertas exigem maior atenção de um profissional da saúde, além da remoção do material durante o tratamento ter maiores riscos de infecção (SWOPE, 2010).

Para a utilização das nanofibras produzidas nesse trabalho como curativos faz-se necessário entender o processo cicatricial como um todo, relacionando fatores locais a

fatores sistêmicos do organismo. Essas nanofibras poderão contribuir positiva ou negativamente para o processo de restauração natural do organismo.

Espera-se que o material produzido nessa pesquisa ajude o organismo a ativar o processo de cicatrização, contribuindo para a produção de componentes celulares e moleculares que se organizam com o objetivo de regenerar o tecido.

6. CONCLUSÕES

Matrizes de não-tecidos aleatoriamente depositadas foram produzidas com sucesso pela tecnologia de eletrofiação. As nanofibras atingiram diâmetros que variaram entre 600.0 ± 90.0 nm.

Com foco no óleo da espécie *Copaifera langsdorffii*, além das requeridas propriedades medicinais desse óleo, esse trabalho demonstrou que adicionado às soluções pré-eletrofiadas, melhora as propriedades da solução polimérica, facilitando o processo de eletrofiação e a produção de fibras mais homogêneas e regulares. Verificou-se também, por cromatografia gasosa, que há presença dos óleos nas nanofibras.

Foi constatada a possibilidade de fabricação de nanofibras de acetato de celulose incorporadas com os óleos das espécies *Copaifera landesdorffii* e *Cymbopogon nardus*. Alguns ajustes no processo ainda devem ser feitos para melhorar o desempenho e a credibilidade da técnica, de modo que facilite a reprodutibilidade dos ensaios.

Por cromatografia gasosa pôde-se identificar a presença do óleo de copaíba no corpo da nanofibra e alguns de seus componentes de maior interesse terapêutico.

As análises térmicas confirmaram que o material incorporado com óleo de copaíba apresenta boa estabilidade em todas as concentrações utilizadas.

Com o conjunto de análises feitas para caracterização estrutural e comportamental do material e levando em conta os testes de viabilidade celular, as melhores condições encontradas foram: acetato de celulose dissolvido no sistema de solventes acetona/água (4:1) a 10% m/m, com 0,1 % m/m dos óleos de copaíba ou de citronela, porcentagem farmacêutica recomendada.

Devido à sua elevada relação superfície/volume e ao notável desempenho mecânico, estas fibras demonstraram grande potencial para aplicações tais como a filtração, a regeneração de tecidos humanos, o fabrico de sensores, ou vestuário de proteção.

Análises de molhabilidade e energia de superfície (γ) pela medição do ângulo de contato (θ) das nanofibras estão sendo realizadas, além de testes para verificação da migração dos óleos para a superfície das fibras, através de ensaios com permanganato de potássio que oxida o óleo e por diferença de coloração avalia-se o seu deslocamento. Testes para explicar alguns comportamentos do material incorporado com os óleos naturais.

7. TRABALHOS FUTUROS E SUGESTÕES

- ✓ Obtenção de nanofibras a partir de fontes que utilizam polímeros bioabsorvíveis e/ou bioreabsorvíveis, biocompatíveis (BARBANTI S.H. et al., 2005, RATNER B.D., 2004), tanto polímeros sintéticos, como o copolímero poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) e a policaprolactona (PCL), quanto polímeros naturais, como o colágeno (MATTHEWS JA et al. 2002; HE W. et al., 2005; RHO K.S. et al. 2006; VENUGOPAL J. et al. 2006), a gelatina e a quitosana (BHATTARAI N. et al, 2005; LIANG J.I. et al, 2009; CHUNG T.W. et al. 2010).

- ✓ Diversificação da malha ou da disposição dos filamentos coletados no anteparo do equipamento de eletrofição, adaptando um coletor giratório que produza fibras alinhadas (SUNDARAY *et a.l*, 2004);

- ✓ Realização de testes sobre a atividade antimicrobiana dos óleos naturais, considerando possível aplicação clínica desses óleos;

- ✓ Fracionamento dos óleos essenciais estudados e identificação dos metabólitos de interesse, com funcionalidades microbianas, cicatrizantes, anti-inflamatórias e homeostáticas;

- ✓ Testes de citotoxicidade e biocompatibilidade *in vitro* e *in vivo* das nanofibras;

- ✓ Estudo sobre os biomateriais usados na medicina regenerativa de tecidos (*scaffolds*), o processo de cicatrização, inflamação e queimaduras.

- ✓ Zhang *et al.* (2005) utilizou células fibroblásticas dermais (Human Dermal Fibroblasts/HDF) para fazer os testes de viabilidade celular.

- ✓ Utilizar um surfactante como o surfynol para produzir uma microemulsão com estruturas micelares quando utilizado o óleo de copaíba e observar as diferenças quando em cultura (KRIEGEL C. et al., 2009).

- ✓ As análises de viabilidade celular para citocompatibilidade, adesão e proliferação em materiais poliméricos dependem muito das características de superfície tais como molhabilidade (hidrofilicidade/hidrofobicidade ou energia livre de superfície), química, carga, rugosidade e rigidez. É interessante trabalhar com as medições do ângulo de contato (θ) e energia de superfície (γ).

BIBLIOGRAFIA

ADAMS, R.P. Identification of essential oils components by gas chromatography/mass spectroscopy. Carol Streams: Allured, 2001. 456p.

ALFREY, T. The Influence of Solvents Composition on the Specific Viscosities of Polymer. Solutions. *J. Coll. Sci.* 2, 1, pp. 99-114.1946.

ALMEIDA, ÉRIKA VIRGINIA RAPHAEL. Valorização da Celulose de Sisal: uso na preparação de acetatos e de filmes de acetatos de celulose/celulose e quitosana/celulose. São Paulo: Universidade de São Paulo. 2009. Tese de Doutorado.

AMARAL, I. F.; BARBOSA, M. A.; BARRIAS, C. C.; CAVALHEIRO, J.; FERRAZ M. P.; GRANJA, P. L.; LOPES M. A.; MARTINS M. C. L.; MONTEIRO F. J.; RIBEIRO C. C.; SANTOS, J. D.; SOUSA, S. R.; QUEIROZ, A. C. Biomateriais. *In: Biotecnologia.*, Lidel, 377-397.2003.

AMARAL, M. B. *Citotoxicidade in vitro e biocompatibilidade in vivo de compósitos a base de hidroxiapatita, colágeno e quitosana.* São Carlos: Escola de Engenharia de São Carlos. Ana Maria de Guzzi Plepis. 2006. Dissertação (Mestrado).

ARAÚJO S.A.C., TEIXEIRA M.F.S., DANTAS T.V.M., MIRANDA A.M., LIMA F.E.S., MELO V.S.P., RICARTE A.R.F. & COSTA E.C. Avaliação *in vitro* da atividade citotóxica de drogas antivirais em fibroblastos caprinos (*In vitro* evaluation of the cytotoxic activity of antiviral drugs in goat fibroblasts). *Ciência Animal*, 18(1):25-31, 2008.

ARNOUS, A. H.; SANTOS, A.S.; BEINNER, R.P.C. Plantas medicinais de uso caseiro - conhecimento popular e interesse por cultivo comunitário. *Revista Espaço para a Saúde.* Londrina, v.6, n.2, p.1-6, jun.2005.

ASHBY, M., SHERCLIFF, H., CEBON, D. *Materials – Engineering, Science, Processing and Design.* Cambridge: Butherworth-Heinemann, Elsevier, 2007.

BARBANTI, S.H; ZAVAGLIA, C.A.C; DUEK, E.A.R. Polímeros bioreabsorvíveis na engenharia de tecidos. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, vol. 15, n° 1, p. 13-21, 2005.

BAUMGARTEN, P.K. "Electrostatic spinning of acrylic microfibers," *Journal of Colloid and interface Science*, vol. 36, 1971.

BENYUS, J.M. *Biomimética Inovação Inspirada pela Natureza*. Editora: Cultrix. 2005.

BHATTARAI SR, BHATTARAI N, YI HK, CHA DI, KIM HY. Novel biodegradable electrospun membrane: Scaffold for tissue engineering. *Biomaterials*; 25:2595–2602. 2004.

BHATTARAI, N., EDMONDSON, D., VEISEG, O., MATSEN, F.A. AND ZHANG, M. Electrospun chitosan-based nanofibers and their cellular compatibility. *Biomaterials*, University of Washington, Seattle, 2005.

BIAVATTI, M.W., DOSSIN, D., DESCHAMPS,F., LIMA, M.P. Análise de óleos-resinas de copaíba: contribuição para o seu controle de qualidade. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 16(2): 230-235, Abr./Jun. 2006.

BRITO, N.M.B., SIMÕES M.J., PESSOA A.F. & MELO MCF. Efeitos do óleo de copaíba na cicatrização de feridas cutâneas abertas em ratos. *Revista Paraense de Medicina* 12 (1): 28-32.1998.

BRUNDLE, C. R., EVANS C. A., WILSON, S. *Encyclopedia of Materials Characterization: surfaces, interfaces, thin films*. USA: Butterworth Heinemann, 1992.

BUCHKO, C. J, CHEN, L. C, SHEN, Y. AND MARTIN, D. C. Processing and microstructural characterization of porous biocompatible protein polymer thin films. *Polymer*. 40(26), pp. 7397-7407.1999.

CALLISTER, W. D. *Materials Science and Engineering – An introduction*. New York: John Wiley and Sons Inc. 7th Edition, 2007.

CAMARGO, MARCELO. *Estudos Preliminares sobre a Produção de Nanocelulose a partir de Algodão “never-dried” Utilizando Hidrólise Enzimática seguida de Sonicação com Ultrassom*. FEQ - UNICAMP, 2010. Dissertação (Mestrado).

CANEVAROLO JR., S. V. *Ciência dos Polímeros*. São Paulo: Artliber Editora. 2ª Ed., 2006.

CASTRO, H. G., PERINI, V.B. Crescimento, teor e composição do óleo essencial de *Cymbopogon nardus* (L.). *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v. 09, n. 04, p. 55-61, 2007.

CASTRO, H. G.; FERREIRA, F. A.; SILVA, D. J. H.; MOSQUIM, P. R., *Contribuição ao estudo das plantas medicinais metabólitos secundários*. 2. ed. Visconde do Rio Branco: Suprema, p.99, 2004.

CERQUEIRA, D.A., FILHO, G.R., ASSUNÇÃO, R.M.N. A New Value for the Heat of Fusion of a Perfect Crystal of Cellulose Acetate. *Polymer Bulletin* 56, 475–484. DOI 10.1007/s00289-006-0511-9. 2006.

CHANDY, T. and SHARMA, C.P. Chitosan matrix for oral sustained delivery of ampicilin. *Biomaterial*, v.12, n.12, p. 65-70, 1993.

CHIELLINI, E., SOLARO, R. Biodegradable plastics and polymers. Reading: Gerald Scott. *Cap. 1: Science and standards*, p.3-32, 2003.

CHOI, J.S., LEE, S.W., JEONG, L., BAE, S.H., MIN, B.C., YOUK, J.H., PARK, W.H. Effect of organosoluble salts on the nanofibrous structure of electrospun poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate). *International Journal of Biological Macromolecules*, 34, 4, pp. 249-256. 2004.

CHOI, K. "Morfológia e eficiência de filtragem de ar por materiais não trançados carregados," *Artigo Técnico*, pp. 40-43.2008.

CHONG, E.J; PHAN, T.T.; LIM, I.J.; ZHANG, Y.Z.; BAY, B.H.; RAMAKRISHNA, S.; LIM, C.T. Evaluation of electrospun PCL/gelatin nanofibrous scaffold for wound

healing and layered dermal reconstitution. *Acta Biomaterialia*. Volume 3, Issue 3, P. 321–330. 2007.

CHUAYJULJIT, S. Preparation of Microcrystalline Cellulose from Waste-Cotton Fabric for Biodegradability Enhancement of Natural Rubber Sheets. *Journal of Reinforced Plastics and composites*, v. 28, n.10, p.1245-1254, 2008.

CHUNG, T.W. AND CHANG, YL. Silk fibroin/chitosan–hyaluronic acid versus silk fibroin scaffolds for tissue engineering: promoting cell proliferations in vitro. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. Volume 21, Number 4, 1343-1351, DOI: 10.1007/s10856-009-3876-0.2010.

CORNING, P.A. *The Synergism Hypothesis*. McGraw-Hill Publishers.1983.

COSTA SOUSA, L.; CHUNDAWAT, S.PS; BALAN, V.; DALE B. ‘Cradle-to-grave’ assessment of existing lignocelluloses pretreatment technologies. *Elsevier, ScienceDirect*. 20:1-9. DOI 10.1016-J.COPBIO.2009.05.003.2009.

CRAWFORD, R. L. *Lignin biodegradation and transformation*. New York: John Wiley and Sons, 1981.

DAMIAN, C., BEIRÃO, L.H.; FRANCISCO, A., ESPÍRITO SANTO, M. L. P. AND TEIXEIRA, E. Quitosana: um amino polissacarídeo com características funcionais. *Alim. Nutr.*, Araraquara. V.16, n.2, p. 195-205. 2005.

DE VRIEZE, S., VAN CAMP, E.T., NELVIG E.A., HAGSTRO, A.B., WESTBROEK, P., CLERCK, K. The effect of temperature and humidity on electrospinning. *J Mater Sci*, 2009. 44:1357–1362. DOI 10.1007/s10853-008-3010-6

DEITZEL, J. M., KLEINMEYER, J., HARRIS, D. AND TAN, N. C. B. The effect of processing variables on the morphology of electrospun nanofibers and textiles. *Polymer*. 42, pp. 261-272.2001.

DEITZEL, J.M., J.D. KLEINMEYER, J.K. HIRVONEN, AND N.C. TAN, Controlled deposition of electrospun polyethylene oxide fibers. *Polymer*, vol. 42, pp. 8163-8170. 2001.

DELHOM C.D.A., WHITE-GHOORAHOO B. L.A., PANG S.S. Development and characterization of cellulose/clay nanocomposites. Department of Agriculture, Agricultural Research Service, New Orleans, LA 70124, USA. *Composites: Part B* 41 (2010) 475–481. 2009.

DEMIR, M. M., YILGOR, I., YILGOR, E. and ERMAN, B. Electrospinning of polyurethane fibers. *Polymer*. 43, pp. 3303-3309.2002.

DONG, G., XIAO, X., LIU, X., QIAN, B., MA Z., YE, S., CHEN, D., QIU, J. Preparation and characterization of Ag nanoparticle-embedded polymer electrospun nanofibers. *Journal Nanoparticles Research*, v.12, p.1319-1329, 2010.

DOSHI, J. AND D.H. RENEKER, "Electrospinning Process and Applications of Electrospun Fibers," vol. 35, pp. 151-160.1995.

DUEK, E.A.R.; BARBANTI S.H.; ZAVAGLIA,C.A.C. Polímeros Bioreabsorvíveis na Engenharia de Tecidos. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, Faculdade de Engenharia Mecânica, UNICAMP. Centro de Ciências Médicas e Biológicas, PUC-SP. vol. 15, n° 1, p. 13-21, 2005.

EL NUNZIO, M.J. Óleo de copaíba e seu emprego cosmético. *Aerosol e Cosméticos*, v.7, n.41, p.7-9, 1985.

FLEMING, R.R. Estrutura da fibra de poliacrilonitrila extrudada sob tratamento termo-oxidativo. *Instituto Tecnológico de Aeronáutica - ITA, São José dos Campos – SP*.

FONG, H., CHUN, I., RENEKER, D. H. Beaded nanofibers formed during electrospinning. *Polymer*. 40, pp. 4585-4592.1999.

FORMHALS, A. "Method and Apparatus for Spinning," 1944.

FORMHALS, A. Process and apparatus for preparing artificial threads. *US Patent*. 1,975,504.1934.

FRENOT, A., AND I.S. CHRONAKIS, "Polymer nanofibers assembled by electrospinning," *Science And Technology*, vol. 8, 2003, pp. 64-75.

GENG, X. Y.; KWON, O. H.; JANG, J. H. Electrospinning of chitosan dissolved in concentrated acetic acid solution. *Biomaterials*. Us National Library of Medicine, Republic Korea. 26(27), 5427–. 5432. 2005.

GIESBRECHT P.C.P.. Efeitos da pomada de óleo de copaíba em queimadura cutânea em rato. Universidade de Vila Velha-ES, 2011. Dissertação (mestrado).

GLAZER, A. N., NIKAIDO, H. *Microbial biotechnology: fundamentals of applied microbiology*. 2nd edition. Cambridge University Press, 2007.

GUPTA, P., C. ELKINS, T.E. LONG, AND G.L. WILKES, "Electrospinning of linear homopolymers of poly (methyl methacrylate): exploring relationships between fiber formation , viscosity , molecular weight and concentration in a good solvent," *Polymer*, vol. 46, pp. 4799-4810.2005.

HAAS, D., HEINRICH, S. AND GREIL, P. Solvent control of cellulose acetate nanofibre felt structure produced by electrospinning. *J Mater Sci*. 45:1299-1306. Springer, 2010.

HAMAD, W. On the development and applications of cellulosic nanofibrillar and nanocrystalline materials. *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, v. 84, p.513-519, 2006.

HAYASHI, T. Biodegradable Polymers for Biomedical Uses. *Progress in Polymer Science*, p.19 663-702. 1994.

HE, W., Z. MA, T. YONG, W. EONG, AND S. RAMAKRISHNA, "Fabrication of collagen-coated biodegradable polymer nanofiber mesh and its potential for endothelial cells growth," *Biomaterials*, vol. 26, pp. 7606-7615, 2005.

HEINZE, T., KOSCHELLA, A. Solvents Applied in the Field of Cellulose Chemistry – A Mini Review. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, v. 15, n. 2, p. 84-90, 2005.

HENRIKSSON, M., BERGLUND, L. A. Structure and properties of cellulose nanocomposite films containing melamine formaldehyde. *Journal of Polymer Science*, v. 106, p. 2817-2824, 2007.

HOLLINGER, J. O. & BATTISTONE, G. C. *Clin. Orthop. Relat. Res.*, 207, p.290, 1986.

HUANG, X. J., GE, D. AND XU, Z. K. Preparation and characterization of stable chitosan nanofibrous membrane for lipase immobilization. *Eur. Polym. J.* **43**, 2007. 3710-3718.

JAWOREK, A., AND A.T. SOBCZYK, "Electrospraying route to nanotechnology : An overview," *Journal of Electrostatics*, vol. 66, 2008, pp. 197-219.

JI, W.; SUN, Y.; YANG, F.; BEUCKEN, J.J.J.P.; FAN, M.; CHEN, Z. Bioactive Electrospun Scaffolds Delivering Growth Factors and Genes for Tissue Engineering Applications. *Expert Review. Springerlink*. DOI 10.1007/s11095-010-0320-6. P. 1261. 2011.

KALIA, S., KAITH, B. S., KAUR, I. *Cellulose fibers: bio- and nano- polymer composites*. Reading: Borges, J. P., Godinho, M. H., Figueirinhas, J. L., de Pinho, M. N., Belgacem, M. N. *Cap. 15: All-cellulose based composites*, Springer, 2011.

KAMEOKA, J., ORTH, R., YANG, Y., CZAPLEWSKI, D., MATHERS, R., COATES, G. and CRAIGHEAD. A scanning tip electrospinning source for deposition of oriented nanofibres. *Nanotechnology* 14, pp. 1124-1129. doi:10.1088/0957-4484/14/10/310. 2003.

KAPLAN, D. L. Introduction to Biopolymers from renewable resources. In: *Biopolymers from renewable resources*, Springer-Verlag,1-29. 1998.

KAPLAN, D. L. Introduction to Biopolymers from renewable resources. In: *Biopolymers from renewable resources*, Springer-Verlag,1-29. 1998.

KHANG, G.; KIM, M.S. AND LEE, H.B. Introduction: A Manual for Biomaterial-Scaffold Fabrication Technology. Site: www.worldscibooks.com. 2011.

KIM C., YUN W.Y., YANG S.C., YANG J.S. Patente: Comprising naturalplant extract or naturalplant essential oil and method for producing the same. WIPO Patent Application WO/2009/045042. Kind Code:A1. 2009.

KIM, K., YU, M., ZONG, X., CHIU, J., FANG, D., SEO, Y.S., HSIAO, B., CHU, B., HADJIARGYROU, M. Control of degradation rate and hydrophilicity in electrospun non-woven poly(D,L-lactide) nanofiber scaffolds for biomedical applications. *Biomaterials* 24:4977-4985.2003.

KOWALEWSKI, T.A. AND S. BARRAL, "Experiments and modelling of electrospinning process," *Bulletin Of The Polish Academy Of Sciences Technical Sciences*, vol. 53, 2005, pp. 385-394.

KRIEGEL C., KIT K. M., MCCLEMENTS D. J. AND WEISS J. Nanofibers as Carrier Systems for Antimicrobial Microemulsions. Part I: Fabrication and Characterization. *Langmuir*, v. 25, n. 2, 2009.

KUMBAR, S.G., NUKAVARAPU, S.P., JAMES, R., NAIR, L.S., LAURENCIN C.T. *Biomaterials*, 19:4100. 2008.

LANGER R, TIRRELL D.A. Designing materials for biology and medicine. *Nature*. P.428:487-492. 2004.

LARRONDO, L., AND J. MANLEY, "Electrostatic fiber spinning from polymer melts. II. Examination of the flow field in an electrically driven jet," *Part B. Polymer Physics*, vol. 19, pp. 921-932. 1981b.

LARRONDO, L., MANLEY R.S.J. Electrostatic Fiber Spinning from Polymer Melts. I. Experimental Observations on Fiber Formations and Properties. *J. Poly. Sci. Pol. Phys.* 19, pp.135-150. 1981a.

LE CONTE, P., Apontamentos sobre as sementes oleaginosas; Museu comercial do Pará, 3ª edição, 1927.

LIANG,J.I.; HSU, H.C.; NIEN, Y.H.; SU, F.C.; WU, H.W.; CHEN, J.P.; Yeh, M.L. Cell Response to Electrospun PVA and PVA/Chitosan Nanofibers. Institute of Biomed. Eng., Nat. Cheng Kung Univ. Taiwan, 2009.

LIAO, S.; LI, B.; MA,Z.; WEI, H.; CHAN C. AND RAMAKRISHNA, S. Biomimetic electrospun nanofibers for tissue regeneration. *Biom. Mater. 1. Institute of Physics Publishing* R45-R53. 2006.

LIN, T.; WANG, H. X.; WANG, H. M.; WANG, X. G. *Nanotechnology*, 15(9), 1375–1381. 2004.

LIU, H. AND Y. HSIEH, "Ultrafine Fibrous Cellulose Membranes from Electrospinning of Cellulose Acetate," *Polymer*, pp. 2119-2129. 2002.

LONG YU. "Biodegradable Polymer Blends and Composites from Renewable Resources". WILEY. 2009.

LOSCERTALES, I. G.; BARRERO, A.; GUERRERO, I.; CORTIJO, R.; MARQUEZ, M.; GANAN-CALVO, A. M. Micro/Nano Encapsulation via Electrified Coaxial Liquid Jets. *Science*, 295, 1695-1698. DOI: 10.1126/science.1067595. 2002.

LOTUFO LVC, CUNHA GM, FARIAS PA, VIANA GS, CUNHA KM, PESSOA C, MORAES MO, SILVEIRA ER, GRAMOSA NV & RAO VS. The cytotoxic and embryotoxic effects of kaurenoic acid, a diterpene isolated from *Copaifera langsdorffii* oleo-resin. *Toxicon* 40 (8): 1231-234.2002.

LUU, Y.K., KIM, K., HSIAO, B.S., CHU, B. AND HADJIARGYROU, M. Development of a nanostructured DNA delivery scaffold via electrospinning of PLGA and PLA-PEG block copolymers. *J. Control Release* 89:341-353.2003.

LYONS, J., KO, F. K. Nanofibers. *Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology*. Edited by H. S. Nalwa. American Scientific Publishers, v. 6, p. 727-738, 2004.

MACIEL, M.A.M.; PINTO, A.C. & VEIGA, V.E. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. *Química Nova* 23: 429-438.2002.

MACIEL, H.P.F.; GOUVEA, C.M.C.P.; PASTORE, G.M. Extração e caracterização parcial de peroxidase de folhas de *Copaifera langsdorffii* Desf.. *Ciênc. Tecnol. Aliment. Campinas*, 27(2): 221-225, abr.-jun. 2007

MALAFAIA O, CAMPOS ACL, TORRES O & GOLDENBERG S. Os fitoterápicos e seu potencial na cicatrização em cirurgia. *Acta Cirúrgica Brasileira*. 21: 1-2. 2006.

MANO, E.B. *Química Experimental de Polímeros*, São Paulo: Edgard Blucher, 2004.

MATSUI, M. “Correlações entre estrutura química, super-estrutura macromolecular e morfologia das blendas e redes poliméricas à base de quitina e poliuretano”. Universidade Federal do Paraná. 2007. Tese (Doutorado).

MATTHEWS JA, WNEK GE, SIMPSON DG, BOWLIN GL. Electrospinning of collagen nanofibers. *Biomacromolecules*;3: 232–238. 2002.

MENDONÇA, A.P.; FERRAZ, I.D.K. Óleo de andiroba: processo tradicional da extração, uso e aspectos sociais no estado do Amazonas, Brasil. *Vol. 37(3): 353 – 364. 2007.*

MIN B.M., YOU Y., KIM J.M., LEE S.J. and PARK W.H. Formation of nanostructured poly(lactic-co-glycolic acid)/chitin matrix and its cellular response to normal human keratinocytes and fibroblasts. *Carbohydrate Polymers*. Volume 57, Issue 3, 13, 285–292. 2004.

NATALIA, S. C. *et al.* *Revista Médica de Minas Gerais*; v.13, n.3, p.173-8, 2003.

NERURKAR N.L.; ELLIOTT D.M.; MAUCK RL. Mechanics of Oriented Electrospun Nanofibrous Scaffolds for Annulus Fibrosus Tissue Engineering. *Journal of Orthopaedic Research*, 25(8):1018-28. 2007.

NISHIYAMA, Y., LANGAN, P. AND CHANZY H. Crystal Structure and Hydrogen-Bonding System in Cellulose I β from Synchrotron X-ray and Neutron Fiber Diffraction. *J. Am. Chem. Soc.*, 2002, 124 (31), pp 9074–9082, DOI: 10.1021/ja0257319. 2002.

ODIAN, G. *Principles of polymerization*. New York: Wiley Interscience. 4th edition, 2004.

OH, S.H.; PARK, I.K.; KIM, J.M. LEE,J.H. In vitro and in vivo characteristics of PCL scaffolds with pore size gradient fabricated by a centrifugation method. *Biomaterials*. 28. 1664–1671. Korea. 2007.

OHKAWA, K., MINATO K., KUMAGAI, G., HAYASHI, S AND YAMAMOTO, H. Chitosan Nanofiber. *Biomacromolecules*, 3291-3294. Shinshu University, Japan. 2006.

OHKAWA, K., HAYASHI,S., NISHIDA,A., YAMAMOTO,H., and DUCREUX J. Preparation of Pure Cellulose Nanofiber via Electrospinning. *Textile Research Journal* 79: 1396. DOI: 10.1177/0040517508101455. 2009.

PAIVA LA, RAO VS, GRAMOSA NV & SILVEIRA ER. Gastroprotective effect of *Copaifera langsdorffii* oleo-resin on experimental gastric ulcer models in rats. *Journal of Ethnopharmacology* 62 (1): 73-78. 1998.

PAIVA LA, GURGEL LA, CAMPOS AR, SILVEIRA ER & RAO VS Attenuation of ischemia/reperfusion-induced intestinal injury by oleo-resin from *Copaifera langsdorffii* in rats. *Life Sciences* 75 (16): 1979-87.2004.

PAPENBURG, B.J.; S. SCHÜLLER □ RAVOO, L.A.M. BOLHUIS □ VERSTEEG, L. HARTSUIKER, D.W. GRIJPM, J. FEIJEN, M. WESSLING, D. STAMATIALIS, Designing Porosity and Topography of Poly(1,3□trimethylene carbonate) Scaffolds, *accepted for publication in Acta Biomaterialia.2011.*

PCI.ELETRÔNICA. *Imagem de circuito impresso eletrônico*. Disponível em: <<http://pci.eletronica.org/>>. Acesso em: 15 dezembro 2010.

PENN. Technology Available for Licensing Intellectual Property Office - The Pennsylvania State University.Non-Confidential Description - PSU No. 3266 “Engineered Cellulosic Materials and Devices”. Disponível em: <www.med.upenn.edu>. 2011.

PERES,C.M.; CURI,R. Como cultivar células. Guanabara Koogan. 2009.

PERINI,VILMA BORGES DE MOURA. *Análise do óleo essencial, produção de biomassa e fungitoxicidade do capim citronela (Cymbopogon nardus)*. Tocantins: Universidade Federal do Tocantins. Gurupi/TO. 2008. Dissertação (Mestrado).

PIERI, F.A.; MUSSI, M.C.; MOREIRA, M.A.S. Óleo de copaíba (*Copaifera sp.*): histórico, extração, aplicações industriais e propriedades medicinais. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v.11, n.4, p. 465-472, 2009.

POPAT, K. Progress in the use of Electrospinning Processing Techniques for Fabricating Nanofiber Scaffolds for Neural Applications. *Nanotechnology in Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. CRC Press Taylor & Francis Group.

PORTELA, P.M.D. *Montagem e Automatização de um Sistema de Electrospinning*. Portugal: Universidade do Minho. 2010. Dissertação (Mestrado).

RAMAKRISHNA, S., FUJIHARA, K., TEO, W.-E., LIM, T.-C., MA, L., MA., Z. *An Introduction to Electrospinning and Nanofibers*. World Scientific Publishers, Singapore, 2005.

RAMAKRISHNA, S. A review on electrospinning design and nanofibre assemblies. *Nanotechnology*, v. 17, p.R89-R106, 2006.

RAMOS, F.I., GOMES, D.S., SILVA, A.N., MORIMOTO, N.I. "Characterization of an Electrospinning Process using Different PAN/DMF Concentrations," *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, vol. 17, pp. 206-211.2007.

RATNER, B, HOFFMAN, A.; SCHOEN, F.; LEMONS, J. *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine. Second Edition*, University of Washington, Seattle. 2004.

RENEKER, D. H., CHUN, I. Nanometer diameter fibres of polymer, produced by electrospinning, *Nanotechnology*, v. 7, p. 216-223, 1996.

RENEKER, D. H., YARIN, A. L., FONG, H. and KOOMBHONGSE, S. Bending instability of electrically charged liquid jets of polymer solutions in electrospinning. *J. Appl. Phys.* 87, pp. 4531-4547.2000.

RHO KS, JEONG L, LEE G, SEO BM, PARK YJ, CHO JJ, PARKWH, MIN BM. Electrospinning of collagen nanofibers: Effects on the behavior of normal human keratinocytes and early-stage wound healing. *Biomaterials* 2006;27:1452–1461.

ROMERO, A. L., Contribuição ao conhecimento químico do óleo-resina de copaíba: configuração absoluta de terpenos. Universidade Estadual de Campinas, 2007. Dissertação (Mestrado).

ROSEN, S. L. *Fundamental Principles of Polymeric Materials*. USA, John Wiley & Sons, Inc., 1993.

ROWELL, R. M. Composite materials from biomass: a review of current practices, science, and technology. In: American Chemical Society, Washington DC. *Proceedings ACS Symposium Series*, Chapter 5, p.76-92, 2007.

RUBIRA, F. “Aplicações de Fibras Lignocelulósicas na Química de Polímeros e em Compósitos”. Universidade Estadual de Maringá-PR, Brasil. 2009.

SAITO T., NISHIYAMA Y., PUTAUX J. L., VIGNON M., ISOGAI A. Homogeneous suspensions of individualized microfibrils from TEMPO-catalyzed oxidation of native cellulose. *Biomacromolecules*, v. 7, p.1687–1691, 2006.

SALOMAO, R.; BITTENCOURT, L. R. M. and PANDOLFELLI, V. C.. Novos aditivos de secagem para concretos refratários: fibras poliméricas de alto desempenho. *Cerâmica* [online]. vol.52, n.321, pp. 31-36. ISSN 0366-6913.2006.

SANTOS JR, A.R.; WADA M.L.F. Polímeros Biorreabsorvíveis como Substrato para Cultura de Células e Engenharia Tecidual, *Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias*, UNESP-Jaboticabal, SP. Instituto de Biologia, Unicamp, SP.

SHANMUGASUNDARAM,S. Fabrication of nanofiber scaffolds by electrospinning and its potential for tissue engineering. *A Thesis Submitted to the Faculty of New Jersey Institute of Technology*. Biomedical Engineering Department of Biomedical Engineering January. 2004.

SHENOY, S. L., BATES, W. D., FRISCH, H. L. and WNEK, G. E. Role of chain entanglements on fiber formation during electrospinning of polymer solutions: good solvent, non-specific polymer-polymer interaction limit. *Polymer*. 46, 3372- 3384.2005.

SHI, D. Introduction to biomaterials. Tsinghua University Press; World Scientific, (Beijing, China : Singapore ; Hackensack, NJ :) Physical details: xiii, 253 p: ill.; 24 cm. ISBN: 7302108072; 9812566279.)2006.

SILVA J.J.L., GUIMARAES SB, SILVEIRA ER, VASCONCELOS PR, LIMA GG; TORRES SM & VASCONCELOS RC. Effects of *Copaifera langsdorffii* Desf. on

ischemia-reperfusion of randomized skin flaps in rats. *Aesthetic Plastic Surgery* 33 (1): 104-109.2009.

SILVER, F.H. *Biological Materials: Structure, Mechanical Properties, and Modeling of Soft Tissues*. New York: New York, University Press; 1987.

SIMÕES, C.M.O. *Farmacognosia da planta ao medicamento*, 821p, UFRGS/UFSC. Florianópolis, Porto Alegre, 1999.

SIRÓ, I., PLACKETT, D. Microfibrillated cellulose and new nanocomposite materials: a review. *Cellulose*, v.17, 459-494. 2010.

SON, W.K., YOUK, J.H., LEE, T.S. and PARK, W.H. Electrospinning of ultrafine cellulose acetate fibers: studies of a new solvent system and deacetylation of ultrafine cellulose acetate fibers, *J. Polym. Sci. Pt. B-Polym. Phys.* 42, pp. 5-11. 2004.

STANGER, J., N. TUCKER, AND M. STAIGER, "Electrospinning," *Macromolecules*, vol. 16, 2005.

STIX G. Little big science.Nanotechnology. *Sci Am*; 285:32–37.55.2000.

SUI, Z AND MURPHY, W.L. *Nanoscale Mechanisms for Assembly of Biomaterial*. University of Wisconsin-Madison, Springer, USA.2007.

SUNDARAY B, SUBRAMANIAN V, NATARAJAN TS, XIANG RZ, CHANG CC, FANN WS. Electrospinning of continuous aligned polymer fibers. *Appl Phys Lett*;2004;84:1222–1224. 2004.

TANIGUCHI, N. *On the Basic Concept of 'Nano-Technology'*. Proc. Intl. Conf. Prod. Eng. Tokyo, Part II, Japan Society of Precision Engineering, 1974.

TAPPIN, M. R. R.; MAZZEI, J.L.; RAMOS, M.F.S. Análise química quantitativa para a padronização do óleo de copaíba por cromatografia em fase gasosa de alta resolução. *Quím. Nova*. vol.27, n.2, pp. 236-240. ISSN 0100-4042. 2004.

TAYLOR, G. "Desintegration of Water Drops in an Electric Field," *Proceedings of the Royal Society of London. Series A. Mathematical and Physical Sciences*, vol. 280, pp. 383-397. 1964.

TAYLOR, L. *The Healing Power of Rainforest Herbs*. A Guide to Understanding and Using Herbal Medicinals. ISBN: 0-7570-0144-0.2005.

UPDEGRAFF, D. M. Semi-micro determination of cellulose in biological materials. *Analytical Biochemistry*, v. 32, p. 420-424, 1969.

VALDERRAMAS, A.C. Estudo da atividade anti-inflamatória de *Ricinus communis* (euphorbiaceae). 2006. 57p. Dissertação (mestrado em Biologia Oral-área de concentração Fisiologia Oral)-Universidade do Sagrado Coração. Bauru, São Paulo.

VASQUEZ, A. "Extraction of cellulose and preparation of nanocellulose from sisal fibers". *Revista Cellulose*. 2008.

VEIGA JUNIOR, V.F. PATITUCCI, M.L.; PINTO, A.C. Controle de autenticidade de óleos de copaíba comerciais por cromatografia gasosa de alta resolução. *Química nova*, v.28, n.3, p.519-28, 1997.

VEIGA JUNIOR, V.F.; PINTO, A.C. O Gênero *Copaifera L.* *Química nova*, v.25, n.2, p.273-86, 2002.

VENDRAMIN F.S.; FRANCO D.; NOGUEIRA C.M.; PEREIRA M.S.; FRANCO T.R. Plasma rico em plaquetas e fatores de crescimento: técnica de preparo e utilização em cirurgia plástica platelet-rich plasma and growth factors: processing technique and application in plastic surgery. *Rev. Col. Bras. Cir.* ECBC-RJ5 Vol. 33 - Nº 1, Jan. / Fev. 2006.

VENUGOPAL J, MA LL, RAMAKRISHNA S. Biocompatible nanofiber matrices for engineering dermal substitute for skin regeneration. *Tissue Eng* 2005;11:847-854.

VENUGOPAL J, ZHANG YZ, RAMAKRISHNA S. In vitro culture of human dermal fibroblasts on electrospun polycaprolactone collagen nanofibrous membrane. *Artif Organs*;30:438. 2006.

VENUGOPAL, J.; SHARON LOW, AW TAR CHOON, RAMAKRISHNA. S. Interaction of Cells and Nanofiber Scaffolds in Tissue Engineering. *Wiley InterScience* (www.interscience.wiley.com). DOI: 10.1002/jbm.b.30841. 2007.

VERT, M. Degradable and bioresorbable polymers in surgery and in phamacolog: Beliefs and facts. *J Mater Sci: Mater Med.* 20: 437-446. 2009.

VERT, M.; LI, M. S.; SPENLEHAUER, G. & GUERIN, P. – *J.Mater. Sci.*, 3, p.432. 1992.

WEST JL, HALAS NJ. Applications of nanotechnology to biotechnology commentary. *Curr Opin Biotechnol*;11:215–217.2000.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, Guidelines for the Assessment of Herbal Medicines, Munich, 28.6.1991, WHO, Geneva, 1991.

WILLERTH S.M. AND SAKIYAMA-ELBERT S.E.. Combining stem cells and biomaterial scaffolds for constructing tissues and cell delivery. *stembook.org*. Department of Biomedical Engineering, Washington University in St. Louis, St. Louis, MO 63130, USA. 2008.

WILLIAN, D. F. Definitions in Biomaterials. New York, *Elsevier*. 61p. 1987.

YANG F, MURUGAN R, WANG S, RAMAKRISHNA S. Electrospinning of nano/micro scale poly(L-lactic acid) aligned fibers and their potential in neural tissue engineering. *Biomaterials*;26:2603–2610.2005.

YUAN, X., ZHANG, Y., DONG, C. and SHENG, J. Morphology of ultrafine polysulfone fibers prepared by electrospinning. *Polym. Int. In Press*.2005.

ZELTINGER J, SHERWOOD JK, GRAHAM DA, MUELLER R, GRIFFITH LG.
Effect of pore size and void fraction on cellular adhesion, proliferation, and matrix deposition. *Tissue Engineering*;7(5):557-572.2001.

ZENG, J., XU, X., CHEN, X., LIANG, Q., BIAN, X., YANG, L. AND JING, X.
Biodegradable electrospun fibers from drug delivery, *J. Control. Release*, 92, pp.227-231. 2003.

ZHANG Y. Z., WANG X., FENG Y., LI J., LIM C. T., RAMAKRISHNA S.
Coaxial Electrospinning of (Fluorescein Isothiocyanate-Conjugated Bovine Serum Albumin)-Encapsulated Poly(ϵ -caprolactone) Nanofibers for Sustained Release. *Biomacromolecule*,7 (4), pp 1049–1057. **DOI:** 10.1021/bm050743i. 2006.

ZHANG, C. AND YUAN, X. Study on morphology of electrospun poly (vinyl alcohol) mats. *European Polymer Journal*, vol. 41, pp. 423-432. 2005.

ZHANG, Y.; HUANG, Z.-M.; XU, X.; LIM, C. T.; RAMAKRISHNA, S. *Chem. Mater.* 16, 3406-3409. 2004.

ZHANG, Y.Z., LIM, C.T., RAMAKRISHNA, S., HUANG, Z.M.. Recent development of polymer nanofibers for biomedical and biotechnological applications. *J Mater Sci Mater Med* 2005;16: 933–946. 2005.

ZHANG, YZ, VENUGOPAL J, HUANG Z.M., LIM CT, RAMAKRISHNA S.
Characterization of the surface biocompatibility of the electrospun PCL-Collagen nanofibers using fibroblasts. *Biomacromolecule*. 6:2583–2589. 2005.

ZHAO, S. L., WU, X. H., WANG, L. G. and HUANG, Y. Electrospinning of Ethyl-Cyanoethyl Cellulose/Tetrahydrofuran Solutions. *J. Appl. Polym. Sci.* 91, pp. 242-246. 2004.

ZHONG, X. H., KIM, K. S., FANG, D. F., RAN, S. F., HSIAO, B. S. AND CHU, B.
Structure and process relationship of Electrospun bioabsorbable nanofiber membranes. *Polymer*. 43, pp. 4403-4412.2002.

ZHU, X.; CUI,W.; LI, X.; JIN, Y. Electrospun Fibrous Mats with High Porosity as Potential Scaffolds for Skin Tissue Engineering. *Biomacromolecules*, 9, 1795–1801. 2008.