

UNESP – Universidade Estadual Paulista
Campus de Araraquara
Trabalho de conclusão de curso

Thais Silva do Amaral

**Nanocompósitos multifuncionais de fibroína reforçados com
biocelulose**

Thais Silva do Amaral

Nanocompósitos multifuncionais de fibroína reforçados com biocelulose

Monografia apresentada ao Instituto de
Química, Universidade Estadual Paulista,
como parte dos requisitos para obtenção do
título de Bacharel em Química.

Orientador: Prof. Dr. Sidney José Lima Ribeiro
Coorientador: Dr. Hernane Barud

**Araraquara
2013**

Dedicatória

A todos que acreditam que a ciência pode transformar e melhorar a vida dos seres humanos.

Agradecimentos

Aos meus pais Maria Ângela e Marco Antônio, que sempre apoiaram meus sonhos e acreditaram no meu potencial.

Aos meus amigos de faculdade, em especial, Gabi e Dexter, antigos amigos do coração e amigos que fiz durante o intercâmbio, que me ajudaram nas horas difíceis e transformaram o período da faculdade em um momento de risadas e alegria.

Ao meu namorado, companheiro de aventuras, Irã, que manteve minha curiosidade pela ciência, me inspirou e me disse palavras de otimismo e força quando o mundo parecia difícil.

Ao entusiasta da ciência, Doutor Hernane Barud, por todo o entusiasmo, atenção, puxões de orelha, e o grande aprendizado que me proporcionou.

Ao Professor Doutor Sidney José Lima Ribeiro, pela oportunidade de trabalhar em seu grupo.

A todos que de alguma forma contribuíram para a minha formação acadêmica e pessoal.

Resumo

Este trabalho apresenta a preparação e caracterização de novos nanocompósitos baseados em fibroína e biocelulose. A celulose bacteriana (CB) é um exopolissacarídeo produzido por bactérias do gênero *Gluconacetobacter*, que possui estrutura química idêntica a celulose vegetal e tem ganhado atenção no campo de pesquisa por suas propriedades únicas como, excelente propriedade mecânica quando seca e hidratada, maior capacidade de retenção de água, moldabilidade, biodegradabilidade e excelente afinidade biológica. A fibroína, uma proteína estrutural presente no casulo do bicho da seda, *Bombyx mori* tem sido usada no desenvolvimento de dispositivos ópticos, como scaffolds na engenharia de tecidos, para imobilização de enzimas, agente de liberação controlada de drogas. Foram preparados filmes de fibroína agregando-se diferentes cargas de CB, 0,5%, 1,0%, 1,5%, 2,5%, 5,0% e 10,0% em massa/massa. Ensaio mecânicos e de permeação ao vapor usando como de Payne água mostraram que o nanocompósito Fb/CB 1% apresentam os resultados mais promissores. A adição de polietilenoglicol (PEG) a fibroína permite a obtenção de filmes com excelentes propriedades ópticas e com propriedades mecânicas superiores ao filme de fibroína. Os novos nanocompósitos multifuncionais baseados em fibroína/celulose/PEG poderão ser aplicados na Medicina, como para embalagens biodegradáveis e substratos flexíveis para OLEDs.

Palavras- chave: Fibroína da seda, celulose bacteriana, nanocompósitos multifuncionais.

Abstract

This work shows the preparation and characterization of the new nanocomposites based on fibroin and biocellulose. Bacterial cellulose (BC) is an exopolysaccharide produced by bacteria of the genus *Gluconacetobacter*, which it has identical chemical structure of the cellulose from plants and it has gained attention in the field of research for its unique properties as excellent mechanical properties when dry and hydrated , higher capacity of water retention, moldability , biodegradability and excellent biological affinity . Silk fibroin (SF) is a structural protein present in the cocoon of the silkworm, *Bombyx mori*, has been identified as suitable for developing optical devices, tissue engineering application, enzyme immobilization, controlled release drug agent biopolymer. Silk fibroin/bacterial cellulose nanocomposite films were prepared impregnating different cellulose charges (0.5 %, 1.0 %, 1.5 %, 2.5 %, 5.0 % and 10.0 %) weight/weight. According mechanical tests and water and Paynes's cup permeability showed that SF/BC 1% nanocomposite has the most relevant results. Polyethyleneglicol (PEG) containing SF films improved optical and mechanical properties when compared to pristine SF film. New SF/BC nanocomposites could be applied in Medicine, as biodegradable packaging and flexible substrates for OLEDs

Keywords: Silk fibroin, bacterial cellulose, multifunctional nanocomposites.

Índice de figuras

Figura 1: Unidade estrutural da celulose.....	9
Figura 2: Principais partes de uma fibra de algodão..	10
Figura 3: MET de bactérias <i>G. xylinus</i> excretando fibrilas de celulose..	11
Figura 4: Membrana de celulose bacteriana intumescida.	12
Figura 5: Casulos do bicho da seda <i>Bombyx mori</i>	15
Figura 6: Copo de Payne para as medidas de transporte de vapor de água.	21
Figura 7: Representação teórica da variação da massa perdida (Δm) em função do tempo (t) para uma amostra qualquer	22
Figura 8: Filmes de fibroína com fibras de CB utilizadas como reforço em diferentes proporções.	23
Figura 9: Filme de fibroína.....	23
Figura 10: Transparência do filme de fibroína com 5,0% de fibras de CB, rente e afastado da superfície.	24
Figura 11: Gráfico de transmissão óptica para os filmes.	25
Figura 12: Imagens de MEV da superfície da a) CB e b) Fibroína.....	26
Figura 13: Imagens de MEV da seção transversal da a) Fb, e b) CB.....	26
Figura 14: Imagens por MEV da superfície dos compósitos de Fb/CB.....	27
Figura 15: Seção transversal Fb/CB.....	27
Figura 16: Difratoograma de raios-X para as amostras.	28
Figura 17: FT-IR dos nanocompósitos.....	29
Figura 18: Curvas TG/DTG para as amostras CB, Fb, Fb/CB 0,5% e Fb/CB 5,0%.	31
Figura 19: DSC dos filmes de CB, Fb, Fb-CB 0,5% e Fb-CB 5,0%.	32
Figura 20: Deformação, Módulo de Young e Tensão para os nanocompósitos.	33
Figura 21: Permeabilidade dos filmes Fb e Fb/CB 1%.	34
Figura 22: Filmes de fibroína com 30% de PEG, com diferentes MM (g/mol).....	35
Figura 23: Transparência do filme de fibroína com PEG 200 g/mol, rente e afastado da superfície.	35
Figura 24: Gráfico de transmissão óptica para os filmes.	36
Figura 25: Difratoograma de raios-X para as amostras Fb- PEG.	37
Figura 26: Espectro de infravermelho para os nanocompósitos com polietileno glicol.	38
Figura 27: Curvas TG/DTG para as amostras Fb - PEG 200, Fb - PEG 400, Fb - PEG 600.	39
Figura 28: DSC dos filmes de Fb, Fb - PEG 200, Fb - PEG 400 e Fb - PEG 600.....	41
Figura 29: Deformação, Módulo de Young e Tensão para os filmes de Fb e PEG.	42
Figura 30: Permeabilidade ao vapor de água para compósitos contendo PEG e CB 1%	44
Figura 31: Deformação, tensão e módulo de Young para os nanocompósitos e o filme ternário.....	45

Índice de tabelas

Tabela 1: Espessura dos compósitos Fb/CB.....	18
Tabela 2: Espessura dos compósitos Fb – PEG.	19
Tabela 3: Perda de massa dos filmes em água.	42

Sumário

- 1- Introdução**
 - 1.1 – Celulose**
 - 1.2 – Biocelulose ou Celulose Bacteriana**
 - 1.3 - Nanocompósitos a base de celulose**
 - 1.4 – Fibroína**
- 2– Objetivos**
- 3– Materiais e métodos**
 - 3.1- Preparação das membranas de celulose bacteriana**
 - 3.2- Extração da fibroína**
 - 3.3-Produção dos nanocompósitos de CB/fibroína**
 - 3.4- Produção dos nanocompósitos de Fb/PEG**
- 4-Resultados e discussões**
 - 4.1-Caracterização dos nanocompósitos de Fb/CB**
 - 4.1.1-Caracterização óptica**
 - 4.1.2-Caracterização morfológica**
 - 4.1.3-Característica estrutural**
 - 4.1.4-Caracterização térmica**
 - 4.1.5-Ensaio mecânico**
 - 4.1.6- Ensaio de permeação ao vapor de água**
 - 4.2-Caracterização dos nanocompósitos de Fb/PEG**
 - 4.2.1-Caracterização óptica**
 - 4.2.2-Característica estrutural**
 - 4.2.3-Caracterização térmica**
 - 4.2.4-Ensaio mecânico**
 - 4.1.6- Ensaio de permeação ao vapor de água**
 - 4.1.7-Caracterização mecânica em relação ao nanocompósito ternário**
- 5-Conclusão**
- 6-Referências**

1. Introdução

1.1-Celulose

A celulose é o biopolímero de maior abundância na Terra, que pode ser encontrado como constituinte básico das paredes de todas as plantas terrestres e marinhas. É provavelmente o único polímero natural que é encontrado em quase todas as condições ambientais imagináveis [1]. Também é sintetizada por organismos como bactérias, fungos e por animais, como os tunicados.

A celulose é encontrada em plantas como microfibrilas de 2-20 nm de diâmetro e de 100 - 40000 nm de comprimento. As fibras de algodão contêm cerca de 98% de celulose enquanto a madeira apresenta uma porcentagem de 40-50% de celulose [2]. São complexos de carboidratos, representados pela fórmula empírica: $(C_6H_{10}O_5)_n$, idêntica à do amido, com a qual tem diversas analogias químicas, bem como correlações fisiológicas.

A celulose é um polímero de cadeia longa com unidades de repetição de D-glicose, um açúcar simples. Ao longo da cadeia as unidades de glicose estão organizadas em anéis de 6 membros, chamadas piranoses. As unidades estão ligadas por átomos de oxigênio, chamada ligação acetal, entre o C-1 de um anel e do C-4 do próximo anel. Sua unidade estrutural está representada na fig.1.

A estereoquímica das ligações acetal é de extrema importância. A configuração típica da celulose é a configuração β , com todos os grupos funcionais em posições equatoriais. Essa é uma das características que faz com que ela seja um bom polímero formador de fibras.

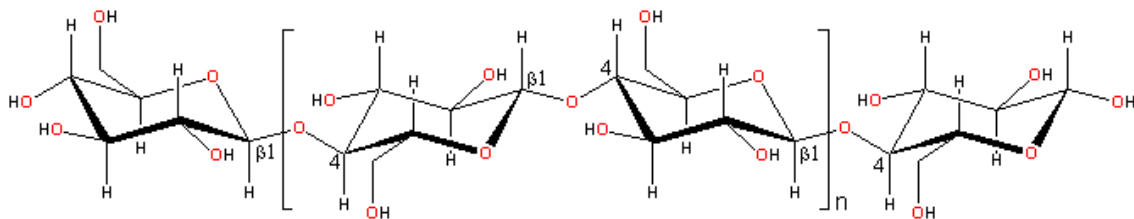


Figura 1: Unidade estrutural da celulose. Extraída de [3]

Por causa de suas propriedades poliméricas não convencionais a celulose é um material único, para uso em materiais de armazenamento de informações a materiais para a conservação de energia.

Celulose provinda de diferentes fontes pode variar em peso molecular, grau de polimerização, e estruturas morfológicas, sendo que os métodos e processos de isolamento e

purificação de celulose de diferentes fontes podem mudar todas as propriedades naturais da celulose com exceção da estrutura organoquímica básica [1].

A complexidade de uma fibra de algodão é indicada na figura 2. Cada fibra é composta por camadas concêntricas. A parede primária, a camada periférica da fibra, é composta de fibrilas celulósicas cristalinas [4]. A parede secundária é constituída de três camadas, representadas na figura por S1, S2 e S3. A maior parte da celulose contida na fibra se encontra na parede secundária, depositadas em camadas sucessivas durante o desenvolvimento da fibra.

A parte interna da fibra, o lúmen, é composta de resíduos celulares [1].

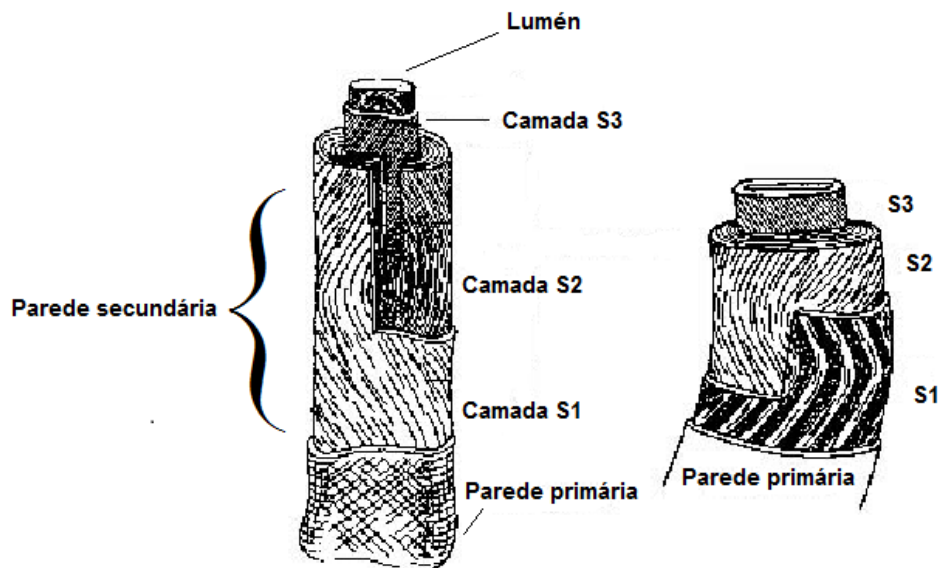


Figura 2: Principais partes de uma fibra de algodão. Extraído de [1].

A celulose além de ser usada na produção de papel e na indústria têxtil, tem muitas outras aplicações como: antiaglomerante, emulsificante, agente de dispersão, espessante e agente de gelificação.

A ocorrência primária de celulose é de materiais lignocelulósicos em florestas, sendo a madeira a fonte mais importante, além de ser a fonte mais abundante.

Outros materiais que contém celulose são gramíneas, algas (que contém celulose em sua parede celular), e outros tipos de fibras, como por exemplo, o algodão que é muito utilizado na indústria têxtil [5].

A celulose também pode ser obtida por animais marinhos, como os tunicados, conhecidos como os únicos animais que produzem microfibrilas de celulose, incorporadas em uma matriz proteica [6].

Uma nova abordagem para a obtenção de celulose tem ganhado bastante interesse em escala laboratorial e industrial, a produção de celulose por meio de cultivos de bactérias como as do gênero *Gluconacetobacter*.

1.2-Celulose bacteriana

A celulose bacteriana (CB) é um exopolissacarídeo produzido por várias espécies de bactérias do gênero *Gluconacetobacter*, que possui estrutura química idêntica a celulose vegetal, porém o polissacarídeo secretado é livre de lignina, pectina e hemiceluloses [7].

A bactéria *Acetobacter xylinum* (*Gluconacetobacter xylinus*) é uma bactéria gram-negativa, não patogênica, aeróbica, pertencente à família *Acetobacteraceae* [8], capaz de converter glicose, glicerol e outros substratos orgânicos em celulose em poucos dias, como um meio de crescer em contato com o rico oxigênio na superfície do ambiente.

A célula da bactéria *G. xylinus* apresenta 100 ou mais poros na membrana celular para a extrusão de celulose. Cada poro produz uma cadeia de celulose, que outros grupos com 36 cadeias formam uma fibrila elementar, que tem um diâmetro de aproximadamente 3,5 nm. Cerca de 46 fibrilas formam uma fita (Fig. 3). Estas fitas ficam emaranhadas com as outras fibras dispersas no meio de cultura, formando assim uma película gelatinosa na superfície do meio de cultura líquido. A espessura da membrana depende do tempo de cultivo e, geralmente, pode chegar a 1 ou 2 centímetros [9].

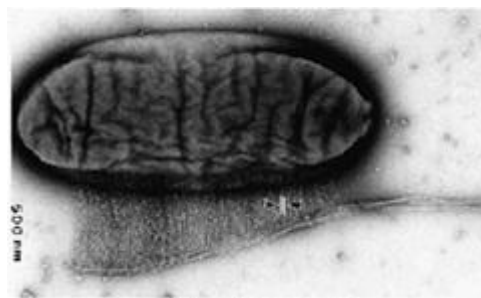


Figura 3: MET de bactérias *G. xylinus* excretando fibrilas de celulose. Extraído de [10].

A bactéria do gênero *Gluconacetobacter* produz uma forma extremamente pura de celulose bacteriana, por não conter lignina e hemicelulose. É sintetizada na forma de uma membrana gelatinosa, semi-transparente, intumescida (figura 4) com cerca de 99% de água [11].

O primeiro relato da produção de celulose bacteriana foi data de 1886 por Brown, que identificou um filme gelatinoso formado na superfície de um caldo de fermentação [12].



Figura 4: Membrana de celulose bacteriana intumescida.

Ao contrário da celulose provinda de plantas que possui cristalinidade entre 50-60%, a biocelulose possui cerca de 80% de cristalinidade. Essa cristalinidade faz com que a CB tenha possua propriedades mecânicas superiores a celulose vegetal.

A CB tem ganhado atenção no desenvolvimento de novos materiais por suas características únicas como, excelente propriedade mecânica quando seca e hidratada, porosidade, elevada capacidade de retenção de água, moldabilidade, biodegradabilidade e excelente biocompatibilidade [13].

Ela se diferencia da celulose das plantas por possuir resistência mecânica a tração quando está na sua forma úmida, maior capacidade de retenção de água, sendo assim adequada para a utilização como diafragma de alto falantes, papel para alimentos, indústria têxtil, pele artificial, curativos para queimaduras, aplicações biomédicas, reforço de compósitos, dentre outras aplicações [14].

Atualmente devido à demanda de materiais fibrosos, escassez de biomassa de madeira e a preocupação com o meio ambiente, a celulose bacteriana tornou-se uma das fontes mais promissoras de novas alternativas para materiais fibrosos do século 21.

1.4-Nanocompósitos a base de celulose bacteriana

A base da nanotecnologia é a criação e utilização de materiais e dispositivos em nível atômico, molecular, e estruturas supramoleculares, na exploração de propriedades únicas de materiais com tamanho variando de 1 a 100 nanômetros [15].

Um compósito consiste da junção de dois ou mais constituintes, que são mecânica e fisicamente distintos. Um dos constituintes é disperso em outro, então o novo material apresenta propriedades superiores quando comparado com os componentes de forma individual [16].

Os compósitos podem ser reforçados com partículas de dimensões de μm , mm e nm. Quando as partículas de reforço estão em escala nanométricas, os compósitos são denominados nanocompósitos.

Os nanocompósitos poliméricos são produzidos a partir da incorporação de materiais nanométricos em uma matriz polimérica.

Nanocompósitos melhoram a rigidez, a dureza, a força, estabilidade térmica e propriedades de barreira de um polímero, quando comparado com este puro [17].

Materiais baseados em nanocompósitos e nanofibras ganharam destaque devido á mudança notável em suas propriedades. Esses materiais tem uma gama de aplicações, incluindo sensores flexíveis, displays, polímeros resistentes, dispositivos ópticos, reconstituição de tecidos, entre várias outras aplicações tecnológicas e médicas [18].

A união da nanotecnologia com a biologia tornou-se uma realidade. A subcategoria de compósitos é altamente atrativa porque é visto como uma ponte entre aplicações comuns e novas. A sinergia e a melhoria nas propriedades de novos materiais, baseados na combinação de certos componentes, faz desta área atrativa para a pesquisa [19].

Recentemente, os nanocompósitos baseados em celulose tem sido uma nova categoria de nanomateriais com elevado grau de homogeneidade e pureza, em nível molecular e com extraordinárias propriedades físicas e químicas [19].

A celulose bacteriana é ideal para ser utilizada como fibras de reforço em compósitos, pois possui alta hidrofiliabilidade, além de ser um polímero biocompatível natural.

A celulose bacteriana tem ótimas propriedades mecânicas, como elevada resistência á tração (2 GPa) e elevado módulo de Young (138 GPa).

Diversos nanocompósitos a base de biocelulose tem sido desenvolvidos nos últimos anos.

Saska et al, desenvolveram nanocompósitos baseados em celulose bacteriana e hidroxiapatita. Os estudos *in vivo* revelaram que os nanocompósitos podem ser aplicados na regeneração tecidual e óssea [20].

Barud et al, prepararam e caracterizaram nanocompósitos baseados em prata e CB, que exibiram alta atividade antimicrobiana contra bactérias gram negativas (*Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*) e gram positivas (*Staphylococcus aureus*) [21].

Outros trabalhos destacam a utilização da CB como reforço em nanocompósitos.

Trovatti et al, estudaram bionanocompósitos baseados em CB e pululano. A celulose foi incorporada em diferentes concentrações ao pululano. O resultado obtido foi o aumento considerável das propriedades mecânicas e estabilidade térmica dos filmes de nanocompósitos devido a excelente compatibilidade entre os dois polímeros [22].

Novos nanocompósitos verdes baseados em quitosana e reforçados com CB foram preparados e caracterizados por Fernandes et al. Os resultados mostraram que o compósito obtido possui transparência, flexibilidade e propriedades mecânicas melhores do que os filmes puros de quitosana [23].

Nesse projeto, membranas de CB produzidas pelo cultivo estático de bactérias *Acetobacter* serão utilizadas como reforço na obtenção de filmes auto-suportáveis de fibroína.

1.3-Fibroína

As fibras da seda produzida por insetos e aranhas são fibras que tem excelentes propriedades mecânicas. Muitos tipos de seda foram caracterizados, como a seda fibrosa do casulo do bicho da seda, *Bombyx mori*, que possui duas proteínas estruturais: fibroína, responsável pela elasticidade da seda e sericina, que é responsável por manter unida a fibra na formação do casulo (fig.5) [24].



Figura 5: Casulos do bicho da seda *Bombyx mori*

Fibroína da seda é a uma proteína constituinte das fibras da seda, isolada das fibras dos casulos dos bichos da seda *Bombyx mori* (*B. mori*). Trata-se de uma proteína insolúvel contendo 90% dos aminoácidos: glicina, alanina, e serina, que tendem a formar β folhas cristalinas em fibras da seda [25].

Dois modelos estruturais principais estão presentes na fibroína da seda. Sendo eles a conformação primária e secundária. A conformação primária é o complexo hélice dominante existente dentro da glândula do bicho da seda antes de ele expelir a seda. A estrutura secundária é a conformação antiparalela de β folhas, insolúvel e cristalizada, que se forma após a fiação das fibras de seda pelo bicho da seda [26].

A fibroína geralmente passa por um processo de degumação, onde ela é separada da sericina, antes de ser utilizada [27].

A solução de fibroína tem sido usada para preparar materiais multifuncionais, por exemplo: filmes finos, scaffolds 3D, hidrogéis, lentes de contato, materiais de reconstituição tecidual, esponjas, etc [28].

Filmes de fibroína com espessura entre 20 e 100 nm foram utilizados no desenvolvimento de dispositivos ópticos. Os filmes possuíam conformação de β folhas que confere boas propriedades ópticas, além de possuir uma superfície livre de rugosidades e transparente [29].

Um dos limitantes da aplicação das membranas de fibroína se deve a baixa propriedade mecânica dos filmes.

Nesse sentido, novos estudos estão sendo realizados com objetivo de melhorar as propriedades mecânicas desses filmes [30].

No trabalho de Yasutomo Noishiki et al, a fibroína foi reforçada com celulose microcristalina. Houve um aumento significativo nas propriedades mecânicas em função do teor de celulose microcristalina adicionado aos compósitos [31].

Rongji Li et al, desenvolveram filmes flexíveis provenientes de uma mistura de solução de fibroína da seda, polietileno glicol e nanocristais de celulose. As propriedades de resistência a tração melhoraram significativamente em relação ao filme de fibroína puro devido a boa interação entre os componentes utilizados [29].

Por ser um polímero natural e um material biodegradável e biocompatível, a fibroína tem sido investigada para uso em engenharia de tecidos, imobilização de enzimas, agente de liberação controlada de drogas, regeneração tecidual, marcadores biológicos, polímeros biodegradáveis, etc [32].

Nesse projeto almeja-se obter nanocompósitos a partir de solução de fibroína extraídas reforçados com biocelulose. A adição de plastificantes também será considerada.

Os compósitos serão caracterizados e poderão ser aplicados na opto-eletrônica (substratos flexíveis para OLEDs), na medicina (tratamento de feridas, lentes terapêuticas, scaffolds) e na indústria de alimentos (embalagens ativas).

2. Objetivos

O objetivo principal deste trabalho é a síntese de nanocompósitos multifuncionais baseados em fibroína e biocelulose.

2.1- Objetivos secundários:

- 2.1.1- Preparação da Biocelulose,
- 2.1.2 - Obtenção da fibroína,
- 2.1.3- Estudo da influência da carga de biocelulose como reforço.
- 2.1.4- Avaliação da influência do plastificante.

3. Metodologia

- **3.1-Preparação das membranas de celulose bacteriana.**

As amostras de celulose bacteriana hidratadas foram preparadas no Laboratório de Materiais Fotônicos.

O cultivo da bactéria *G. xylinus* foi realizado em erlenmeyers de 500 ml com tempo de cultivo de 96 horas a 28°C. O meio de cultura utilizado apresentava a seguinte composição básica: glicose 5% (m/v), extrato de levedura 0,4%, hidrogenofosfato de potássio 0,2% (m/v), sulfato de magnésio 0,073% (m/v) e etanol 2% (m/v). Após 69 horas em estufa a 28°C, obteve-se mantas de CB altamente hidratadas com espessura média de 4 mm.

Os hidrogéis de CB foram submetidos a um tratamento com solução de NaOH 1% (m/v) a temperatura de 70°C para remoção das bactérias.

- **3.2-Extração da fibroína**

Casulos de bichos da seda *B. mori* cedidos por Fiação Bratac com sede em Bastos-SP, foram picados e posteriormente fervidos por 30 minutos em uma solução de 0.02M Na₂CO₃ e foram lavados com água deionizada sob agitação por 3 vezes durante 20 minutos, para a remoção da sericina. As fibras foram colocadas em estufa a 37°C durante 24 horas até a secagem das mesmas.

A seda extraída foi dissolvida com uma solução de CaCl₂.2H₂O: Etanol:H₂O, e colocada em banho Maria até 85°C, até a dissolução total.

Após este procedimento a solução de fibroína foi colocada em tubos para diálise que foram mergulhados em água deionizada. Foram realizadas trocas sucessivas de água com intervalo de 1 hora na primeira troca e 4 horas para as demais trocas durante um período de 72 horas.

Após a diálise a solução de fibroína foi submetida a dois processos centrifugação, a 20.000 rpm por 30 min a 5°C, para a remoção das impurezas.

- **3.3-Produção dos nanocompósitos de fibroína/CB**

As membranas de CB hidratadas foram trituradas em um Dispensor IKA ULTRA TURRAX T18 Basic durante 5 minutos e o procedimento foi repetido três vezes para a obtenção de fibras em tamanho nanométrico.

As fibras de CB obtidas foram pesadas de forma que ao serem colocadas em contato com a solução de fibroína elas estivessem nas seguintes porcentagens da massa total dos filmes: 0,5%, 1,0%, 1,5%, 2,5%, 5,0% e 10,0%.

As fibras pesadas foram colocadas em contato com a solução de fibroína previamente dialisada, e a solução foi homogeneizada em um agitador magnético por 3 minutos.

A solução obtida continha bolhas devido a viscosidade da fibroína, então as soluções preparadas foram colocadas em uma estufa á vácuo para a remoção das bolhas de ar a temperatura ambiente.

Após este procedimento, verteu-se cada solução em uma placa de petri de poliestireno, e foram colocadas em uma estufa a temperatura ambiente com circulação de ar.

Após 72 horas os filmes foram formados por *casting*, onde a água, que era o solvente evaporou. As espessuras dos filmes obtidos estão na tabela 1:

Tabela 1: Espessura dos compósitos Fb/CB.

Carga de CB (%)	Espessura (mm)
0,0	0,07 ± 0,01
0,5	0,13 ± 0,02
1,0	0,24 ± 0,07
1,5	0,20 ± 0,03
2,5	0,17 ± 0,02
5,0	0,19 ± 0,02
10,0	0,36 ± 0,08

• **3.4-Produção dos nanocompósitos de fibroína/PEG**

Para a produção dos nanocompósitos de fibroína/PEG, os PEGs com as seguintes massas molares foram utilizados: 200, 300, 400, 600, 1000 e 6000 g/mol.

Os PEGs foram adicionados de modo que estivessem presentes como 30% em massa no filme.

Os PEGs foram pesados, e colocados em contato com a solução de fibroína e posteriormente homogeneizados em um agitador magnético.

As bolhas formadas foram removidas com o auxílio de uma estufa a vácuo, e a solução final foi vertida em placas de poliestireno.

Os filmes foram secos por *casting*, em estufa a temperatura ambiente com circulação de ar.

Na tabela 2, estão as espessuras obtidas para os filmes, utilizando 25 mL de fibroína como matriz e reforçados com 30% de PEG de diferentes massas molares.

Tabela 2: Espessura dos compósitos Fb – PEG.

Massa molar PEG (g/mol)	Espessura (mm)
200	0,12 ± 0,04
300	0,10 ± 0,05
400	0,23 ± 0,06
600	0,07 ± 0,04
1000	0,15 ± 0,02
6000	0,15 ± 0,06

3.5-Métodos de análise

a) Medida de espessura dos filmes

As medidas de espessura dos filmes de Fb/CB e Fb/PEG foram realizadas com um paquímetro digital Mitutoyo.

A espessura foi tomada de diferentes regiões do filme, a fim de tornar homogêneas as medidas no caso de imperfeições. Portanto a espessura é dada como a média dos valores medidos.

b) Medidas de perda de massa em água

Os filmes foram cortados em quadrados de 1cm^2 , e colocados em 10 mL de água para avaliar a perda de massa gradual das amostras.

Os sistemas foram incubados em uma estufa a $37\text{ }^\circ\text{C}$ por 30 dias, e a cada três dias os filmes eram secos, pesados e recolocados na água.

As medidas foram feitas cinco vezes para cada filme, e os resultados obtidos são resultado de uma média dos valores obtidos.

c) Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A morfologia da superfície dos filmes foi analisada utilizando um microscópio de varredura de alta resolução FEG-MEV da marca JEOL modelo 7500F, localizado no Laboratório de microscopia avançada do IQ/Unesp-Araraquara.

O recobrimento de ouro foi utilizado nas amostras.

d) Espectroscopia eletrônica na região do UV/Vis

Os espectros de transmissão dos filmes foi feita em um espectrofotômetro de feixe duplo UV/VIS/NIR, Perkin Elmer Lambda 1050 com esfera integradora, localizado IQ/Unesp-Araraquara.

Os dados de transmitância foram obtidos com uma faixa espectral de 0 a 800 nm.

e) Microscopia de força atômica

Os difratogramas de raios-X dos filmes foram obtidos utilizando-se o equipamento SIEMENS modelo D5000, DIFFRAC PLUS XRD Commander. As amostras foram afixadas em um suporte de vidro.

f) Espectroscopia vibracional na região do infravermelho

Os espectros de FT-IR foram obtidos no espectrômetro FT-IR, modelo Spectrum 2000 da Perkin Elmer . As amostras foram trituradas e maceradas com KBr para a montagem da pastilha utilizada nas medidas.

g) Análise termogravimétrica

As curvas TG/DTG foram realizadas em um equipamento Universal V3.9A TA Instruments. O gás utilizado foi nitrogênio, razão de aquecimento de 10 °C por minuto, onde o intervalo de temperatura foi 25 – 600 °C.

As curvas de DSC foram feitas no DSC TA Instruments, 2910.

Em ambas as medidas um cadinho de alumínio foi utilizado como referência.

h) Ensaio mecânicos

As medidas de tensão, deformação e módulo de Young das amostras foram feitas em um DMA Q800, localizado no departamento de química da UFU- Uberlândia-MG.

Cada amostra foi cortada e a medida feita cerca de 5 vezes. Os dados obtidos são resultado da média das medidas.

i) Ensaio de permeação ao vapor de água

As medidas de permeação dos filmes foram feitos utilizando o teste do copo de Payne, em triplicata.

Os filmes foram recortados em círculos com o diâmetro de 3,0 cm, e selados na extremidade de um copo, Copo de Payne, que está representado na figura 6:

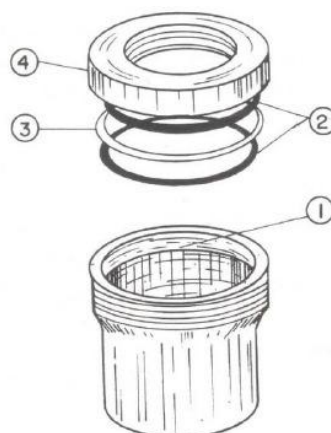


Figura 6: Célula de pesagem (Copo de Payne) para as medidas de transporte de vapor de água. 1) borda interna para selagem do filme polimérico; 2) anéis de borracha; 3) anel de alumínio; 4) tampa do copo. Extraído de [33].

No copo foi colocado 25 mL de água destilada, o filme e os anéis de vedação mostrados no esquema. Os copos foram colocados em um dissecador contendo pentóxido de fósforo, que gera um gradiente de pressão, permitindo a permeação do vapor de água através do filme. Foram pesados em intervalos de tempo durante 72 horas, e uma curva da perda de massa do material versus o tempo das pesagens foi traçada.

A figura 7 mostra uma curva ilustrativa do procedimento, onde o estado de transição mostra uma perda de massa não constante, e o estado estacionário uma perda de massa com comportamento constante.

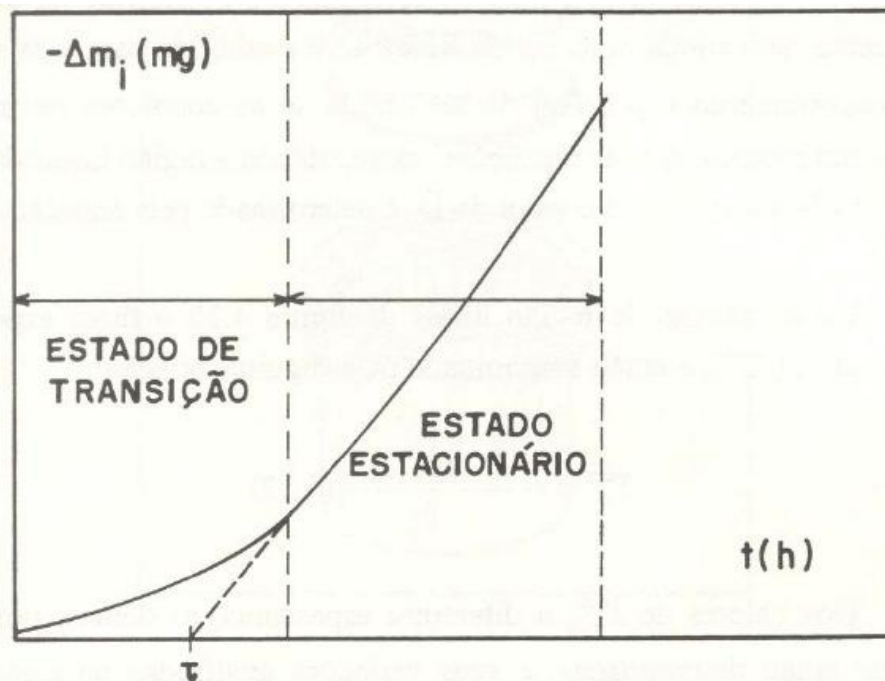


Figura 7: Representação teórica da variação da massa perdida (Δm) em função do tempo (t) para uma amostra qualquer. Extraído de [33].

Utilizando a equação 1, onde obtém-se o fluxo:

$$\frac{\Delta m}{\Delta t} \cdot \frac{1}{A} = J$$

Onde $\Delta m/\Delta t$ é o coeficiente angular da reta, e A a área do filme exposta ao vapor de água.

Na equação 2, o fluxo está relacionado a permeabilidade em relação ao vapor de água.

$$J = PH \frac{[\Delta P_v(T)]}{RTL}$$

Onde novamente J é o fluxo, PH é a permeabilidade do material em relação ao vapor d'água, $\Delta P_v(T)$ é a diferença de pressão de vapor em uma dada temperatura e L é a espessura da amostra, R a constante universal dos gases perfeitos e T a temperatura em que as medidas foram feitas.

4. Resultados e discussão

4.1- Caracterização dos nanocompósitos de Fb/CB

Os filmes de fibroína mostrados na figura 9 são transparentes, entretanto são quebradiços e frágeis. Tendo como objetivo uma melhora em suas propriedades mecânicas, os filmes de fibroína foram reforçados com diferentes proporções mássicas de celulose bacteriana.

Todos os filmes compósitos de Fb/CB foram obtidos como membranas auto-suportáveis e com transparência proporcional à carga de CB presente, figura 8. Filmes com menor razão mássica de CB são macroscopicamente homogêneos e assemelham-se aos filmes de Fb pura.

Entretanto, nanocompósitos contendo razão mássica de CB superior a 2%, apresentam superfície aparentemente rugosa, com perda considerável da transparência, fato evidenciado no Filme compósito Fb/CB 10%.



Figura 8: Filmes de fibroína com fibras de CB utilizadas como reforço em diferentes proporções.



Figura 9: Filme de fibroína.

Porém a transparência pode variar conforme a posição do filme. Como pode ser visto na figura 10, se o filme Fb/CB estiver um referencial mais próximo, mostra-se mais transparente do que quando afastado desse referencial, aonde há uma diminuição considerável da transparência.



Figura 10: Transparência do filme de fibroína com 5,0% de fibras de CB, rente e afastado da superfície.

4.1.1- Caracterização óptica

A figura 11 apresenta os espectros de transmissão óptica para a membrana de CB seca, e filmes de Fb pura e com as diferentes cargas de CB. Os espectros foram normalizados em função da espessura dos filmes.

O filme de fibroína possui 85% transparência na região visível do espectro eletromagnético. Os filmes de Fb reforçados com menor razão mássica de CB possuem excelente transparência na região do visível 65% e 55% em transmitância para os filmes com 0,5% e 1% de fibras de CB. Isso se deve, principalmente a boa dispersão das fibras de CB na matriz, aspecto que será melhor discutido nas imagens de MEV.

Devido a transparência desses filmes e por serem formados por biopolímeros, pode-se sugerir possíveis aplicações: substrato para OLEDs flexíveis, embalagens para alimentos e lentes de contato terapêuticas, entre outras.

No trabalho de Retegi et al., o uso de CB como reforço em uma matriz de óleo de soja resultou em filmes biodegradáveis, transparentes, com capacidade para uso como diversos materiais [34].

Dahman desenvolveu nanocompósitos envolvendo fibras de celulose bacteriana em uma matriz de polihidroxietil metacrilato. Os nanocompósitos obtidos tinham alto valor de transmitância (80%), e utilização como materiais opticamente funcionais e aplicações biomédicas [35].

No trabalho de Barud et. Al, foram desenvolvidas membranas transparentes de celulose bacteriana utilizando como compósitos nanopartículas de boemita e epóxi siloxano modificado. Os filmes obtidos com a estrutura da celulose de um lado e a estrutura boemita-siloxano do outro, conferem ao material potencial em aplicação para dispositivos ópticos eletrônicos ou aplicações biomédicas [36].

Pode-se observar uma diminuição quase linear na transparência dos compósitos Fb/CB, ou seja, quanto maior a carga de CB, menor a transparência dos filmes. Isso se deve a heterogeneidade dos filmes, levando a perda de transparência devido ao espalhamento de luz. Alternativas para aumentar a transparência de compósitos com elevada porcentagem de celulose consistem na modificação do processo de obtenção dos filmes, ou a utilização de reforços como os nanocristais de celulose [37].

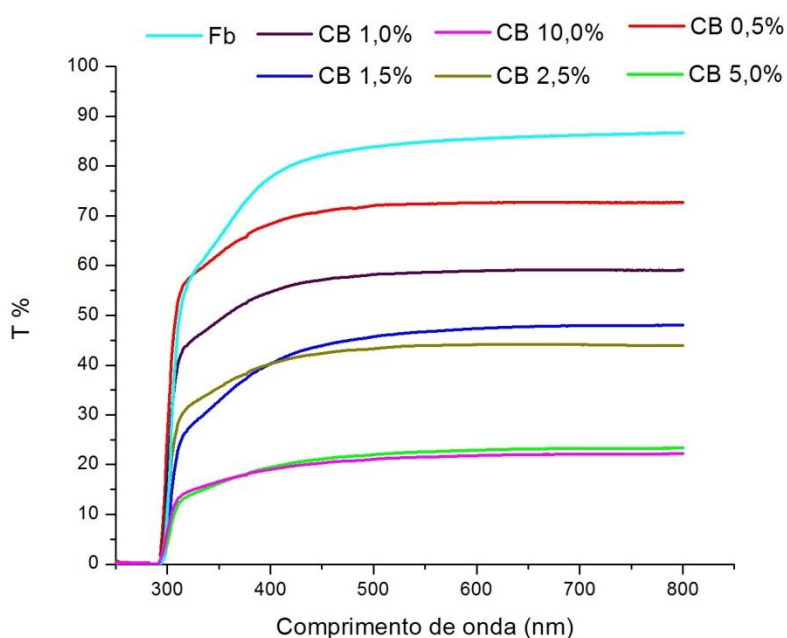


Figura 11: Gráfico de transmissão óptica para os filmes.

4.1.2- Caracterização morfológica

As imagens de MEV na figura 12 (a) mostra a superfície fibrosa formada por nanofios de celulose.

A figura 12 (b) mostra a superfície do filme de fibroína, que apresenta uma superfície formada por pequenas irregularidades.

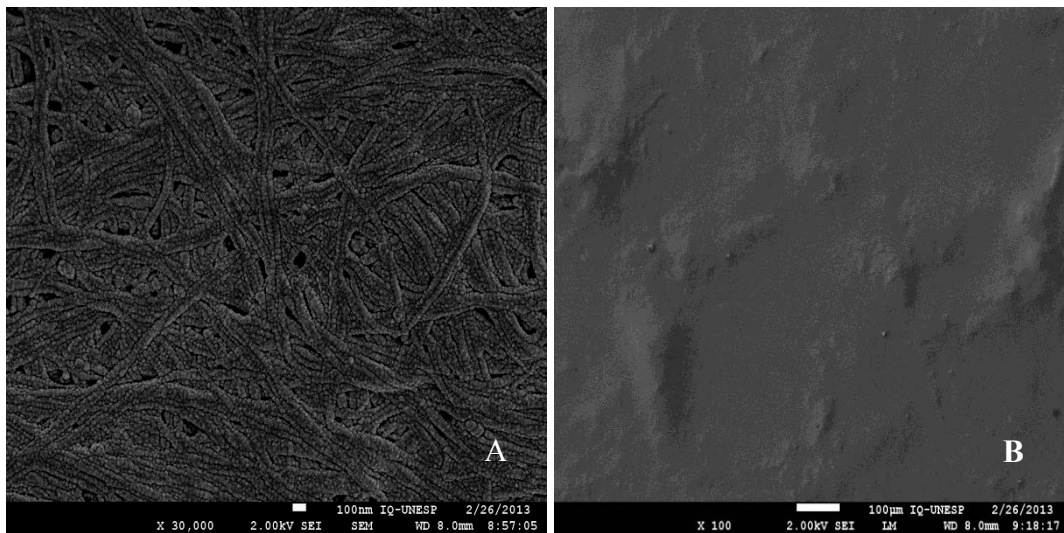


Figura 12: Imagens de MEV da superfície da a) CB e b) Fibroína

Na figura 13(a), é possível ver a seção transversal do filme de Fb, que tem uma composição homogênea.

Na figura 13(b), a seção transversal de uma membrana de CB pode ser observada. As fibras estão dispostas em camadas, pois a bactéria *Acetobacter xylinum*, produz a celulose camada por camada ao longo do tempo na superfície do meio de cultivo [38].

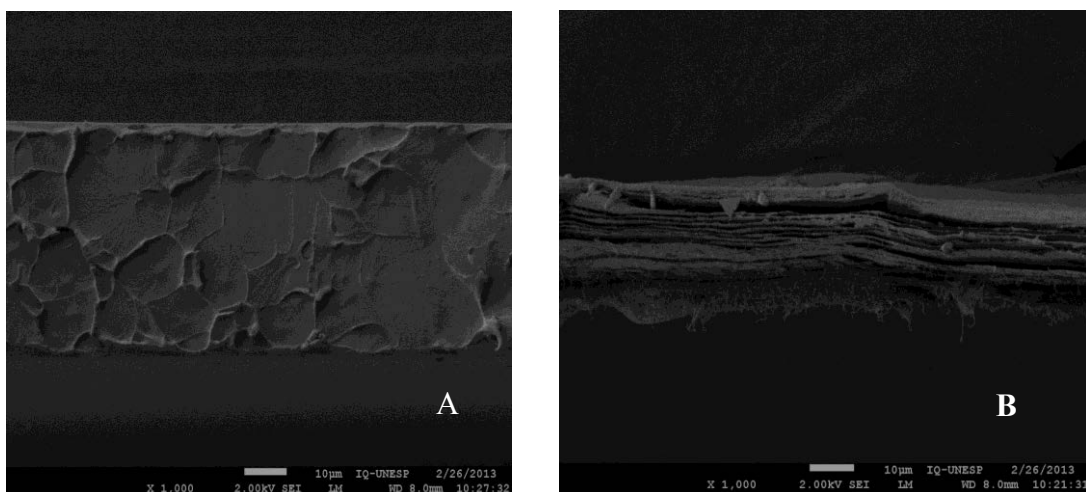


Figura 13: Imagens de MEV da seção transversal da a) Fb, e b) CB

Na figura 14, pode-se observar que as fibras de CB estão bastante embebidas na matriz de fibroína.

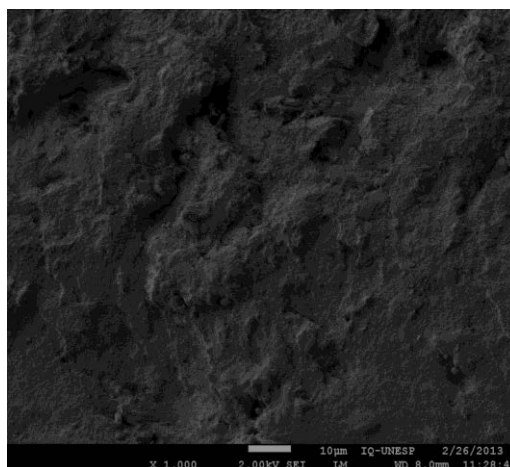


Figura 14: Imagens por MEV da superfície de um compósito de Fb/CB

A seção transversal do filme de fibroína pode ser vista com algumas fibras de celulose na figura 15, sendo que as fibras de CB estão bem dispersas na matriz de fibroína, o que mostra uma boa interface entre os dois materiais [39].

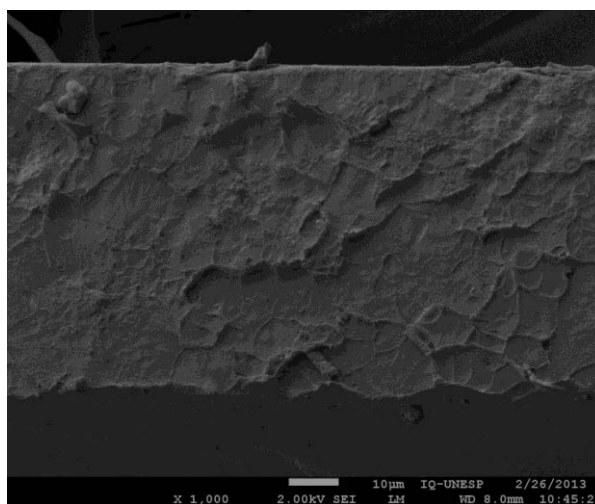


Figura 15: Seção transversal Fb/CB.

As imagens obtidas através do microscópio eletrônico permitiram visualizar que os dois materiais estão bem dispersos um no outro.

4.1.3- Característica estrutural

Os difratogramas de raios-x da membrana de CB, filme de fibroína e alguns filmes nanocompósitos de Fb/CB estão apresentados na figura 16.

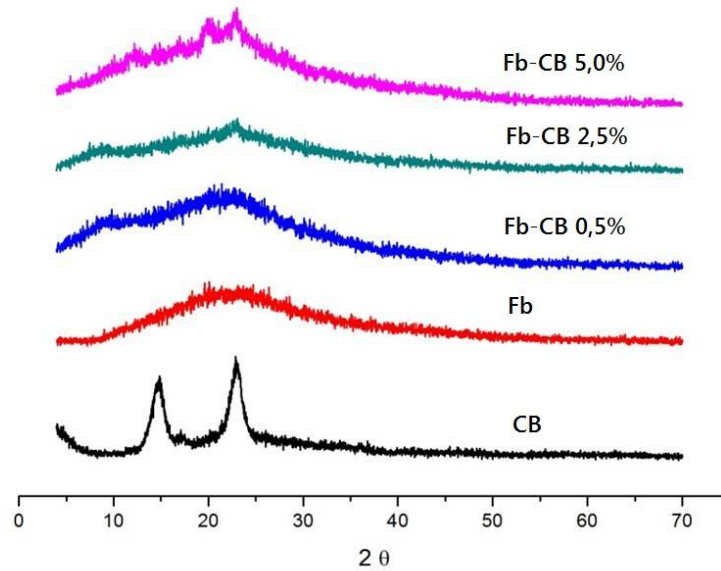


Figura 16: Difratograma de raios-X para as amostras.

Os picos em 15 e 22,5 graus são referentes ao padrão cristalino da celulose, característico da celulose nativa, celulose tipo I [36].

Para a fibroína, observa-se característica predominante amorfa, o que também pode ser observado para os filmes contendo baixa concentração de CB.

Para amostras contendo acima de 2,5% de fibras de CB observa-se o surgimento de um pico em 22,5 graus, o qual pode ser atribuído a presença de CB. Desse modo pode-se inferir que a celulose não altera de maneira significativa o padrão cristalino da fibroína.

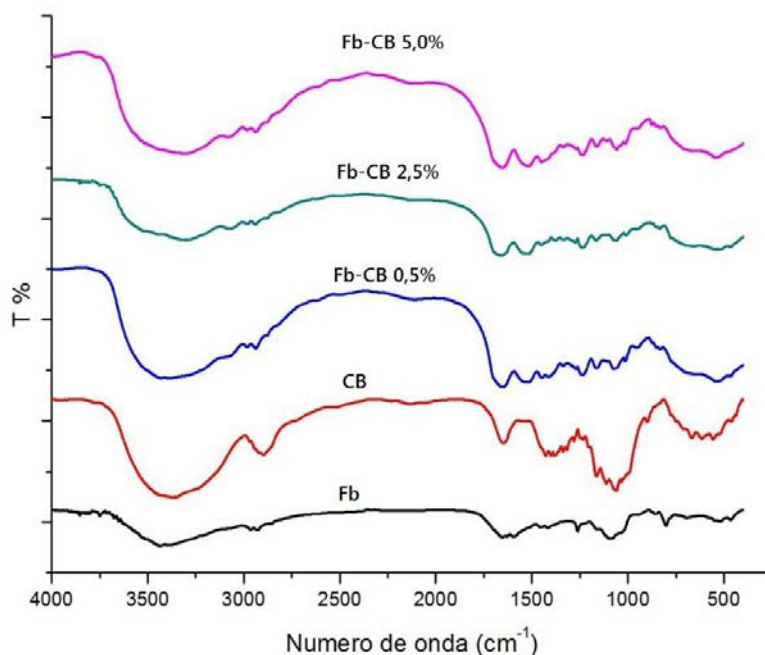


Figura 17: FT-IR dos nanocompósitos.

A figura 17 mostra os espectros na região do infravermelho para as amostras de Fb, CB, Fb/CB 0,5%, Fb/CB 2,5% e Fb/CB 5,0%.

Para a CB, as principais bandas do espectro são: 3399 cm^{-1} , referente ao estiramento O-H; 2888 cm^{-1} , referente ao estiramento C-H; 1653 cm^{-1} , referente a deformação OH e 1044 cm^{-1} , referente a deformação CO [10].

Para o filme de fibroína as principais bandas são: 3406 cm^{-1} , referente ao estiramento OH presente na proteína; 1653 cm^{-1} referente à amida I; 1444 cm^{-1} , referente à amida II; 1257 cm^{-1} , referente à amida III, são picos característicos da estrutura da fibroína.

A banda intensa localizada ao redor de 1653 cm^{-1} é atribuída a conformação α -hélice, que confere solubilidade e características amorfas ao filme de fibroína [40].

Os espectros dos nanocompósitos Fb/CB não apresentam o surgimento de novas bandas, e pode ser considerada a soma dos precursores. Entretanto, uma mudança no perfil da banda situada ao redor de 3500 cm^{-1} (estiramento OH) sugere a formação de ligação entre as hidroxilas da CB e as proteínas presentes na fibroína. Os espectros apresentam bandas presentes na fibroína e na CB, com diferentes intensidades e algumas descoladas, porém nenhuma nova banda surgiu, ou seja, o material não foi modificado quimicamente, porém houve interação entre os dois materiais.

4.1.4- Caracterização térmica

Na figura 18, estão representadas as curvas TG/DTG para a CB e os filmes de Fb, Fb/CB 0,5% e Fb/CB 5,0%.

Na curva TG/DTG referente à celulose bacteriana, perda de massa de 5% entre 50 - 150 °C, devido à volatilização da água adsorvida no material. Esse evento pode ser confirmado por um pico endotérmico próximo a 65 °C, conforme curva DSC. Outro evento de perda de massa, de aproximadamente 50 %, ocorre na faixa de temperatura de 260 – 380 °C, que pode ser relacionado a degradação da celulose, como a despolimerização da hemicelulose e a quebra das cadeias glicosídicas, evento este que é mostrado no DSC através de um pico exotérmico a 300 °C [41].

A curva TG/DTG da fibroína mostra uma perda de massa inicial na faixa de temperatura 50 -150 °C de aproximadamente 11% relativo à perda de água adsorvida no filme, evento que pode ser visto como um pico endotérmico próximo a temperatura de 70 °C, conforme curva DSC.

Outro evento com perda de massa (50%) ocorre entre 200 - 400 °C e que também é evidenciado por um pico endotérmico a 285 °C na curva DSC. Pode-se inferir que nessa faixa de temperatura têm a fibroína predominantemente amorfa, isenta de qualquer tratamento químico ou físico [42].

Para os filmes de fibroína reforçados com 0,5% e 5,0% de biocelulose, observa-se na curva TG perda de massa entre 40 – 170 °C de aproximadamente 10%, representada por um pico endotérmico na curva DSC a 63 °C. Tal evento pode ser atribuído à perda de água adsorvida nos filmes [10].

Observando ainda a curva TG/DTG têm-se outro evento com perda de massa (44%) e que ocorre entre 250- 436 °C para o filme Fb- CB 0,5% e entre 230- 470 °C para o filme Fb- CB 5,0%, representado por picos endotérmicos no DSC a 285 °C. No filme com menor carga de CB (0,5%), a perda de massa ocorre em uma faixa de temperatura menor, e no filme com maior quantidade de carga (5,0%), a perda de massa ocorre em um intervalo de temperatura maior. Isso mostra como uma maior quantidade de fibras de CB ocasionou em uma resistência térmica do material.

Este evento pode está relacionado a degradação da fibroína, porém o DSC do filme Fb-CB 5,0% apresenta um pico exotérmico a 218 °C, que parece estar relacionado á degradação da biocelulose, porém este pico está deslocado em relação a degradação da CB pura, então para este nanocompósito a estabilidade térmica da celulose foi diminuída.

Um estudo variando a taxa de aquecimento da curva será realizado a fim de elucidar esse comportamento.

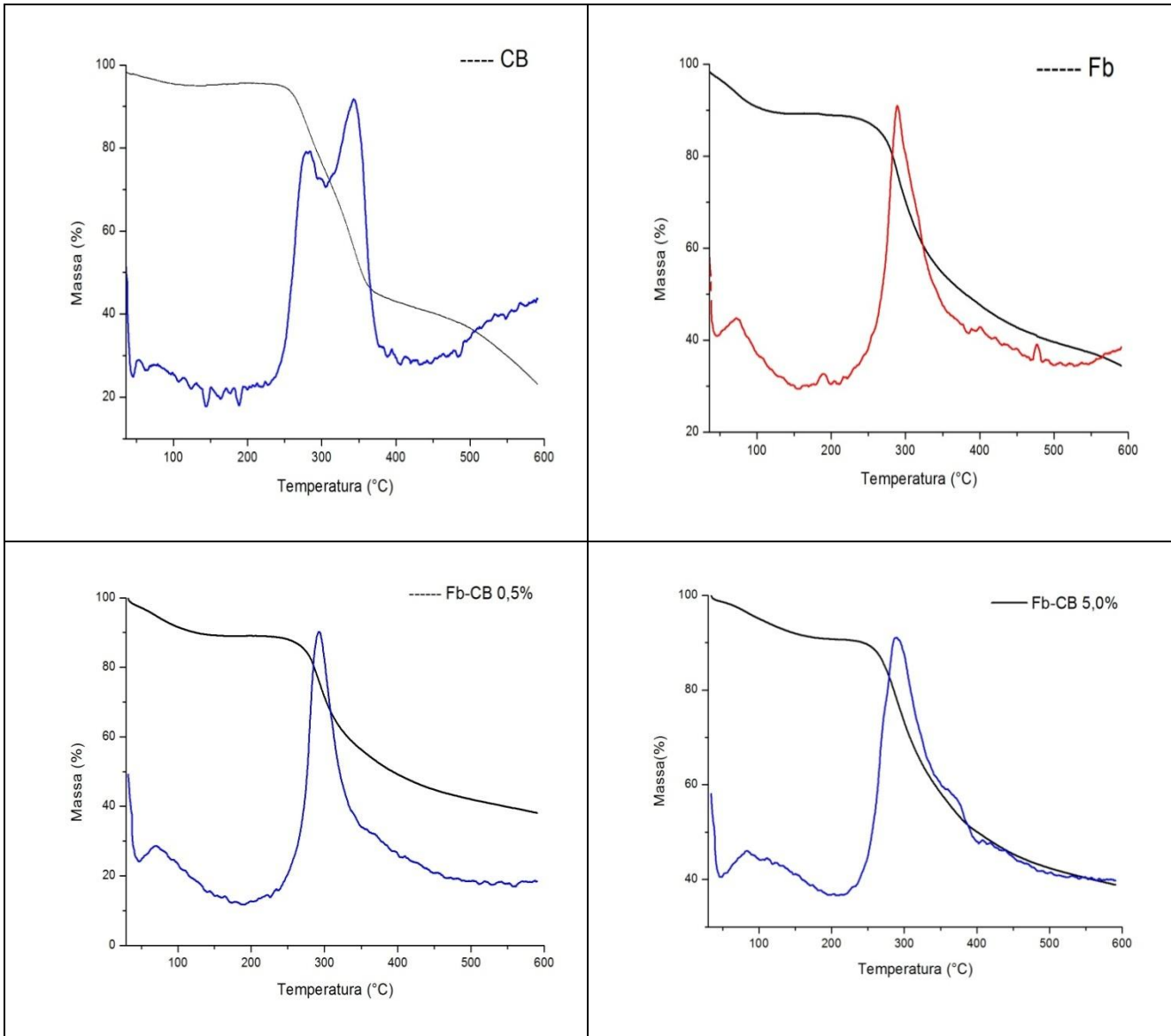


Figura 18: Curvas TG/DTG para as amostras CB, Fb, Fb/CB 0,5% e Fb/CB 5,0%.

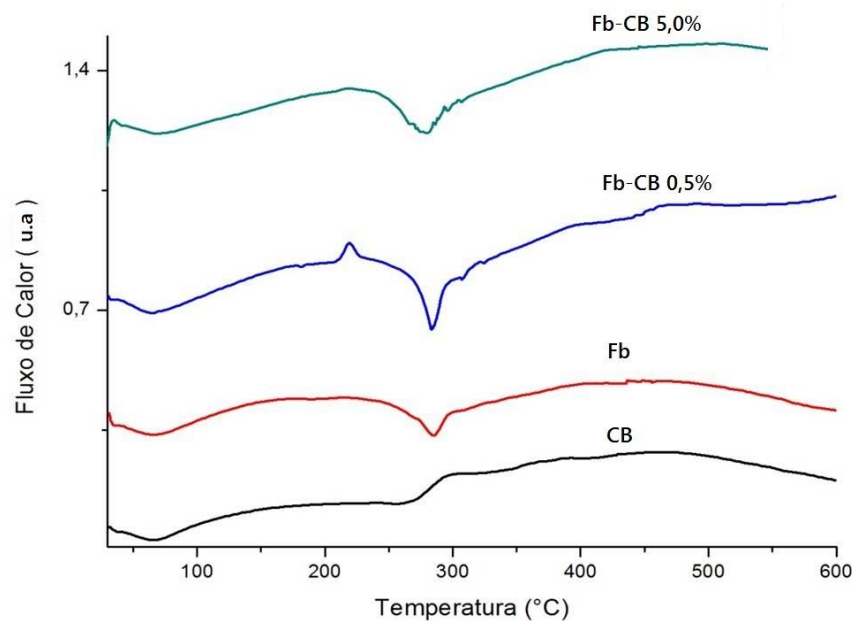


Figura 19: DSC dos filmes de CB, Fb, Fb-CB 0,5% e Fb-CB 5,0%.

4.1.5-Ensaio mecânico

A figura 20 mostra as propriedades mecânicas como: deformação, módulo de Young e tensão, respectivamente, para todos os nanocompósitos.

Para a deformação pode-se ver que a CB e o filme de fibroína possuem os maiores valores, 1,4% para ambos. Percebe-se que o filme Fb-CB com carga de 0,5% perde cerca de 0,3% da capacidade de deformação, e com exceção do filme Fb-Cb com carga de 1,0%, todos vão perdendo gradualmente a capacidade de deformação conforme há um aumento no número de fibras do filme. O filme de fibroína com 1% de carga de biocelulose teve um decréscimo de apenas 0,1% da capacidade de deformação em relação à deformação do filme de fibroína puro.

Já para o módulo de Young o filme de Fb apresentou um valor médio de 33 GPa e a membrana de celulose um valor médio de 29 GPa.

O filme com o maior módulo é o que contém 1,0% de carga de celulose com um valor médio de 27 GPa. Para os demais pode-se observar que o valor do módulo não varia muito, mas que é menor conforme há um aumento da carga de CB.

Quanto a tensão, os valores apresentados pelo filme de fibroína é de 34 MPa e para a membrana de celulose seca 27 MPa. O nanocompósito com a maior tensão é o Fb-CB 1,0%, já os demais tem tensões muito baixas.

Os resultados sugerem que a quantidade de carga de biocelulose no filme de fibroína, que mantém as propriedades mecânicas da fibroína e biocelulose em um compósito, é de 1,0%, devido a boa dispersão de fibras de CB na matriz de fibroína, visto que com menor quantidade de carga 0,5%, o filme não fica totalmente recoberto com as fibras, e com o aumento da carga (mais que 1%), as fibras vão aglomerando no filme.

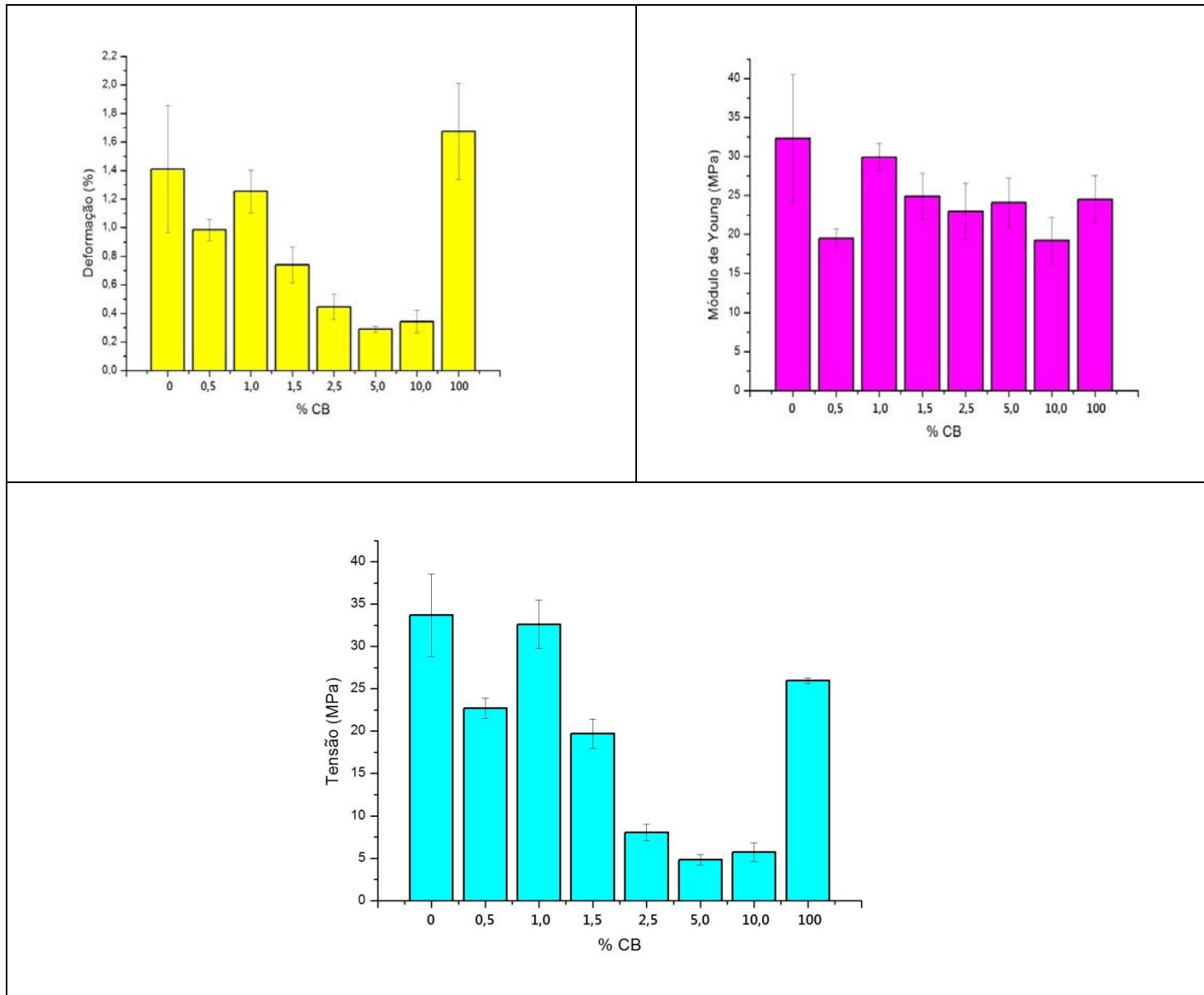


Figura 20: Deformação, Módulo de Young e Tensão para os nanocompósitos.

4.1.6- Ensaio de permeação ao vapor de água

O ensaio de permeação ao vapor de água para os nanocompósitos foi feito a fim de elucidar a capacidade de permeação dos mesmos, para um estudo sobre o efeito que a carga de CB e a adição de PEG tem na matriz de fibroína e na sua capacidade de permeabilidade ao vapor de água.

Os ensaios de permeabilidade ao vapor de água do filme de fibroína e Fb/CB 1% são mostrados no gráfico da figura 21.

Pode-se observar que o filme de fibroína pura apresenta baixa permeabilidade ao vapor de água, enquanto o filme com 1% de fibras de CB apresenta um valor três vezes maior para a permeabilidade. Isso se deve a hidrofilicidade apresentada pela celulose. As fibras absorveram a água e deixaram o filme mais permeável, além do fator de que o filme contendo a CB pode conter pequenos furos, devido a secagem do material, já que o mesmo apresentou algumas bolhas pequenas quando foi vertido nas placas de petri para secagem.

Para a utilização de filmes como embalagens alimentícias e de estocagem de medicamentos, é desejável que os mesmos tenham baixa permeabilidade ao vapor de água, a fim de manter as características dos alimentos e medicamentos evitando contaminações e desenvolvimento de micro-organismos [43].

Porém, o filme com permeação ao vapor de água é desejável, por exemplo, para a reconstituição tecidual [44].

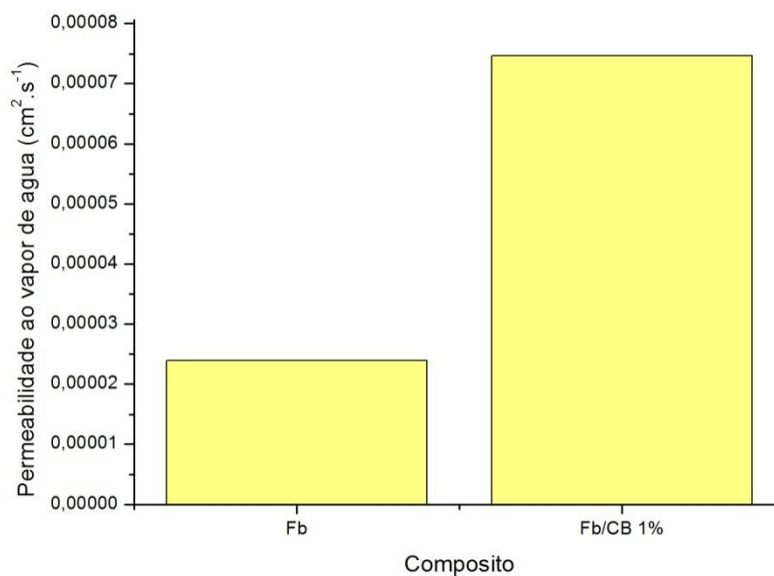


Figura 21: Permeabilidade dos filmes Fb e Fb/CB 1%.

Com intuito de melhorar as propriedades mecânicas dos nanocompósitos obtidos com fibroína e celulose bacteriana, um estudo sobre a adição do plastificante polietileno glicol (PEG), foi realizada produzindo-se compósitos de Fb/PEG e posteriormente um compósito ternário Fb/PEG/CB.

4.2-Caracterização dos nanocompósitos de Fb/PEG

O polietileno glicol foi utilizado como plastificante, com o propósito de aumentar a resistência mecânica do filme de fibroína. PEG com diferentes massas molares de PEG 200, 300, 400, 600, 1000 e 6000 g/mol na proporção de 30% da massa/massa.

Avaliando a figura 22, pode-se notar que os filmes de fibroína com PEG são macroscopicamente homogêneos e mantiveram transparência similar ao filme de fibroína pura. Nota-se apenas uma leve opalescência nos filmes contendo PEG 1000 e 6000 g/mol. O filme contendo PEG 6000 g/mol mostrou-se quebradiço e por ter uma massa molar mais elevada pode apresentar menor compatibilidade com a matriz de fibroína.



Figura 22: Filmes de fibroína com 30% de PEG, com diferentes MM (g/mol).

Os filmes mantiveram transparência semelhante quando afastados e colocados rente a superfície, como pode ser visto na fig. 23.



Figura 23: Transparência do filme de fibroína com PEG 200 g/mol, rente e afastado da superfície.

4.2.1- Caracterização óptica

A figura 24 apresenta os espectros de transmissão óptica para o filme de fibroína puro e os filmes plastificados com PEG de diferentes massas molares.

Todos os filmes de fibroína/PEG apresentaram-se transparência similar quando comparados ao filme de fibroína puro, conforme confirmado na curva UV-Vis. Desse modo pode-se sugerir a boa dispersão do PEG na matriz de fibroína.

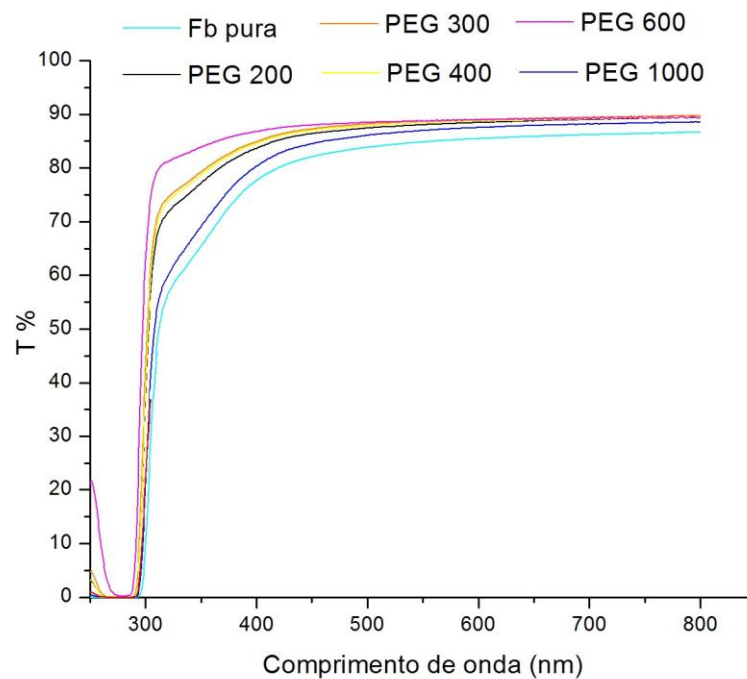


Figura 24: Gráfico de transmissão óptica para os filmes.

4.2.2-Característica estrutural

Os difratogramas de raios-x dos filmes Fb-PEG estão apresentados na figura 25.

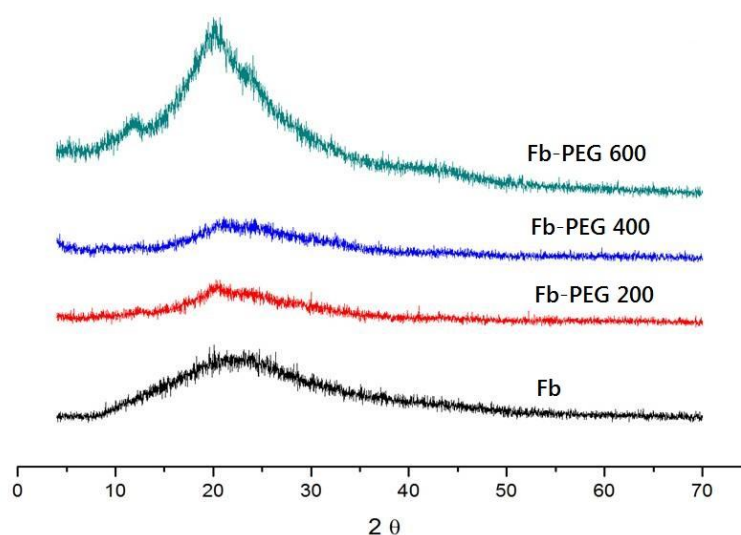


Figura 25: Difratograma de raios-X para as amostras Fb- PEG.

A fibroína possui uma estrutura não cristalina, o que pode ser comprovado pelo perfil da curva no DRX. O filme da proteína pura apresenta um padrão amorfo, atribuído à estrutura α -hélice. [45].

No gráfico da figura 25 estão representadas três amostras. Para o filme de Fb - PEG 200 há um pico em aproximadamente 20,7 graus, o mesmo pico apresentado para a curva da fibroína, porém com menor intensidade.

Para a amostra Fb - PEG 400 há um pico em aproximadamente 21,5 graus, ou seja, houve um pequeno desvio do pico apresentado para a fibroína pura.

Esses picos surgiram devido à interação através de ligações de hidrogênio do PEG com a proteína da matriz

Para a curva do filme Fb – PEG 600 há dois picos, um de menor intensidade, em 11,5 graus e outro de maior intensidade em 20,5 graus. O pico de menor intensidade pode ser atribuído as moléculas do PEG. Observa-se também, que houve um aumento na cristalinidade com a adição de PEG, e para o PEG de massa molar 600 g/mol essa cristalinidade é notável, como pode ser visto pelo pico mais definido e de base mais estreita.

Neste caso o polietilenoglicol interagiu com as cadeias da fibroína através de ligações de hidrogênio de modo que esta se tornou mais organizada com uma nova conformação, β -folha e, portanto mais cristalina, e com um caráter menos solúvel.

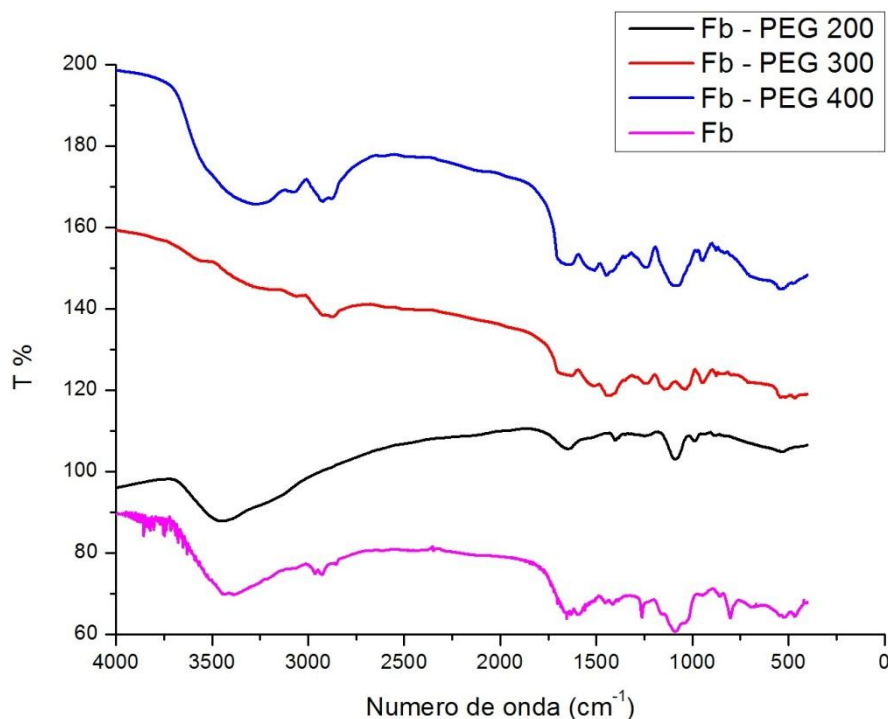


Figura 26: Espectro de infravermelho para os nanocompósitos com polietileno glicol.

A figura 26 mostra os espectros na região do infravermelho para as amostras Fb, Fb – PEG 200, Fb – PEG 300 e Fb – PEG 400.

Como citado anteriormente no filme de fibroína as principais bandas são: 3406 cm^{-1} , referente ao estiramento OH presente na proteína; 1642 cm^{-1} referente à amida I; 1444 cm^{-1} , referente à amida II; 1257 cm^{-1} , referente à amida III, são picos característicos da estrutura da fibroína.

A banda em 1392 cm^{-1} é atribuída à conformação α -hélice [40].

O espectro do nanocompósito Fb – PEG 200 possui uma banda em 3406 cm^{-1} relativo ao estiramento O-H, a banda em aproximadamente 2944 cm^{-1} , presente no espectro da fibroína, não aparece no espectro deste composto. O espectro apresenta bandas em comum com as apresentadas para a fibroína, como em 1642 cm^{-1} e 1087 cm^{-1} .

Os espectros dos filmes com PEG 300 e 400 são similares, onde bandas relativas a fibroína aparecem, porém nota-se bandas diferenciadas, que são bandas resultantes da interação do PEG com a fibroína.

Para os compósitos com PEG houve o surgimento de novas bandas no espectro de infra-vermelho e um novo padrão de organização das moléculas do compósito, devido a interação entre as moléculas de PEG com a proteína, fibroína.

4.2.3-Caracterização térmica

Na Figura 27, estão representadas as curvas TG/DTG para os filmes de Fb, e Fb reforçado com os PEGs de massa molar 200, 400 e 600 g/mol.

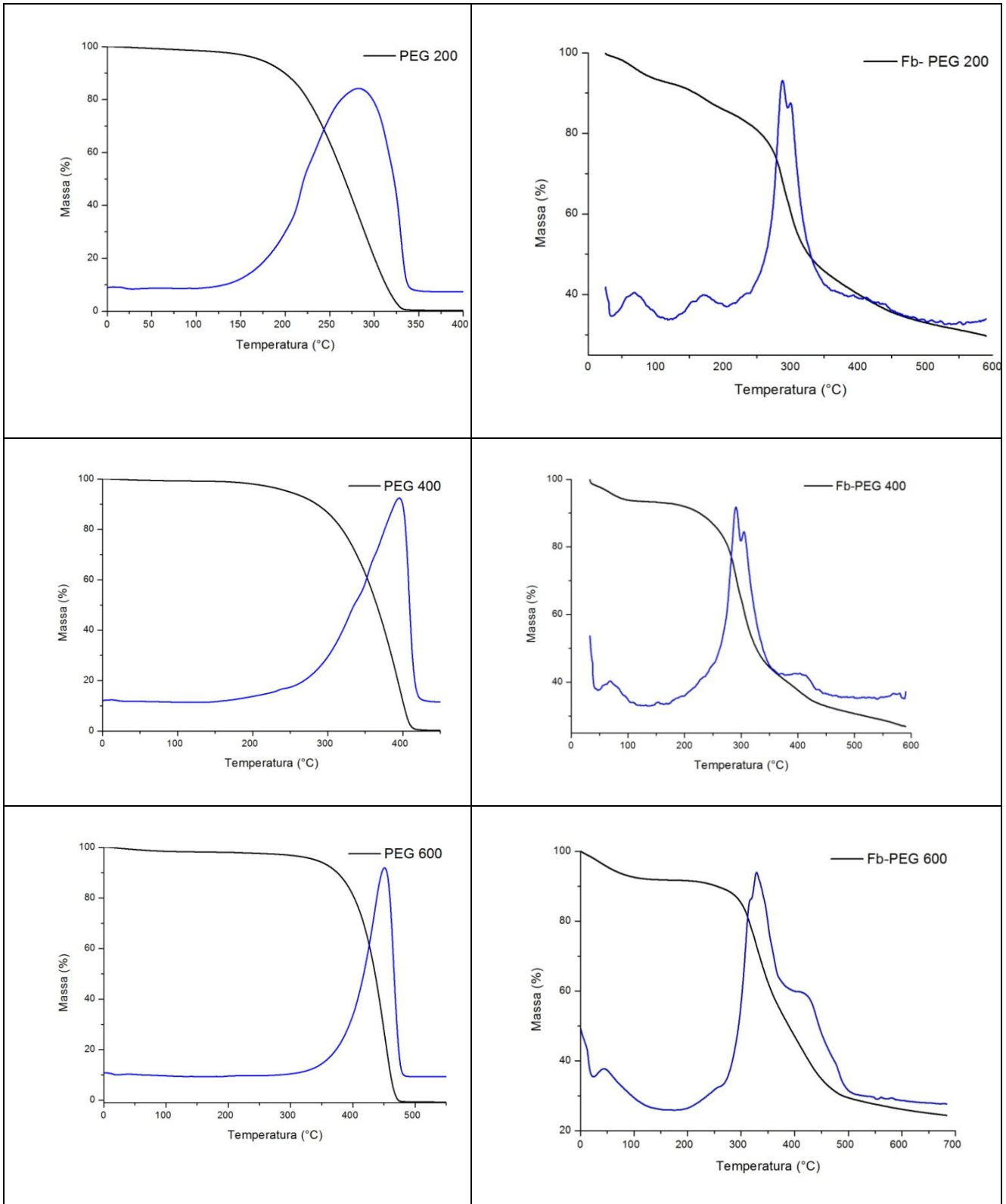


Figura 27: Curvas TG/DTG para as amostras Fb - PEG 200, Fb - PEG 400, Fb - PEG 600.

Como analisado anteriormente a curva TG da fibroína mostra uma perda de massa inicial de aproximadamente 11% relativo à perda de água adsorvida no filme, evento que pode ser visto como um pico endotérmico a 70 °C no DSC (fig. 28), o filme também sofre outra perda de massa (50%) entre 200 e 400 °C, representado por um pico endotérmico a 285 °C no DSC, relativo a fibroína amorfa [42].

Para os PEGs todas as curvas TG/DTG são similares. Há um evento de perda de massa inicial, devido a degradação do polietileno glicol na faixa de temperatura de 200-470 °C.

Quando há um aumento da massa molar do polietileno glicol há aumento da temperatura de perda de massa, isso se dá pelo aumento da cadeia de etileno glicol do polímero.

Para o filme Fb - PEG 200 a curva TG/DTG apresenta dois eventos com perda de massa. O primeiro com aproximadamente 30% de perda de massa ocorre entre 30 e 70 °C, e pode ser observado com um pico endotérmico na curva DSC a 60°C. Essa perda de massa inicial é relativa a perda de água adsorvida no filme de fibroína, o mesmo pico é representado no DSC do filme puro de Fb.

A segunda perda de massa (44%) ocorre entre 200 e 350 °C, e está representada por um pico endotérmico no DSC a 294 °C. Este pico está relacionado a decomposição da estrutura da fibroína. Vê-se um aumento nesta temperatura comparado ao filme de Fb puro. Um aumento de 9 °C na temperatura de decomposição do filme, ou seja, há uma interação do PEG na matriz da fibroína.

O filme Fb – PEG 400 tem dois eventos de perda de massa representados na curva TG, o primeiro ocorre entre 34 e 114 °C, com uma perda de cerca de 6%, representado por um evento endotérmico em 63 °C no DSC. A segunda perda de massa (58%), entre 240 -500 °C, pode ser vista como um pico endotérmico no DSC a 305 °C, está relacionada com a decomposição da estrutura da fibroína, e devido ao aumento da massa molar do PEG, essa decomposição ocorreu em uma temperatura 20 °C a mais do que a decomposição do filme de fibroína puro.

No filme Fb – PEG 600, há duas perdas de massa na curva TG, a primeira de 7% , entre 40 – 110 °C, relativo a perda de água, representado por um pico endotérmico em 104°C no DSC. A segunda perda de massa de 55%, é relativo a decomposição da estrutura da fibroína, que ocorre entre 184 – 400 °C, e é equivalente a um pico endotérmico em 308 °C no DSC.

É possível ver que com a inserção dos PEGs 400 e 600 na matriz de fibroína, o filme perdeu menor quantidade de água, passou de uma porcentagem de 11% a 6% e 7%, respectivamente.

A adição do plastificante PEG melhorou as propriedades térmicas do filme de fibroína, pois possibilitou um aumento na estabilidade térmica da fibroína, de aproximadamente 23°C.

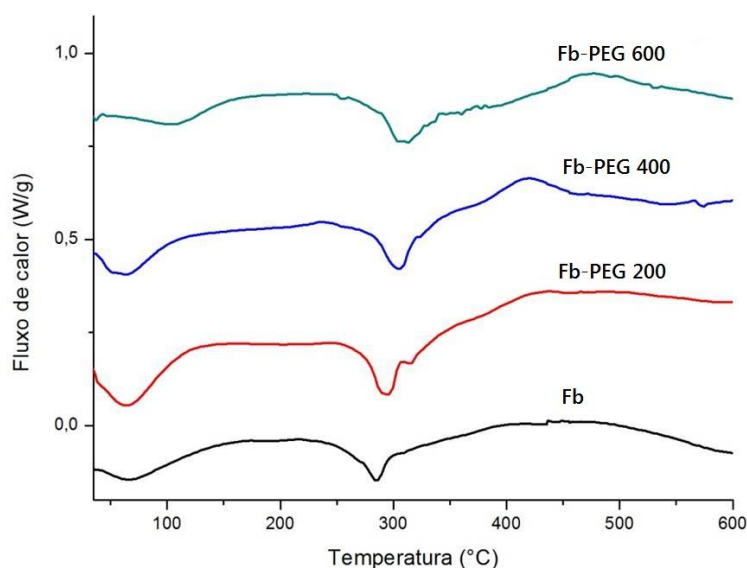


Figura 28: DSC dos filmes de Fb, Fb - PEG 200, Fb - PEG 400 e Fb - PEG 600.

4.2.4-Ensaio mecânico

A figura 29 mostra as propriedades mecânicas como: deformação, módulo de Young e tensão, respectivamente, para todos os filmes.

Todos os filmes reforçados com PEG tiveram sua capacidade de deformação aumentada, sendo que os filmes com a maior deformação são: Fb – PEG 200, com 21% e Fb – PEG 300, com 26%. A adição de PEG contribuiu para um filme de fibroína com maior capacidade de deformação, o que expande a possibilidade de aplicações do material.

Já para a tensão, os filmes com polietileno glicol apresentaram uma tensão semelhante ao filme de fibroína puro, com uma tensão de 34 MPa. Os filmes que apresentaram a tensão com valores mais próximos a filme de Fb são: Fb – PEG 400, com 33 MPa e Fb - PEG 1000, com 29 MPa.

Os valores obtidos sugerem que os filmes de fibroína com PEG obtiveram maior capacidade de deformação, e não perderam a capacidade de tensão. Este conjunto de propriedades mecânicas sugere que os filmes podem ser bons para a utilização como embalagens biodegradáveis.

Para o módulo de Young, ocorreu o efeito contrário, houve uma diminuição significativa do módulo para os compósitos com PEG.

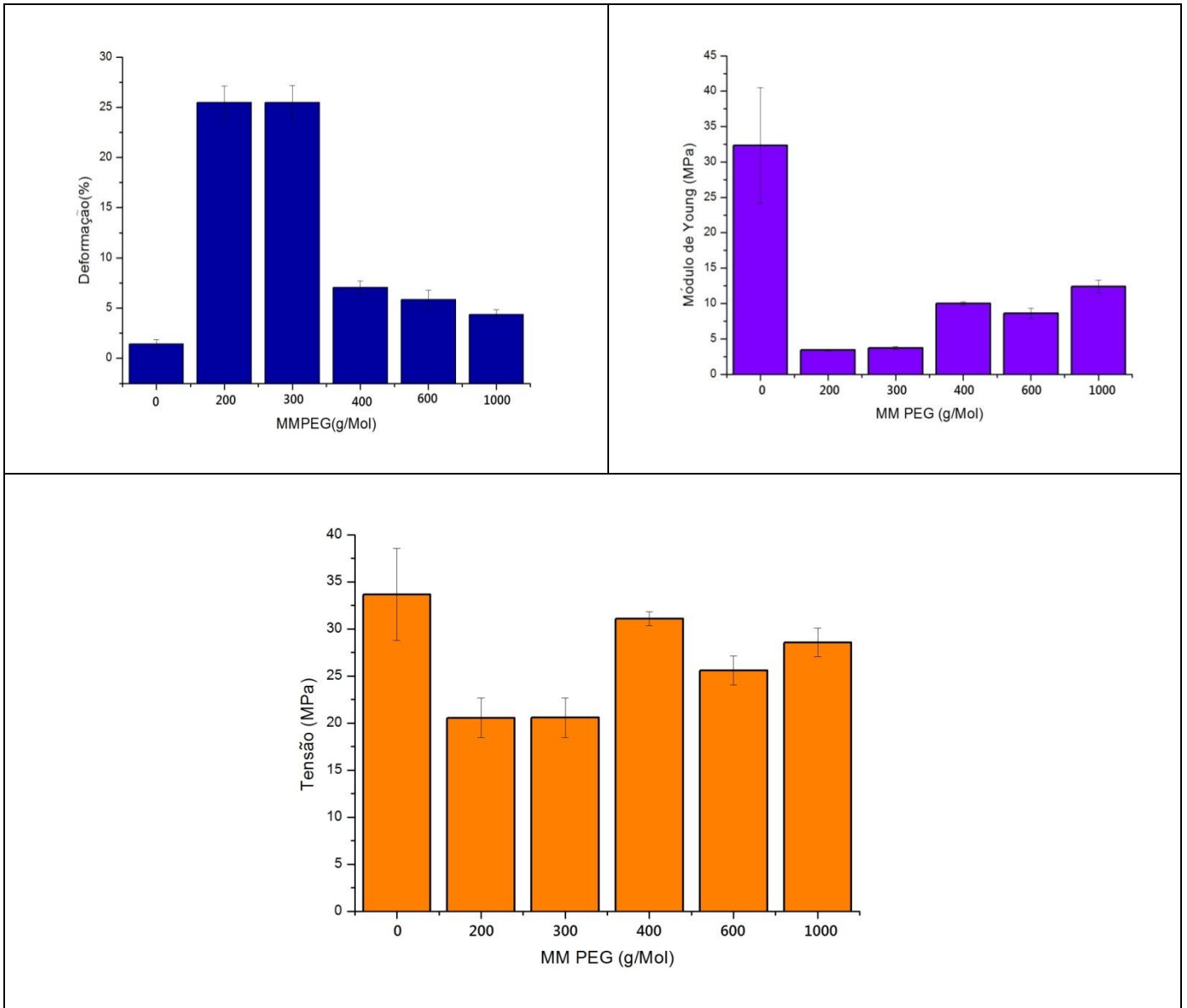


Figura 29: Deformação, Módulo de Young e Tensão para os filmes de Fb e PEG.

Na tabela 3, estão os resultados da porcentagem de perda de massa dos filmes em água.

A medida de perda de massa em água foi feita para estudar uma possível modificação na solubilidade dos filmes de fibroína, quando adicionado o plastificante PEG com diferentes massas molares.

O filme de fibroína é bastante solúvel em água, perdeu cerca de 40% em massa quando em contato com a água. Já os filmes em que o PEG foi agregado, houve uma diminuição da solubilidade em água, sendo que os PEG de massa molar 600 e 1000 g/mol,

proporcionaram a maior impermeabilização do material, com uma perda de cerca de 22% de massa do filme em contato com a água.

Com a adição do plastificante o filme de fibroína ganhou maior estabilidade em água, essa característica é valiosa, pois o filme terá maior durabilidade e resistência à umidade.

Tabela 3: Perda de massa dos filmes em água.

Filme	% perda de massa
Fb	39,75
Fb - PEG 200	28,03
Fb - PEG 300	26,73
Fb - PEG 400	25,35
Fb - PEG 600	21,94
Fb - PEG 1000	22,80
Fb - PEG 6000	26,62

4.1.6- Ensaio de permeação ao vapor de água

Na figura 30, é possível ver que a permeação ao vapor de água para o filme com PEG 200 tem o menor valor, porém com o aumento da massa molar do PEG há um aumento na permeabilidade do filme.

Com a inserção de 1% de fibras de CB ao nanocompósito com PEG 200, a permeação dobra de valor, isso se dá devido a afinidade da celulose com a água e também as pequenas bolhas que podem ter se formado no filme durante a secagem, devido a presença de bolhas na solução.

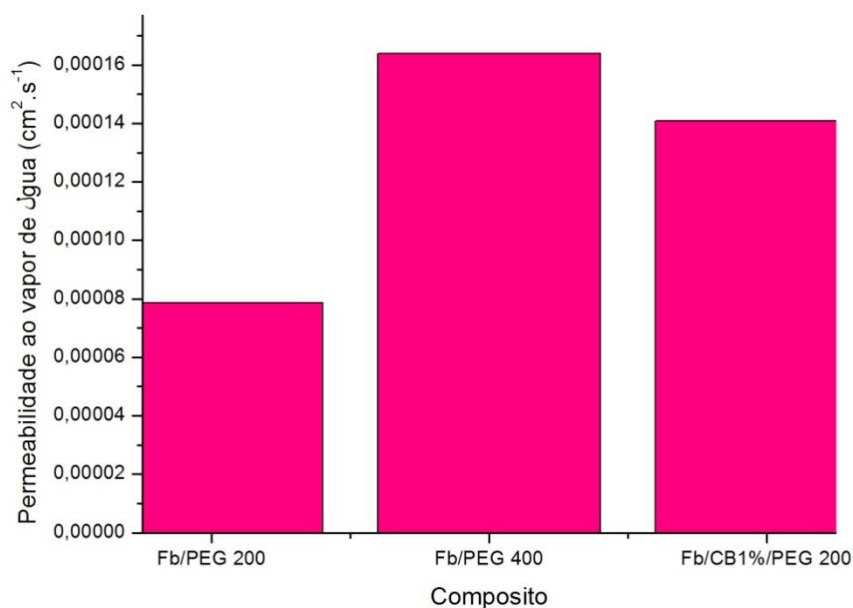


Figura 30: Permeabilidade ao vapor de água para compósitos contendo PEG e CB 1%

4.1.7- Caracterização mecânica em relação ao nanocompósito ternário

A figura 31 mostra os valores comparativos das propriedades mecânicas, deformação, tensão e módulo de Young para o filme de Fb, a membrana de celulose bacteriana, os nanocompósitos Fb/CB 1% e PEG/200 e o nanocompósito ternário Fb/CB 1%/PEG 200.

O nanocompósito ternário foi feito adicionando-se a matriz de fibroína 1% de fibras de CB e PEG 200.

Pode-se observar que houve um aumento da deformação deste nanocompósito ternário em relação ao nanocompósito Fb/CB 1% devido a presença do plastificante, porém apresentou um valor menor em relação ao nanocompósito contendo apenas PEG 200, ou seja, as fibras de CB, devido as suas interações e a dispersão das fibras, resultou na diminuição da deformação do material Fb/PEG 200.

O valor do módulo de Young para o nanocompósito ternário diminuiu em relação ao filme Fb/CB 1% e aumentou em relação ao filme Fb/PEG 200.

Já para os valores de tensão na ruptura, o filme teve um valor menor em comparação ao filme Fb/CB 1%, e manteve praticamente o mesmo valor de tensão do nanocompósito Fb/PEG 200.

A junção dos três materiais formou um novo material que teve melhores propriedades mecânicas de deformação quando comparado ao filme Fb/CB 1% e manteve o valor de tensão na ruptura em relação ao filme Fb/PEG 200.

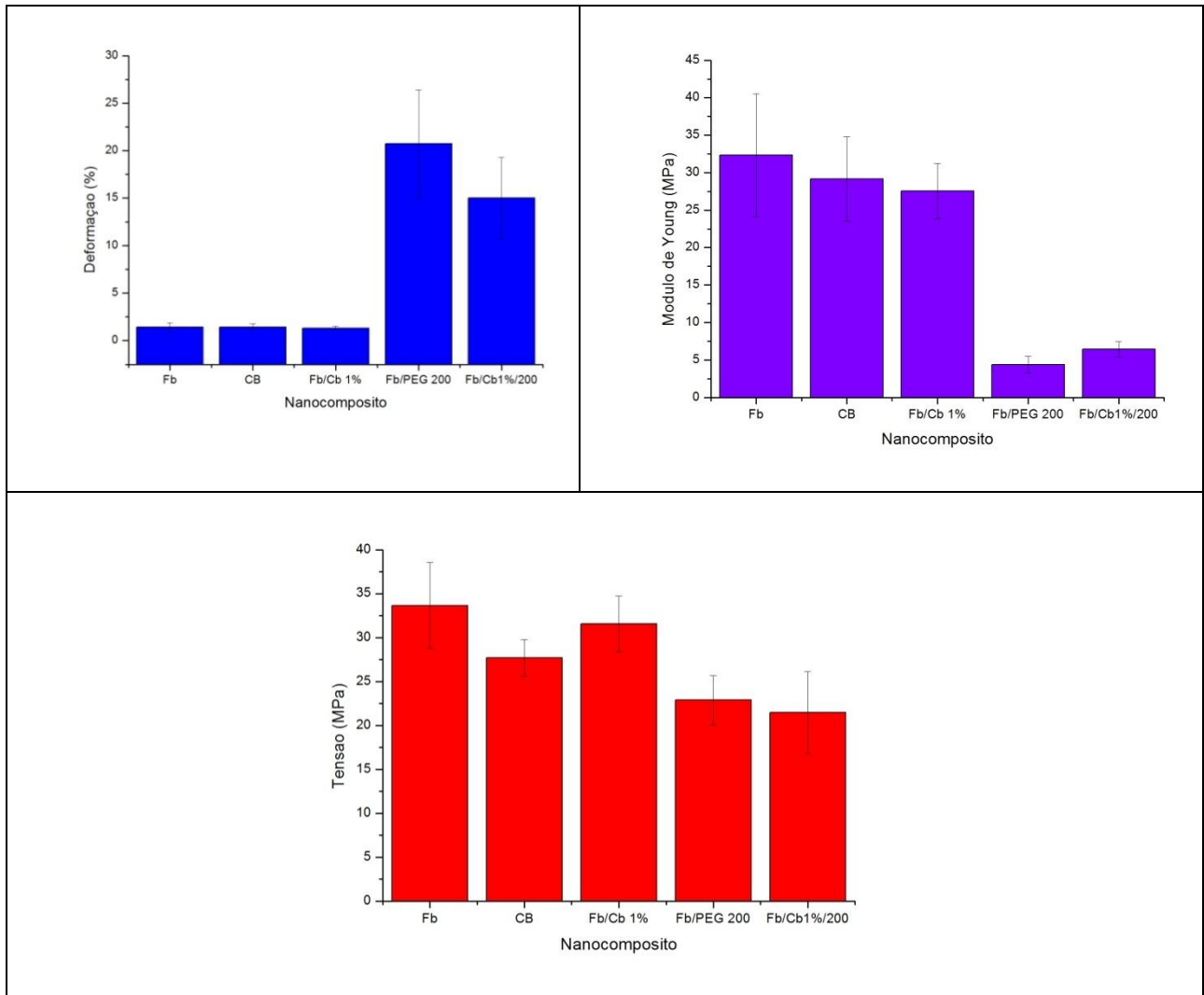


Figura 31: Deformação, tensão e módulo de Young para os nanocompósitos e o filme ternário.

5-Conclusão

Foram preparados e caracterizados nanocompósitos multifuncionais de fibroína da seda (Fb) reforçados com celulose bacteriana (CB) e polietileno glicol (PEG).

As propriedades ópticas e mecânicas dos nanocompósitos Fb/CB foram proporcionais a carga de celulose utilizada. Medidas de Microscopia Eletrônica de Varredura revelaram a boa dispersão de celulose na matriz de fibroína. O filme com 1% de carga de CB apresentou as melhores propriedades mecânicas, perdendo apenas 0,1% da sua capacidade de deformação, 27 GPa para o módulo de Young e com um valor alto para a tensão quando comparado aos outros filmes.

Foram preparados filmes de fibroína contendo PEG com diferentes massas molares. Todos os filmes Fb/PEG mostraram propriedade óptica comparável ao filme de fibroína pura, entretanto, mostraram-se mais flexíveis, conforme atesta os ensaios mecânicos. O filme preparado com PEG 200 e 300 apresentaram valores de deformação maiores, 25% para ambos, quando comparados ao filme de fibroína pura que apresentou uma deformação de 2%.

Para o nanocompósito ternário preparado com 1% de CB, Fb e PEG 200, obteve-se um valor de deformação mecânica maior do que o apresentado para o filme Fb/CB1% e um valor de tensão na quebra praticamente igual ao valor apresentado pelo filme Fb/PEG 200. No teste de permeabilidade ao vapor de água o compósito apresentou um valor maior do que para o filme de fibroína pura e do que o filme Fb/CB1%, o alto valor da permeabilidade se deve a presença do PEG, e presença da CB que tem alta afinidade por água.

O conjunto dos resultados sugere que devido a não toxicidade dos materiais utilizados para a obtenção dos filmes, estes podem ser utilizados para fins biomédicos, como substratos para entrega de medicamentos e regeneração tecidual, bem como utilizado para embalagens biodegradáveis para alimentos, devido às boas propriedades mecânicas e ópticas apresentadas.

6-Referências

- [1]-SYRACUSE. Cellulose and Wood-chemistry and technology. *Editora Conrad schuerch.*, New York, may 29-june 2, 1988, wiley interscience p.1383
- [2]-WHISTLER, R. AND J. N. BEMILLER. *Carbohydrate Chemistry for Food Scientists*. Chapter 7 - *Cellulosics*. Eagen Press, St Paul, MN, 1997.
- [3]-Acesso em: <http://www.lsbu.ac.uk>, 18/04/2013.
- [4]-DUCKETT, K.E. Surface Properties of Cotton Fibers", Surface Characteristics of Fibers and Textiles, edited by M.J.Schick. –*Fiber Science Series*", Marcel Dekker, Inc. 1975, p 67
- [5]- KLEMM, D.; HEUBLEIN, B.; FINK, H-P.; BOHN, A. Cellulose: Fascinating Biopolymer and Sustainable Raw Material, *Angewandte Chemie*, v. 44, p.3358-3393, 2005.
- [6]-MOON, J. R.; MARTINI, A.; NAIRN, J.; SIMONSEN, J.; YOUNGBLOOD, J. Cellulose nanomaterials review: structure, properties and nanocomposites. *Chem. Soc.Rev.*, v. 40, p. 3941-3994, 2002.
- [7]-KESH, S.; K. SAMESHIMA. Influence of lignosulfonate on crystal structure and productivity of bacterial cellulose in a static culture. *Enzyme Microb.Technol.*, v.40, p. 4-8, 2006.
- [8]-KERSTERS, K.; LISDIYANTI, P.; KOMAGATA, K.; SWINGS, J. The Family Acetobacteraceae: The genera Acetobacter, Acidomonas, Asaia, Gluconacetobacter, Gluconobacter and Kozakia. *Prokaryotes*, v. 5, p. 163-200, 2006
- [9]- PECORARO, E.; MANZANI, D.; MESSADDEQ, Y.; RIBEIRO, S.J.L.; Bacterial cellulose from gluconoacetobacter xylinus – obtaining, some properties and applications.
- [10]-HERNANE DA SILVA BARUD. Novos Materiais Multifuncionais Baseados em Celulose Bacteriana- *Tese de doutorado*, p. 31, 2010.
- [11]-KLEMM, D.; SCHUMANN, D.; UDHARDT, U.; MARSCH, S. Bacterial synthesized cellulose-artificial blood vessels for microsurgery. *Prog. Polymer Sci.*, v. 26, p.1561-1603, 2001.
- [12]-BROWN, A.J. On an acetic ferment which forms cellulose. *J.Chem.Soc.Trans.*, v. 49, p.432-439, 1886
- [13]-SHODA, M.; SUGANO, Y. Recent advances in bacterial cellulose production. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, v. 10, p. 1-8, 2005.
- [14]-CZAJA, W.K.; YOUNG, D. J.; KAWECKI, M.; BROWN, J. R. The future prospects of microbial cellulose in biomedical applications. *Biomacromolecules*, v. 8, p.1-12, 2007
- [15]-MENEZES, A.J.; KAPOOR, V.J.; GOEL, V.K.; CAMERON, B. D.; LU, Y. Within a Nanometer of your Life. *Mech. Engng*, v.123, p. 54–58, 2001.
- [16]- HULL. *An introduction to composite materials*. Cambridge solid state science series. University press, 1993.
- [17]-KAMEL, S. Nanotechnology and its applications in lignocellulosic composites, a mini review. *Express Polymer Letters*, v.1, p. 546–575, 2007.
- [18]-XIE, K., YU, Y., SHI, Y. Synthesis and characterization of cellulose/silica hybrid materials with chemical crosslinking. *Carbohydrate Polymers*, v. 78, p. 799–805, 2009.
- [19]-ASHORIA, A.; SHEYKHNAZARIB, S.; TABARSAB, T.; SHAKERIC, A.; GOLALIPOURD, M. Bacterial cellulose/silica nanocomposites: Preparation and characterization, *Carbohydrate Polymers*, v. 90, p.413-418, 2012.
- [20]-SASKA, S.; BARUD, H. S.; GASPAR, A. M. M.; MARCHETTO, R.; RIBEIRO, S. J. L.; MESSADDEQ, Y. Bacterial Cellulose -Hydroxyapatite Nanocomposites for Bone Regeneration. *International Journal of Biomaterials*, v.2011, p.8, 2011.
- [21]- BARUD, H. S.; REGIANI, T.; MARQUES, R. F. C.; LUSTRI, W. R.; MESSADDEQ, Y.; RIBEIRO, S. J. L. Antimicrobial Bacterial Cellulose-Silver Nanoparticles Composite Membranes. *Journal of Nanomaterials*, v. 2011, p.8, 2011.

- [22]-TROVATTI, E.; FERNANDES, S. C. M.; RUBATAT, L.; FREIRE, C. S. R.; SILVESTRE, A. J. D.; NETO, C. P. Sustainable nanocomposite films based on bacterial cellulose and pullulan. *Cellulose*, v. 19, p. 729-737, 2012.
- [23]-FERNANDES, S. C. M.; OLIVEIRA, L.; FREIRE, C. S. R.; SILVESTRE, A. J. D.; NETO, C. P.; GANDINIA, A.; DESBRIÈRES, J. Novel transparent nanocomposite films based on chitosan and bacterial cellulose, *Green Chemistry*, v.11, p.2023-2029, 2009.
- [24]-JIN, H. J.; KAPLAN, D. L. Mechanism of silk processing in insects and spiders. *Nature*. v.424, 2003.
- [25]- ASAKURA T.; KAPLAN D. L. Silk Production and Processing. *Encyclopedia Agricultural Science*, v.4, p. 1-11, 1994.
- [26]-HU, X.; SHMELEV, K.; SUN, L.; GIL, E. S.; PARK, S. H.; CEBE, P.; KAPLAN, D. L. Regulation of Silk Material Structure by Temperature-Controlled Water Vapor Annealing, *Biomacromolecules*, v.12, p. 1686-1696, 2011.
- [27]-ALTMAN, G. H.; DIAZ, F.; JAKUBA, C.; CALABRO, T.; HORAN, R.L.; CHEN, J. Silk- based biomaterials. *Biomaterials* , v.24, p.401-416,2003.
- [28]-MONDAL, K.; TRIVEDI, S.; KUMAR, N. The silk proteins, sericin and fibroin in silkworm, *Bombyx mori* - a review. *Journal of Environmental Sciences* , v.5, p. 63-76, 2007.
- [29]-LI, R.; ZHANG, Y.; ZHU, L.; YAO, J. Fabrication and Characterization of Silk Fibroin/Poly(ethylene glycol)/Cellulose Nanowhisker Composite Films. *Wiley Online Library*, 2011.
- [30]- KWEON, H.; HA, H. C.; UM, I. C.; PARK, Y. H. Physical properties of SF/chitosan blend films. *Journal of Applied Polymer Science*, v.80, p. 928–934,2001.
- [31]-NOISHIKI, Y.; NISHIYAMA, Y.; WADA, M.; KUGA, S.; MAGOSHI, J. Mechanical Properties of Silk Fibroin–Microcrystalline Cellulose Composite Films, *Inc. J Appl Polym Sci*, v. 86, p.3425–3429, 2002.
- [32]-IMSOMBUT, T.; SRISUWAN, Y.; SRIHANAM, P.; BAIMARK, Y. Genipin-Cross-linked silk fibroin microspheres prepared by the simple water-in-oil emulsion solvent diffusion method. *Powder Technology*, v.203, p.603–608,2010.
- [33]-MORELLI, F. C. Nanocompósito de PP/PP-g-AM/Argila Organofílica: Processamento, Propriedades Mecânicas, Termo-Mecânicas e de Permeação de Gás. 2009. 142p. Dissertação (Mestrado em Química) – Departamento de Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos. 2009
- [34]-RETEGI, A.; ALGAR, I.; MARTIN, L.; ALTUNA, F.; STEFANI, P.; ZULUAGA, R.; GANˆAN, P.; MONDRAGON, I. Sustainable optically transparent composites based on epoxidized soy-bean oil (ESO) matrix and high contents of bacterial cellulose (BC), *Cellulose*, v.19, p103-109, 2012.
- [35]-DAHMAN, Y.; OKTEM, T. Optically Transparent Nanocomposites Reinforced with Modified Biocellulose Nanofibers. *Wiley Online Library*, 2012.
- [36]-BARUD, H. S.; CAIUT, J. M. A.; DEXPERT-GHYS, J.; MESSADDEQ, Y.; RIBEIRO, S. J. L. A Transparent bacterial cellulose–boehmite–epoxy-siloxane nanocomposites. *Composites Part A: Applied Science and Manufacturing*. v.43, p.973-977, 2012.
- [37]-TINGAUT, P.; ZIMMERMANN, T.; GILLES SÈBE, J. Cellulose nanocrystals and microfibrillated cellulose as building blocks for the design of hierarchical functional materials. *Mater. Chem.*, v.22, p.20105,2012.
- [38]- IGUCHI, M.; YAMANAKA, S.; BUDHIONO, A. Bacterial cellulose—amasterpiece of nature’s arts, *Journal of Materials Science*, v. 35, p. 261–270, 2000.
- [39]-TROVATTI, E.; OLIVEIRA, L.; FREIRE, C. R. S.; SILVESTRE, A. J. D.; NETO, C. P.; PINTO, J. J. C.; GANDINI, A. Novel bacterial cellulose-acrylic resin nanocomposites, *Composites Science and Technology*, v.70, p1148-1153,2010.

- [40]- Kweon, H.; Ha, H. C.; Um, I. C.; Park, Y. H. Physical properties of silk fibroin/ chitosan blend films. *J. Applied Polym. Sci.*, v.80, p.928-934, 2001.
- [41]- MANFREDINI, L. B.; RODRÍGUEZ, E. S.; WLADYKA-PRZYBYLAK, M.; VÁZQUEZ, A. Thermal degradation and fire resistance of unsaturated polyester, modified acrylic resins and their composites with natural fibres, *Polymer degradation and stability*, v. 91, p. 255-261, 2006.
- [42]- FREDDI, G.; PESSINA, G.; TSUKADA, M. Swelling and dissolution of silk fibroin (*Bombyx mori*) in N-methyl morpholine N-oxide. *Int. J. Biol. Macromolecul.* v.24, p.251–263, 1999.
- [43]-CAVALCANTI, O. A.; CICERI, L. Material de acondicionamento e embalagem primário: avaliação da permeabilidade ao vapor d'água. *Arq.ciênc.saude unipar*, v.6, p. 57-60, 2002.
- [44]-AMORIM, W. L.; COSTA, H. O.; SOUZA, F. C.; CASTRO, M. G.; SILVA, L. Estudo experimental da resposta tecidual à presença de celulose produzida por *Acetobacter xylinum* no dorso nasal de coelhos. *Revista brasileira de otorrinolaringologia*.v.75, 2009.
- [45]-SAMPAIO, S.; MIRANDA, T. M. R.; SANTOS, J. G.; SOARES, A. M. B. Preparation of silk fibroin–poly(ethyleneglycol) conjugate films through click chemistry, *Polym Int* ,v.60, p.1737-1744, 2011.

