

Eduardo Niehues

**Elaboração e Caracterização de Membranas de Gelatina
Eletrofiadas e Modificadas por Glutaraldeído ou Nanocristais de
Celulose**

Tese submetida ao Programa de Pós
Graduação em Engenharia Química da
Universidade Federal de Santa
Catarina para a obtenção do Grau de
Doutor em Engenharia Química, Área
de concentração Desenvolvimento de
processos Químicos e Biotecnológicos.
Orientadora: Prof.^a Dr.^a Mara Gabriela
Novy Quadri.

Florianópolis
2015

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Niehues, Eduardo

Elaboração e caracterização de membranas de gelatina eletrofiadas e modificadas por glutaraldeído ou nanocristais de celulose / Eduardo Niehues ; orientadora, Mara Gabriela Novy Quadri - Florianópolis, SC, 2015.
91 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química.

Inclui referências

1. Engenharia Química. 2. Eletrofição de gelatina. 3. Bionanocompósito. 4. Membranas fibrosas. I. Quadri, Mara Gabriela Novy. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. III. Título.

Dedico este trabalho às pessoas mais importantes da minha vida, meus pais, meus irmãos e minha noiva.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter guiado o meu caminho e me dado forças nos momentos mais difíceis.

À minha família (Jairo, Eli, Angela, Luciano, Mauricio, Aline, Vinicius, Felipe, Eduardo, Marco Antônio e Manuela) pela união, amizade e apoio incondicional.

À minha noiva, Mariana Manfroi, que esteve ao meu lado e dedicou boa parte do seu tempo contribuindo de forma direta para a realização deste trabalho.

À professora Dra. Mara Gabriela Novy Quadri pela orientação e dedicação na minha formação.

Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química (PósENQ).

Ao professor Dr. Ricardo Antonio Machado, coordenador do PósENQ.

A todos os professores do PósENQ.

Ao secretário do PósENQ, Edevilson, que sempre me auxiliou quando precisei.

Aos professores responsáveis e aos técnicos dos laboratórios: Propriedades Físicas de Alimentos PROFI; Controle de Processos LCP; Central de microscopia eletrônica LCME; Central de Análises do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos da UFSC; Central de Biologia Molecular, CEBIME.

Aos colegas de laboratório do LASIPO.

À Gelnex por ter cedido gentilmente amostras de gelatina para o desenvolvimento do trabalho.

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pela bolsa concedida.

A Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) pela formação profissional.

Ao Instituto Federal de Santa Catarina (IFSC), Campus Florianópolis, pelo afastamento concedido para finalização do doutorado.

Aos membros da banca pela contribuição no aprimoramento do trabalho.

Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos.

(Isaac Neewton)

RESUMO

ELABORAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MEMBRANAS DE GELATINA ELETROFIADAS MODIFICADAS COM GLUTARALDEÍDO E NANOCRISTAIS DE CELULOSE. A gelatina é um polímero obtido a partir do colágeno que apresenta diferentes características e propriedades dependendo da fonte e método de obtenção. Este trabalho tem como objetivo compreender como o tamanho da estrutura molecular da gelatina afeta o processo de eletrofiacção e as propriedades das membranas fibrosas (MF) e avaliar o efeito na reticulação da gelatina com glutaraldeído e o reforço mecânico promovido por nanocristais de celulose (NCs). Foram realizadas eletrofiacções a partir de gelatinas com diferentes índices Bloom, 90 (GeB90), 250 (GeB250) e 280 g (GeB280) em ácido acético (HAc) com 89,6 % (v/v) e com diferentes concentrações do biopolímero. As soluções precursoras foram caracterizadas quanto à viscosidade e condutividade elétrica e as MF por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e ensaios de tração. Os resultados indicam que a eletrofiacção é melhor sucedida quando a viscosidade das soluções tem valor entre 300 e 700 mPa s independente do tipo de gelatina utilizada. Com relação à morfologia, houve aumento do diâmetro médio das fibras (d_m) com o aumento da viscosidade e da condutividade elétrica das soluções, sugerindo que as forças viscoelásticas superam as forças de Coulomb. As MF formadas a partir de GeB250 e GeB280 mostraram comportamento elástico enquanto as formadas pela GeB90 mostraram-se frágeis. As MF de GeB280 na concentração de 18 % (m/v) foram reticuladas em vapores de glutaraldeído e avaliadas quanto ao grau de reticulação, durabilidade ao escoamento aquoso a 23 °C e solubilidade em água a 30 e 40 °C. Os resultados demonstraram que MF aproximadamente 69 % reticuladas, apresentam-se praticamente insolúveis em sistemas aquosos a 23 e 30 °C. Nanocristais de celulose foram adicionados à solução de gelatina com concentrações entre 1 e 4 % (m/m) e então eletrofiados. Os resultados obtidos por espectroscopia infravermelho (ATR-FTIR) e análise termogravimétrica (TGA) sugerem interações do tipo ligação de hidrogênio entre os dois polímeros e os ensaios mecânicos resultaram em aumento de duas vezes no módulo de Young.

Palavras-chave: Eletrofiacção de gelatina. Bionanocompósito. Membranas fibrosas.

ABSTRACT

PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF ELECTROSPUN GELATIN MEMBRANES MODIFIED WITH GLUTARALDEHYDE AND CELLULOSE NANOCRYSTALS.

Gelatin is a polymer obtained from collagen which properties depends on the source and production method. This study aims to understand how some properties of gelatin affect the electrospinning process and the fibrous membrane (FM) formed besides evaluating the crosslinking of the FM by glutaraldehyde and the reinforce promoted by cellulose nanocrystals. The electrospinning were performed from gelatins with different Bloom indexes, 90 (GeB90), 250 (GeB250) and 280 g (GeB280) in acetic acid 89.6 % (v/v) varying the polymer concentration. Solutions were evaluated according to their viscosity and electrical conductivity and the FM by scanning electron microscopy (SEM) and tensile tests. Results indicate a successful electrospinning process for viscosities found within the range of 300 to 700 mPa s, apart the type of gelatin used. Regarding morphology, it was observed an increase in the average diameter of the fibers with the increasing viscosity and electrical conductivity of the solutions, suggesting that viscoelastic forces exceed the Coulomb forces. The FM formed from GeB250 and GeB280 showed elastic behavior as for GeB90 was brittle. The FM GeB280, 18 w/v%, crosslinked with glutaraldehyde vapors were evaluated for crosslinking degree, durability to aqueous flow at 23 °C and water solubility at 30 to 40 °C. The results showed that approximately 69 % crosslinking became the FM practically insoluble in aqueous systems at 23 and 30 °C. Cellulose nanocrystals (CNs), added 1 to 4 % wt to gelatin solution and electrospun suggested, by ATR-FTIR and TGA analysis, hydrogen bonds type interactions between the two polymers. Mechanical tests result in two-fold increase in the stiffness, given by the Young's modulus.

Keywords: Electrospinning of gelatin. Bio-nanocomposites. Fibrous membrane.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Publicações relacionadas à temas de eletrofiação.....	29
Figura 2: Sistema de eletrofiação composto por bomba de infusão, seringa equipada com agulha, fonte de alta tensão e coletor aterrado...	30
Figura 3: Representação esquemática da formação do cone de Taylor.	30
Figura 4: Imagens microscopia eletrônica de varredura das fibras de polímero eletrofiadas sem grânulos (a), com grânulos (b) e com gotas (c), obtidas por microscopia eletrônica de varredura.	31
Figura 5: Estrutura dos principais aminoácidos constituintes do colágeno tipo I.	36
Figura 6: Representação da estrutura secundária do colágeno em hélice nos modelos de bola e bastão (a) e bola de preenchimento (b). Em (c) representação da tripla-hélice.	37
Figura 7: Aumento na intensidade de cor da gelatina extraída em função da etapa de extração.	38
Figura 8: Fórmula estrutural do glutaraldeído.....	39
Figura 9: Fórmula estrutural da Ninidrina.....	40
Figura 10: Estrutura química da celulose.....	40
Figura 11: Estrutura química dos nanocristais de celulose produzidos via hidrólise da celulose em ácido sulfúrico.	41
Figura 12: Soluções de gelatina de diferentes índices 18 % (m/v) em ácido acético 89,6 % (v/v).....	43
Figura 13: Sistema de eletrofiação e condições experimentais utilizando coletor estático (a) e cilíndrico rotatório (b).....	47
Figura 14: (A) Modelo de papel usado para preparar as amostras da membrana fibrosa para o ensaio de tração e (B) modelo de uma amostra para o ensaio de tração.	48
Figura 15: Esquema do aparato utilizado para determinação da durabilidade das membranas ao escoamento aquoso.	50
Figura 16: Espectros FTIR de pó de gelatina de diferentes índices Bloom.....	56
Figura 17: Viscosidade em função da concentração de gelatina para soluções de gelatina de três diferentes índices Bloom em solução aquosa de ácido acético 89,6 % v/v.....	58
Figura 18: Microscopia eletrônica de varredura das MF obtidas a partir das soluções de gelatina em ácido acético 89,6 % (v/v). O índice Bloom e a concentração da solução são mostrados abaixo de cada imagem (ampliação = 10000x, barra de escala = 1 μ m).	60
Figura 19: Diâmetro médio das fibras eletrofiadas a partir de GeB90, GeB250 e GeB280 plotadas em função da concentração (a) e da	

viscosidade (b) das soluções. Ao lado as imagens MEV das fibras de GeB90, GeB250 e GeB280 nas concentrações ou viscosidades especificadas.	62
Figura 20: Curvas de tensão-deformação de membranas eletrofiadas a partir de diferentes concentrações de GeB90, GeB250 e GeB280.....	65
Figura 21: Imagens das membranas de gelatina eletrofiadas. A, não reticulada; B, C, D, E e F reticuladas em 2,5 % (v/v) de GTA por 45, 60, 180, 360 e 4320 min respectivamente.....	67
Figura 22: Imagens de microscopia eletrônica de varredura das membranas de gelatina eletrofiadas: (A) não reticulada e (B) reticulada em 2,5% (v/v) de GTA por 3 dias.	67
Figura 23: Efeito da variação da concentração de GTA no grau de reticulação de MF de gelatina reticuladas por 4320 min.	68
Figura 24: Efeito do tempo no grau de reticulação das MF de gelatina mantendo constante a concentração de GTA em 2,5% (v/v).	69
Figura 25: MEV-FEG das membranas fibrosas: GeCN0 (a e b), GeCN1 (c e d), GeCN2 (e e f), GeCN3 (g e h) e GeCN4 (I e j); a, c, e, g, i: 10,000×; b, d, f, h, j: 100,000×.	72
Figura 26: Espectro FTIR de membranas fibrosas eletrofiadas e filme de NCs.	74
Figura 27: Curvas de TG (a) e DTG (b) das MF de gelatina eletrofiadas com diferentes quantidades de NCs.	75
Figura 28: Curvas tensão-deformação de membranas de gelatina eletrofiadas com diferentes teores de NCs.	77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Fatores e respectivos níveis utilizadas no planejamento fatorial para eletrofição de GeB280.	44
Tabela 2: Habilidade de eletrofição para as 16 condições experimentais do planejamento fatorial.	53
Tabela 3: Habilidade de eletrofição para soluções de GeB280 18% (m/v) com diferentes concentrações de HAC, distância entre agulha e o coletor de 17 cm, vazão de 10 µL/min e diferença de potencial elétrico de 17 kV.	54
Tabela 4: Habilidade de eletrofição, viscosidade e condutividade elétrica de soluções com diferentes concentrações de GeB90, GeB250 e GeB280 em solução aquosa de ácido acético 89,6 % (v/v).	57
Tabela 5: Propriedades mecânicas das MF eletrofiadas a partir de soluções de gelatina de diferentes índices Bloom em ácido acético 89,6 % (v/v).	63
Tabela 6: Teste de Tukey aplicado para o módulo de Young das MF com diferentes índices Bloom.	64
Tabela 7: Teste de Tukey aplicado para a Tensão máxima de tração das MF com diferentes índices Bloom.	64
Tabela 8: Teste de Tukey aplicado para a deformação na ruptura das MF com diferentes índices Bloom.	64
Tabela 9: Imagens de MEV, diâmetro médio das fibras, espessura média da membrana e dimensões das membranas obtidas a partir de solução de GeB280 18 % (m/v) em ácido acético 89,6 % (v/v) coletadas em coletores estático e cilíndrico rotatório.	66
Tabela 10: Variação da porcentagem de massa solúvel da membrana de gelatina reticulada em 2,5 % (v/v) de GTA em função do tempo de reticulação nas temperaturas de 30 e 40 °C.	70
Tabela 11: Porcentagem de durabilidade ao escoamento de membranas de gelatina reticuladas, em 2,5 % (v/v) de GTA, em função do tempo de reticulação.	71
Tabela 12. Diâmetro das fibras das correspondentes MF.	73
Tabela 13. Temperatura na taxa máxima de perda de massa (T_D) e os correspondentes valores dos picos onset.	75
Tabela 14: Propriedades mecânicas das MF de gelatina com diferentes teores de NC.	77
Tabela 15: Solubilidade após 24h sob agitação suave a 25°C.	78

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATR-FTIR = Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier-Refletância Total Atenuada
 d_m = diâmetro médio das fibras
DTG = Termogravimetria derivativa
FTIR = Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier
GeB90 = Gelatina Bloom 90
GeB250 = Gelatina Bloom 250
GeB280 = Gelatina Bloom 280
GeNC = Gelatina-nanocristais de celulose
GR = Grau de reticulação
GTA = Glutaraldeído
HAc = Ácido acético
HE = Habilidade de eletrofição
MEV = Microscopia Eletrônica de Varredura
MEV-FEG = Microscopia Eletrônica de Varredura com Emissão de Campo
MF = Membranas fibrosas
NC = Nanocristal de celulose
TGA = Análise Termogravimétrica

LISTA DE SÍMBOLOS

E : Módulo de Young (MPa)

σ_{\max} : Tensão máxima de tração (MPa)

ε_b : Deformação na ruptura (%)

T_{onset} : Temperatura de início de decomposição ($^{\circ}\text{C}$)

T_D : Temperatura na taxa máxima de perda de massa ($^{\circ}\text{C}$)

e : espessura média da membrana (μm)

η_{ap} : viscosidade aparente (mPa.s)

σ : condutividade ($\mu\text{S}/\text{cm}$)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	25
1.1 JUSTIFICATIVAS	26
1.2 OBJETIVOS	27
1.2.1 Objetivo Geral	27
1.2.2 Objetivos Específicos	27
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	29
2.1 ELETROFIAÇÃO	29
2.1.1 Parâmetros de processo de eletrofiação	31
2.1.1.1 Vazão da solução polimérica	31
2.1.1.2 Diferença de Potencial Elétrico no Sistema de Eletrofiação	32
2.1.1.3 Distância entre a ponta da agulha e o coletor	32
2.1.1.4 Tipo de coletor	33
2.1.2 Parâmetros de solução	33
2.1.2.1 Solvente	33
2.1.2.2 Viscosidade	34
2.1.2.3 Condutividade elétrica	34
2.1.2.4 Tensão superficial	35
2.1.3 Parâmetros ambientais	35
2.1.3.1 Temperatura do processo de eletrofiação	35
2.1.3.2 Umidade relativa	35
2.2 CARACTERÍSTICAS E PROPRIEDADES DE GELATINA E CELULOSE	36
2.2.1 Gelatina	36
2.2.1.1 Reticulação	38
2.2.2 Nanocristais de celulose	40
2.3 APLICAÇÕES DE GELATINA E NANOCRISTAIS DE CELULOSE EM ELETROFIAÇÃO	41
3 MATERIAL E MÉTODOS	43
3.1 MATERIAL	43
3.2 MÉTODOS	43
3.2.1 Preparo das soluções e suspensões	43
3.2.2 Planejamento fatorial	44
3.2.3 Extração de Nanocristais de Celulose	45
3.2.4 Determinação da concentração de NCs	45
3.2.5 Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)	46
3.2.6 Viscosidade	46

3.2.7 Condutividade elétrica	46
3.2.8 Eletrofiação	46
3.2.9 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	47
3.2.10 Análise Termogravimétrica (TGA).....	48
3.2.11 Propriedades mecânicas.....	48
3.2.12 Reticulação em glutaraldeído	49
3.2.13 Grau de reticulação	49
3.2.14 Solubilidade em água.....	50
3.2.15 Durabilidade das membranas em escoamento aquoso.....	50
3.2.16 Análise estatística.....	51
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
4.1 AVALIAÇÃO DA HABILIDADE DE ELETROFIAÇÃO.....	53
4.1.1 Planejamento fatorial 2 ⁴	53
4.1.2 Variação da concentração de HAc.....	54
4.2 ELETROFIAÇÃO DE GELATINAS COM DIFERENTES ÍNDICES BLOOM.....	55
4.2.1 FTIR.....	55
4.2.2 Variação das concentrações de GeB90, GeB250 e GeB280	56
4.2.3 Morfologia	59
4.2.4 Propriedades mecânicas.....	62
4.3 RETICULAÇÃO	66
4.3.1 Coletor cilíndrico rotatório.....	66
4.3.2 Morfologia	66
4.3.3 Grau de reticulação	67
4.3.4 Solubilidade.....	69
4.3.5 Durabilidade ao escoamento.....	70
4.4 EFEITO DA ADIÇÃO DE NANOCRISTAIS DE CELULOSE	71
4.4.1 Morfologia	71
4.4.2 ATR-FTIR.....	73
4.4.3 Propriedades térmicas.....	74
4.4.4 Propriedades mecânicas das membranas fibrosas GeNC..	76
4.4.5 Solubilidade.....	77
5 CONCLUSÕES.....	79
5.1 SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS	80
REFERÊNCIAS.....	81

1. INTRODUÇÃO

Entre as várias estruturas que têm sido recentemente desenvolvidas na área da nanotecnologia estão as nanofibras eletrofiadas a partir de polímeros naturais e sintéticos, processo este que utiliza forças eletrostáticas para a sua fabricação. Embora a técnica seja conhecida há mais de um século, somente nos últimos quinze anos a técnica ganhou maior projeção, não só devido à sua versatilidade para obtenção de uma grande variedade de fibras poliméricas, mas também devido à sua capacidade em produzir fibras consistentes com diâmetros de micrômetro a nanômetro, o que é difícil de ser obtido por outras tecnologias de fiação de fibras.

A técnica de eletrofiação consiste, basicamente, na aplicação de um intenso campo elétrico entre uma gota da solução polimérica contida em um capilar ou agulha, e um coletor aterrado, situado a uma distância finita à frente da agulha. Quando as forças de repulsão elétrica superam a tensão superficial da gota, um jato da solução polimérica é lançado em direção ao coletor. Durante este trajeto, o solvente evapora e as fibras poliméricas são depositadas no coletor. Os parâmetros que influenciam a eletrofiação são parâmetros de processo, ou seja, diferença de potencial aplicada, tipos de coletores, distância entre o coletor e a ponta da agulha e vazão da solução; os parâmetros ambientais que influenciam no processo são a temperatura e a umidade, enquanto que, dentre os parâmetros de solução podem ser citados, a viscosidade, a condutividade e a tensão superficial (BHARDWAJ; KUNDU, 2010). Portanto, produzir membranas fibrosas (MF) consistentes requer a escolha de um solvente adequado para o polímero específico a ser eletrofiado, bem como o ajuste dos diversos parâmetros citados.

Devido às características únicas das MF eletrofiadas, como por exemplo a alta relação da superfície:volume e a grande quantidade de poros com tamanhos pequenos, suas aplicações são amplas. Abrange diversos campos de aplicação, como em catálise, engenharia de tecidos, proteção de roupas, filtração, membranas de afinidade, bem como diversas áreas de saúde, biomédica, farmacêutica, biotecnologia e engenharia ambiental (LUU et al., 2003; SUBBIAH et al., 2005; CUI et al., 2006; MA; KOTAKI; RAMAKRISHNA, 2006; RAMAKRISHNA et al., 2006; WELLE et al., 2007). Inúmeros pesquisadores têm eletrofiado com sucesso uma variedade de polímeros naturais e sintéticos (FONG; CHUN; RENEKER, 1999; MA; KOTAKI; RAMAKRISHNA, 2005; YOSHIMATSU et al., 2008; OKUTAN; TERZI; ALTAY, 2014). No entanto, a abundância natural de

biopolímeros, a variedade de suas estruturas químicas, a não toxicidade e sua biodegradabilidade são características que fazem desta classe de polímeros fonte de matéria-prima de grande potencial.

A gelatina é um exemplo de biopolímero. Esta proteína, obtida a partir da hidrólise ácida ou alcalina do colágeno, é extraída, principalmente, de pele ou ossos de bovinos e suínos. A origem do colágeno, além do tipo e intensidade da hidrólise, resulta na obtenção de gelatinas com diferentes estruturas moleculares e, conseqüentemente, diferentes propriedades físico-químicas. As MF eletrofiadas a partir de gelatina têm sido utilizadas principalmente no desenvolvimento de matriz extracelular artificial para engenharia de tecidos, curativos para cicatrização de ferimentos e liberação de fármaco.

Outro biopolímero que ganhou atenção nos últimos anos é a celulose em sua forma nanocristalina, obtida a partir da hidrólise da celulose. Insolúvel em água, o nanocristal de celulose (NC) é um dos biopolímeros mais fortes e rígidos, característica esta que lhe garante aplicação como carga de reforço em estruturas poliméricas mais frágeis. Tem sido, além disso, utilizada em implantes biomédicos, produtos farmacêuticos, administração de fármacos, entre outros (DURAN; LEMES; SEABRA, 2012).

1.1 JUSTIFICATIVAS

A gelatina é um biopolímero facilmente obtido a partir da hidrólise parcial do colágeno com disponibilidade comercial e com baixo custo, o que a torna atraente para a produção de MF a partir da técnica de eletrofição. Pesquisadores têm eletrofiado gelatina avaliando o tipo de solvente utilizado (CHOKTAWEEESAP et al., 2007; SONG; KIM; KIM, 2008; SONGCHOTIKUNPAN; TATTIYAKUL; SUPAPHOL, 2008; ZHA et al., 2012; ERENCIA et al., 2014), os parâmetros experimentais (HUANG et al., 2004; KI et al., 2005; OKUTAN; TERZI; ALTAY, 2014) e tipo de gelatina quanto ao método de hidrólise, ácida (tipo A) ou básica (tipo B) (RATANAVARAPORN et al., 2010). Considerando a diversidade de estruturas químicas da gelatina e o grande potencial de aplicação das membranas fibrosas deste polímero, este trabalho foi motivado a investigar, pela primeira vez, a influencia do índice Bloom da gelatina no processo de eletrofição, bem como caracterizar as MF formadas. Mecanicamente fracas e solúveis em água, as membranas de gelatina eletrofiadas são difíceis de serem utilizadas em aplicações de longo prazo. Estas propriedades têm sido melhoradas pela adição de outro polímero como por exemplo, o nylon

(PANTHI et al., 2013) e o poli (ácido 3 - hidroxibutírico) (NAGIAH et al., 2013) ou ainda através da reticulação por radiação UV (LIN; TSAI, 2013), formaldeído (DE CARVALHO; GROSSO, 2004), glutaraldeído (ZHANG et al., 2006), carbodiimida (STAROSZCZYK et al., 2012), dextrano dialdeído (SCHACHT et al., 1997), genipin (PANZAVOLTA et al., 2011) e transglutaminase (PIOTROWSKA et al., 2008). Neste contexto, este trabalho propõe incorporar nanocristais de celulose na matriz polimérica de gelatina a fim de que, a partir das interações intermoleculares geradas entre estes dois polímeros, membranas fibrosas sejam produzidas com melhores propriedades mecânicas e de solubilidade em água. Além disso, esta pesquisa buscou minimizar o uso de glutaraldeído e estabelecer uma relação entre o grau de reticulação e a solubilidade em água das membranas.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Geral

Avaliar as condições de processo para eletrofiação de gelatinas de diferentes índices Bloom e o efeito de nanocristais de celulose ou glutaraldeído nas propriedades mecânicas e na solubilidade em água das MF formadas.

1.2.2 Objetivos Específicos

Determinar as características físicas pertinentes à solução que produzam as melhores condições de eletrofiação para diferentes tipos de gelatina;

Caracterizar as membranas de gelatinas de diferentes índices Bloom; obtidas a partir do processo de eletrofiação, com relação à morfologia e propriedades mecânicas;

Caracterizar as membranas reticuladas por glutaraldeído em diferentes condições quanto à morfologia e o grau de reticulação;

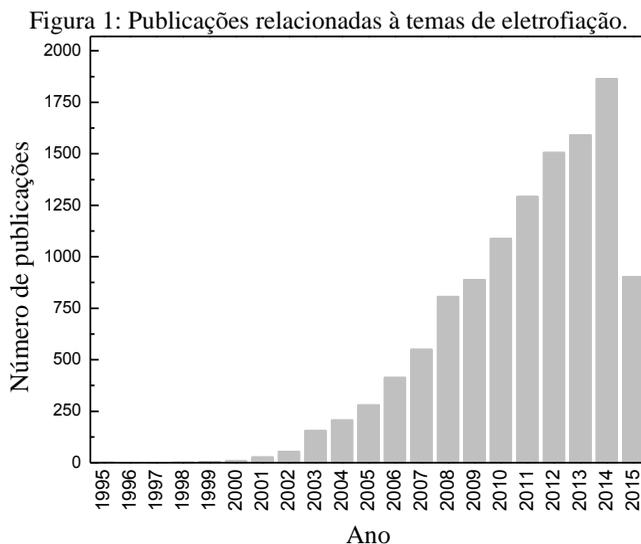
Estabelecer uma relação entre o grau de reticulação das MF de gelatina e a durabilidade em sistemas aquosos;

Caracterizar as membranas formadas a partir do compósito gelatina/nanocristais de celulose quanto à morfologia, solubilidade, propriedades térmicas e mecânicas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ELETROFIAÇÃO

As primeiras observações acerca da técnica de eletrofiação foram realizadas por Rayleigh em 1897, posteriormente estudada em detalhes por Zeleny em 1914, chamada de “electrospraying”, e patenteada por Formhals em 1934. O trabalho de Taylor em 1969 lançou as bases para o “electrospinning” que passou a ter este nome apenas por volta de 1994 (BHARDWAJ; KUNDU, 2010). A Figura 1 mostra a evolução da quantidade de publicações relacionadas à temas de eletrofiação. Como pode ser observado, passou de menos de 100 publicações por ano no início do século XXI, para mais de 1865 em 2014. O aumento do número de publicações na área de eletrofiação é resultado do crescente interesse no desenvolvimento de nanotecnologia e representa o grande potencial de aplicação dos materiais produzidos por esta técnica.

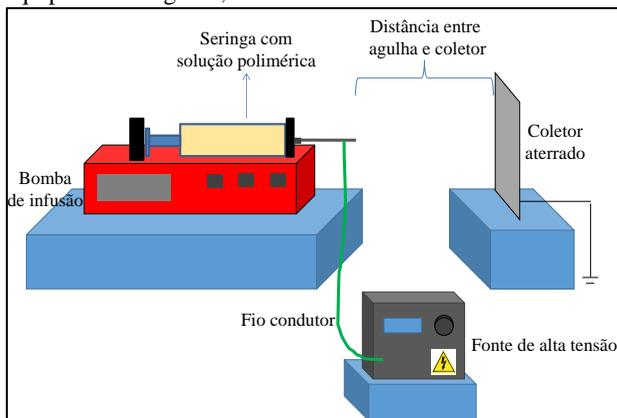


Fonte: web of knowledge (Pesquisa realizada com a palavra “electrospinning” ou “electrospun” no título).

O sistema de eletrofiação é composto por três componentes básicos: uma fonte de alta tensão, um tubo capilar (por exemplo, uma agulha) e um coletor aterrado (usualmente uma placa de metal). A agulha é ligada ao polo positivo da fonte de alta tensão e fica situado à

frente do coletor, este conectado ao polo negativo. O processo de eletrofição envolve a aplicação de um intenso campo elétrico em uma solução polimérica (ou o polímero fundido) através de uma distância finita entre a agulha e o coletor aterrado (DOSHI; RENEKER, 1995; RENEKER; CHUN, 1996; FRENOT; CHRONAKIS, 2003). Um esquema do sistema de eletrofição é apresentado na Figura 2.

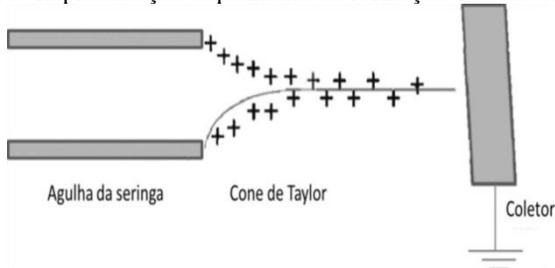
Figura 2: Sistema de eletrofição composto por bomba de infusão, seringa equipada com agulha, fonte de alta tensão e coletor aterrado.



Fonte: Desenvolvida pelo autor

Aplicando um campo elétrico de alta intensidade, as cargas se acumulam na superfície da gota do polímero líquido que está na ponta da agulha, desestabilizando a forma parcialmente hemisférica da gota para a forma de cone, chamada cone de Taylor, ilustrado na Figura 3 (KRIEGEL et al., 2008).

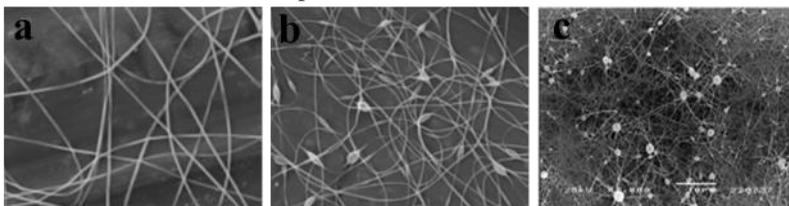
Figura 3: Representação esquemática da formação do cone de Taylor



Fonte: Adaptado de Kriegel et al. (2008).

No momento em que a força elétrica repulsiva supera a tensão superficial, um jato carregado da solução é ejetado da ponta do cone de Taylor. Uma vez que este jato é carregado, a sua trajetória pode ser controlada pelo campo elétrico. À medida que a solução viaja no ar, o solvente evapora e uma fibra de polímero carregada é fixada aleatoriamente no coletor. Assim, as fibras contínuas são dispostas para formar um filme tecido não tecido, como mostrado na Figura 4a (TAYLOR, 1969; YARIN; KOOMBHONGSE; RENEKER, 2001; GREINER; WENDORFF, 2007). No entanto, quando as condições experimentais não estão bem ajustadas, pode ocorrer a formação de grânulos, como pérolas em um fio, ou gotas como mostrado nas Figuras 4 b e c respectivamente.

Figura 4: Imagens microscopia eletrônica de varredura das fibras de polímero eletrofiadas sem grânulos (a), com grânulos (b) e com gotas (c), obtidas por microscopia eletrônica de varredura.



Fonte: Fong, Chun e Reneker (1999); Mit-Uppatham, Nithitanakul e Supaphol (2004).

A descrição a respeito do processo sugere a influência dos seguintes parâmetros sobre as características das fibras: as propriedades da solução, como viscosidade, condutividade elétrica e tensão superficial; variáveis de processo, como vazão, potencial elétrico na agulha e a distância entre a ponta da agulha e o coletor e ainda temperatura e umidade relativa, uma vez que estas duas últimas referem-se ao processo de secagem (BHARDWAJ; KUNDU, 2010).

2.1.1 Parâmetros de processo de eletrofiação

2.1.1.1 Vazão da solução polimérica

A vazão da solução polimérica na ponta da agulha injetora influencia a velocidade de lançamento do jato e a taxa de transferência do material para o meio externo da agulha. Vazões muito elevadas não são adequadas, pois não garantem o tempo necessário para a evaporação

do solvente (BHARDWAJ; KUNDU, 2010). Okutan; Terzi; Altay (2014) avaliaram o efeito de alguns parâmetros experimentais na morfologia de fibras de gelatina eletrofiadas e concluíram que o aumento da velocidade 0,1 para 1mL/h resultou em fibras mais espessas e formação de grânulos.

2.1.1.2 Diferença de Potencial Elétrico no Sistema de Eletrofição

A aplicação de elevadas diferenças de potencial elétrico na solução polimérica é essencial para a formação das fibras no processo de eletrofição. São as forças elétricas as responsáveis por gerar instabilidade no polímero e induzir a formação do cone de Taylor. Diversos autores obtiveram resultados diferentes ao avaliar o comportamento da diferença de potencial elétrico na eletrofição. Homayoni, Ravandi e Valizadeh (2009) observaram que o aumento da intensidade da diferença de potencial elétrico resultou na diminuição da espessura das fibras de quitosana. Já Okutan, Terzi e Altay (2014) observaram o aumento da espessura das fibras de gelatina ao aumentar a diferença de potencial elétrico. Entretanto, em ambas as pesquisas os autores relataram melhora na qualidade de eletrofição com o aumento da diferença de potencial elétrico, ou seja, observaram a diminuição da quantidade de grânulos. Alguns pesquisadores sugerem que com o aumento das forças elétricas, há maior quantidade ejetada de polímero, que contribui para a formação de fibras mais espessas. Outros pesquisadores relatam que aumentando a intensidade da diferença de potencial elétrico o efeito de repulsão eletrostática é maior no jato do fluido polimérico, o que favorece o estiramento e o consequente estreitamento do diâmetro da fibra (BHARDWAJ; KUNDU, 2010). Assim, o efeito deste parâmetro na morfologia das fibras não pode ser considerado de forma individual. É necessário considerar outros fatores, como o tipo de polímero, viscosidade da solução, vazão e distância da ponta da agulha ao coletor.

2.1.1.3 Distância entre a ponta da agulha e o coletor

O percurso do jato polimérico durante o processo de eletrofição inicia na ponta da agulha e termina no coletor. Portanto, é necessária uma distância mínima que permita a evaporação do solvente. Distâncias muito pequenas ou muito longas podem resultar na formação de grânulos. Este parâmetro não tem um efeito muito acentuado sobre a morfologia das fibras (BHARDWAJ; KUNDU, 2010). Ki et al. (2005)

avaliaram a influência da distância da ponta da agulha ao coletor nas características de fios de gelatina, obtidos com o processo de eletrofiação, e não observaram mudanças significativas na espessura das fibras. No entanto, com o aumento da distância muitas gotas foram observadas no coletor.

2.1.1.4 Tipo de coletor

No processo de eletrofiação, diferentes tipos de coletores podem ser utilizados como, por exemplo, grade de arame, barras paralelas, folhas de alumínio, cilindros rotatórios, entre outros. Em comparação com coletores estáticos, a utilização de coletores cilíndricos rotatórios pode resultar em fibras alinhadas, diminuição do diâmetro da fibra e aumento da área de coleta do filme mantendo a homogeneidade da espessura do filme. Segundo Huang et al. (2003), para obter fibras alinhadas, é necessário que a velocidade linear do cilindro seja igual a velocidade de voo do jato do polímero eletrofiado. Se a velocidade do cilindro for menor do que a velocidade de voo, os fios de polímero são depositados aleatoriamente. Entretanto, existe um limite de velocidade de rotação, acima do qual não é possível obter fibras alinhadas, já que rotações muito elevadas promovem a quebra do jato polimérico ao tocar o coletor.

2.1.2 Parâmetros de solução

2.1.2.1 Solvente

A obtenção de fibras eletrofiadas a partir de solução polimérica requer que o polímero apresente boa solubilidade no solvente escolhido e que este seja volátil na temperatura de eletrofiação. Alta volatilidade do solvente garante rápida separação de fase no processo de formação das nanofibras. Além disso, o solvente influencia de forma direta nas propriedades da solução, como na viscosidade, condutividade elétrica e na tensão superficial, provocando mudanças na morfologia das fibras formadas (CHOKTAWEESSAP et al., 2007). Pesquisadores têm avaliado o efeito de diversos solventes na eletrofiação de gelatina que, embora seja solúvel em água, apresenta limitação com este solvente devido ao processo de gelificação. Solventes como flúor álcoois apresentaram eficiência na eletrofiação de gelatina a temperatura ambiente (HUANG et al., 2004; CHOKTAWEESSAP et al., 2007). No entanto, sua alta citotoxicidade afeta a estrutura original da proteína (GAST et al., 2001).

Portanto, o ácido acético tem sido uma excelente opção para eletrofiar gelatina (CHOKTAWEESEAP et al., 2007; SONGCHOTIKUNPAN; TATTIYAKUL; SUPAPHOL, 2008; ERENCIA et al., 2014), pois além de eliminar o problema da gelificação não é tóxico em baixas concentrações.

2.1.2.2 Viscosidade

A viscosidade da solução polimérica desempenha um papel importante na qualidade de eletrofição. De modo geral, a viscosidade da solução está relacionada com o entrelaçamento das cadeias de moléculas poliméricas. O aumento no grau de entrelaçamento das cadeias resulta em maior resistência do material ao escoamento. Soluções de baixa viscosidade apresentam baixo grau de entrelaçamento das cadeias poliméricas aumentando a probabilidade de formação de grânulos ao invés de fibras. O aumento na viscosidade torna a solução mais resistente ao escoamento, aumentando o tempo de relaxação de tensão, que contribui para evitar a quebra do jato durante a eletrofição. No entanto, soluções muito viscosas geram dificuldade na ejeção do jato. A viscosidade está relacionada com a concentração da solução e a massa molar do polímero. O aumento na viscosidade da solução resulta no aumento da espessura das fibras (RAMAKRISHNA et al., 2005; BHARDWAJ; KUNDU, 2010). Vários pesquisadores estudaram a relação destas propriedades com a morfologia das fibras formadas por eletrofição, observando aumento da espessura das fibras com o aumento da viscosidade da solução, além de detectar a presença de grânulos e gotículas na eletrofição de soluções pouco viscosas (MITUPPATHAM; NITHITANAKUL; SUPAPHOL, 2004; SONGCHOTIKUNPAN; TATTIYAKUL; SUPAPHOL, 2008; GELTMEYER et al., 2013).

2.1.2.3 Condutividade elétrica

A condutividade elétrica da solução está relacionada com a quantidade de íons dissolvidos e depende do tipo de polímero e solvente utilizados e da presença de certas substâncias como, por exemplo, sais, ácidos ou bases. Como descrito no item 2.1, para ocorrer a eletrofição é necessário fornecer à solução polimérica carga suficiente para que as forças repulsivas superem a tensão superficial e a solução sofra alongamento. O aumento da concentração de íons na solução aumenta a habilidade desta solução em transportar cargas, permitindo maior

alongamento da solução e resultando em fibras mais finas (RAMAKRISHNA et al., 2005). No entanto, Mit-Uppatham, Nithitanakul e Supaphol (2004) observaram que a adição de sais na solução polimérica gerou aumento da condutividade elétrica e da viscosidade da solução, produzindo fibras mais espessas. O aumento na espessura das fibras foi atribuído ao aumento das forças viscoelásticas que superaram as forças de repulsão elétrica.

2.1.2.4 Tensão superficial

A tensão superficial da solução é a força a ser vencida para que ocorra a deformação da gota da solução na ponta da agulha. Geralmente, o aumento da tensão superficial das soluções dificulta o processo de eletrofiação e gera instabilidade do jato e a formação de grânulos (CHOKTAWEESSAP et al., 2007). Uma vez que a tensão superficial da solução precisa ser superada pela força elétrica repulsiva, o aumento da tensão superficial da solução requer aumento da tensão elétrica para a ejeção dos fios poliméricos (BHARDWAJ; KUNDU, 2010).

2.1.3 Parâmetros ambientais

2.1.3.1 Temperatura do processo de eletrofiação

A temperatura do processo de eletrofiação é um parâmetro que, assim como a distância entre a ponta da agulha e o coletor, contribui para a evaporação do solvente. Além disso, este parâmetro influencia nas propriedades da solução, tal como na viscosidade. Existe uma relação inversa entre a temperatura e a viscosidade, o aumento da temperatura reduz a viscosidade da solução e influencia na espessura das fibras (MIT-UPPATHAM; NITHITANAKUL; SUPAPHOL, 2004). Para a eletrofiação de solução aquosa de gelatina, a temperatura torna-se um parâmetro ainda mais importante, uma vez que este polímero pode gelificar em solução aquosa abaixo de 37 °C. Assim, Li et al. (2006a) eletrofiaram com sucesso solução aquosa de gelatina na temperatura de 40 °C.

2.1.3.2 Umidade relativa

A umidade relativa do meio está diretamente relacionada com a evaporação do solvente durante o processo de eletrofiação. Pelipenko et al. (2013) estudaram o efeito da umidade relativa na eletrofiação de

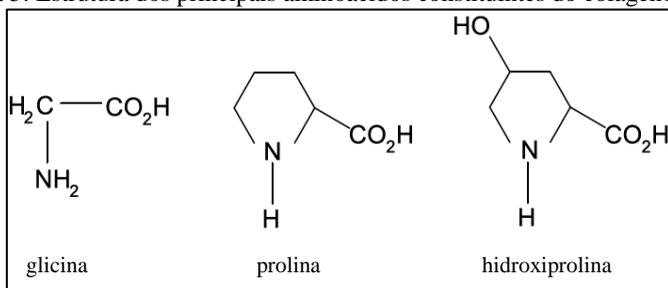
diferentes polímeros e concluíram de uma maneira geral que a diminuição da umidade relativa resulta em nanofibras mais espessas. Os autores justificaram os resultados em função da velocidade de evaporação do solvente, ou seja, diminuindo a umidade relativa a velocidade de evaporação do solvente aumenta e conseqüentemente a concentração local da solução polimérica também aumenta, resultando em aumento da viscosidade e formação de fibras mais espessas. Valores mais altos da umidade relativa (de 50 a 70 %) levaram à formação de um filme ao invés de fibras.

2.2 CARACTERÍSTICAS E PROPRIEDADES DE GELATINA E CELULOSE

2.2.1 Gelatina

Gelatina é um polímero derivado do colágeno tipo I, o qual é extraído principalmente de peles e ossos de suínos e bovinos. Assim como as demais proteínas, o colágeno tipo I apresenta uma estrutura primária com sequência de aminoácidos (Gly-X-Y)_n, (n pode ser 337 a 343 dependendo do tipo do colágeno) sendo Gly o aminoácido glicina e X e Y são comumente a prolina e hidroxiprolina, respectivamente (Figura 5). Esta cadeia peptídica apresenta em cada uma de suas extremidades um grupo funcional carboxila (-COOH) e uma amina (-NH₂).

Figura 5: Estrutura dos principais aminoácidos constituintes do colágeno tipo I.

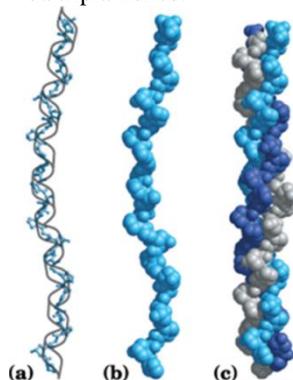


Fonte: Desenvolvido pelo autor

A estrutura secundária das proteínas é a forma como esta cadeia de aminoácidos está disposta espacialmente. A conformação em hélice é consequência das ligações intramoleculares de hidrogênio, que resulta na forma espiral da cadeia polipeptídica em torno de um eixo

imaginário. O colágeno tipo I é composto por três destas cadeias polipeptídicas em hélice, enoveladas umas às outras, chamada de estrutura tripla-hélice (Figura 6).

Figura 6: Representação da estrutura secundária do colágeno em hélice nos modelos de bola e bastão (a) e bola de preenchimento (b). Em (c) representação da tripla-hélice.



Fonte: Cox; Nelson (2002).

Na fabricação de gelatina, o tratamento da matéria-prima animal em solução ácida ou alcalina diluída resulta na quebra de ligações de hidrogênio e das atrações de van der Waals entre resíduos imino (prolina) de diferentes cadeias. Estas quebras desestabilizam as regiões tripla-hélice do colágeno e reduzem a ordem molecular (SEGTMAN; ISAKSSON, 2004).

Dependendo do tipo e intensidade do tratamento utilizado, o colágeno pode dar origem a diferentes tipos de gelatinas. Gelatina tipo A é derivada do processamento ácido do colágeno, e gelatina do tipo B é obtida por tratamento alcalino do colágeno, resultando na diferença do ponto isoelétrico, sendo 7-9 para gelatina do tipo A e 4 a 5 para a gelatina do tipo B (SAXENA et al., 2005).

Outra característica importante da gelatina é o índice Bloom, ou força do gel, que consiste na força requerida para que um êmbolo específico pressione a superfície de um gel padrão termostatizado por 4 mm sob condições padrão; quanto maior o índice Bloom, maior a força do gel (SCHRIEBER; GAREIS, 2007). A força do gel é dependente, principalmente, da proporção de frações que contenham massa molecular de aproximadamente $100.000 \text{ g mol}^{-1}$, enquanto a viscosidade é função principalmente das frações com massa molecular de valores

entre 200.000 e 400.000 g mol⁻¹. Por esta razão, dependendo do método de manufatura, gelatinas de mesmo Bloom podem ter viscosidades bastante diferentes (SCHRIEBER; GAREIS, 2007). Bigi, Panzavolta e Rubini (2004) relataram que, em geral, o índice Bloom é proporcional ao teor de tripla-hélice da gelatina e a viscosidade aumenta com o aumento das frações de massa molecular mais elevada. Lai (2009) indicou que gelatinas de alto índice Bloom têm viscosidades maiores do que amostras de baixo índice Bloom.

A coloração da gelatina é outra propriedade que está relacionada às condições de obtenção a partir do colágeno. Com o aumento do tempo de reação, a proteína reage com traços de carboidratos da matéria-prima (reação de Maillard) e aumenta a intensidade da cor (Figura 7). Portanto, quanto menor o índice Bloom, mais intensa é a cor da gelatina (SCHRIEBER; GAREIS, 2007).

Figura 7: Aumento na intensidade de cor da gelatina extraída em função da etapa de extração.



Fonte: Schrieber e Gareis (2007).

Por ser um polímero natural, as aplicações de gelatina têm sido estudadas tanto pura como em compósitos, principalmente nas áreas de engenharia de tecidos (AZHAR; OLAD; SALEHI, 2014), de revestimentos comestíveis (POVERENOV et al., 2014), de adesivos para cicatrização de feridas (SHEFY-PELEG et al., 2014), de administração de fármacos (PHADKE; MANJESHWAR; AMINABHAVI, 2014), entre outras.

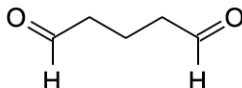
2.2.1.1 Reticulação

Desde a última década, a técnica de eletrofiação tem estimulado pesquisadores a produzir membranas fibrosas de gelatina (KI et al.,

2005; SONG; KIM; KIM, 2008; RATANAVARAPORN et al., 2010; PANZAVOLTA et al., 2011; ZHA et al., 2012; OKUTAN; TERZI; ALTAY, 2014). No entanto, a estrutura de nanofibras eletrofiadas de gelatina é solúvel em água e mecanicamente fraca, o que pode limitar suas aplicações a longo prazo. O tratamento com alguns compostos, que resultam na reticulação das cadeias, é capaz de melhorar tanto a capacidade de resistência à água quanto o desempenho termomecânico desse tipo de membrana (STEVENS, 2002).

O glutaraldeído, GTA, (Figura 8) é o composto mais utilizado para a reticulação devido à sua elevada eficiência na estabilização de materiais de colágeno (KHOR, 1997), baixo custo e capacidade de realizar a reticulação em um período de tempo relativamente curto (ZHANG et al., 2006). O mecanismo de reticulação da gelatina por GTA pode ser explicado através da reação dos grupos aldeído do GTA com grupos funcionais amina livres não protonadas ($-NH_2$) de lisina ou hidroxilisina (FARRIS; SONG; HUANG, 2010). Embora outros agentes reticulantes tenham sido estudados, visando reduzir a citotoxicidade, estes não se igualam ao GTA na estabilização de colágeno (SUNG et al., 1999). O risco de citotoxicidade pode ser melhorado pela redução da concentração de solução de GTA (GOISSIS et al., 1999).

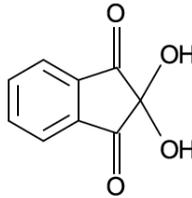
Figura 8: Fórmula estrutural do glutaraldeído.



Fonte: Desenvolvido pelo autor.

A quantidade de grupos amina envolvidos na reação de reticulação pode ser determinada por espectroscopia UV-Vis utilizando ninidrina (2,2-diidroxi-1,3-indenodiona – Figura 9). As aminas livres, remanescentes após a reação de reticulação, reagem com ninidrina formando um complexo de coloração roxa, conhecido como purpura de Ruhemann. A absorvância da solução, medida em 570 nm, é proporcional a quantidade de grupos aminas livres após a reação com o agente reticulante (MARTUCCI; ACCAREDDU; RUSECKAITE, 2012; DASH; FOSTON; RAGAUSKAS, 2013).

Figura 9: Fórmula estrutural da Ninidrina.

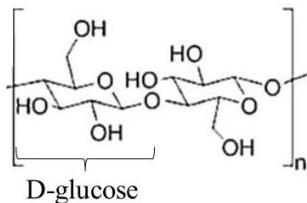


Fonte: Desenvolvido pelo autor.

2.2.2 Nanocristais de celulose

A celulose é o polímero mais abundante e onipresente na natureza. Sua estrutura molecular é homopolissacarídica linear, contendo de 10 a 15 mil unidades de D-glucose unidas por ligações glicosídicas do tipo $\beta 1 \rightarrow 4$ (Figura 10). Várias cadeias posicionadas lado a lado são estabilizadas por ligações intermoleculares e intramoleculares de hidrogênio, o que lhe confere algumas características, tais como estrutura fibrosa, alta estabilidade térmica, resistência mecânica e insolubilidade em água.

Figura 10: Estrutura química da celulose.

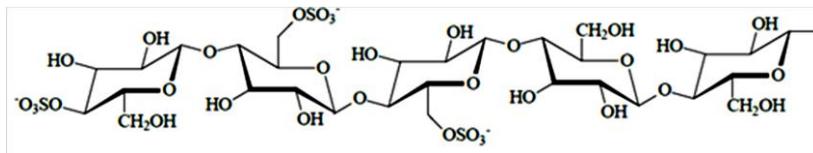


Fonte: Changsarn et al. (2011).

A estrutura da celulose pode ser desconstruída por hidrólise. Este processo, quando bem controlado, resulta em nanofibras de celulose altamente cristalinas, comumente chamados de nanocristais de celulose (NCs) (CHANGSARN et al., 2011). Um dos métodos mais utilizados para a produção de NCs utiliza tratamentos químicos, como a hidrólise ácida. Acredita-se que o início da via hidrolítica se encontra na clivagem, em meio aquoso, das ligações glicosídicas presentes nas regiões amorfas, gerando cristalitos individuais (DURAN; LEMES; SEABRA, 2012). Em geral, a adição de ácido sulfúrico é o método mais utilizado, em que, além da hidrólise, a reação direta entre o ácido e os grupos hidroxila formam éster-sulfatos negativamente carregados

(Figura 11). Estas cargas negativas na superfície geram repulsão eletrostática entre as nanopartículas que facilitam a dispersão em água (MESQUITA, 2012).

Figura 11: Estrutura química dos nanocristais de celulose produzidos via hidrólise da celulose em ácido sulfúrico.



Fonte: Mesquita (2012).

Os NCs apresentam aspecto de raio elevado, ou seja, alta relação comprimento:diâmetro, com valores entre 10 e 100, sendo o diâmetro compreendido entre 4 e 25 nm, dependendo da fonte. Podem ser obtidos a partir de fibras naturais (CAO et al., 2013), animais marinhos (SACUI et al., 2014) e subprodutos agroindustriais (SOUZA; QUADRI, 2014). Devido ao elevado nível de orientação uniaxial, exibem módulo de elasticidade de aproximadamente 130 GPa (CHANGSARN et al., 2011).

2.3 APLICAÇÕES DE GELATINA E NANOCRISTAIS DE CELULOSE EM ELETROFIAÇÃO

Membranas de gelatina eletrofiadas têm sido aplicada principalmente na área médica, por se tratar de um biopolímero com boa afinidade às atividades celulares, incluindo adesão e proliferação celular. Zha et al. (2012) obtiveram boa adesão e proliferação celular em membranas de gelatina reticuladas com glutaraldeído. Li et al. (2006b) produziram membranas eletrofiadas a partir polianilina/gelatina reticulada com 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida e concluíram que as fibras são biocompatíveis, suportando a fixação, migração e proliferação de células mioblásticas de ratos.

Outra possibilidade visando melhorar as propriedades das membranas fibrosas de gelatina citadas anteriormente tem sido a eletrofiação de blendas e compósitos de gelatinas com outros polímeros. Para aplicação em engenharia de tecido, Panthi et al. (2013) caracterizaram e estudaram a citocompatibilidade de MF eletrofiadas a partir do compósito nylon-6/gelatina e concluíram que as membranas com teor de 20 % (m/m) de gelatina apresentaram as melhores propriedades mecânicas, além de boa citocompatibilidade e proliferação

celular. Nagiah et al. (2013) produziram membranas eletrofiadas a partir de solução de poli (ácido 3-hidroxibutírico)/gelatina e avaliaram o crescimento de fibroblastos e queratinócitos dérmicos humanos. Os autores concluíram que as blendas apresentaram boa estabilidade térmica para aplicação em engenharia de tecido, com temperatura de degradação acima de 249 °C, além de suportarem a adesão e proliferação das células estudadas, provando ter grande potencial para regeneração de pele. Nguyen Thuy Ba e Lee (2012) eletrofiaram álcool polivinílico/gelatina e diminuíram a solubilidade das fibras em água pela reticulação por tratamento em metanol. Também foi encontrado que o material produzido é adequado para o crescimento celular. Jing et al. (2014) eletrofiaram soluções de gelatina/poli(carbonato de propileno) em trifluoretanol variando o pH da solução pela da adição de ácido acético. Observaram que a adição do ácido aumentou a miscibilidade de poli(carbonato de propileno) e gelatina na solução, melhorando a uniformidade e propriedades mecânicas das nanofibras eletrofiadas, além de não influenciar negativamente o crescimento e proliferação de células.

Nos últimos anos, pesquisadores têm investigado os efeitos da incorporação de NC, um dos biopolímeros naturais mais fortes e rígidos, nas propriedades mecânicas de matrizes poliméricas. Zhou et al. (2011) obtiveram aumento de 2,8 vezes no módulo de Young de membranas fibrosas, incorporando 20% em massa de NCs em óxido de polietileno. Huang, Liu e Yao (2011) eletrofiaram proteína de seda carregada com NCs na faixa de 0 a 4% (m/m), resultando em aumento de 4 vezes no módulo de Young das membranas fibrosas e redução na elasticidade de 10,8 para 4,8 %. Lee e Deng (2012) produziram membranas eletrofiadas, isotrópicas e alinhadas a partir de álcool polivinílico reforçadas por NCs nas concentrações de 0 a 15% em massa; o aumento no módulo de Young foi de 2,1 e 2,2 vezes para membranas isotrópicas e orientadas, respectivamente. Estes estudos mostraram que NCs melhoraram as propriedades mecânicas das membranas eletrofiadas, sendo atribuída ao seu elevado aspecto de raio, boas propriedades mecânicas intrínsecas e forte adesão interfacial entre NCs e a matriz. Cao et al. (2008) avaliaram os efeitos da incorporação de NCs em filmes de amido e observaram que os filmes nanocompósitos comparados com aqueles de amido puro apresentaram maior resistência em água, além de melhores propriedades mecânicas. Os autores atribuíram os resultados às semelhanças químicas entre NCs e amido e a realização de interações do tipo ligação de hidrogênio.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL

Neste trabalho utilizou-se gelatina tipo A, extraída de pele de porco com diferentes índices Bloom, (90, 250 e 280 g), cedida pela fábrica de gelatina Gelnex (Itá - Santa Catarina - Brasil), ácido acético glacial ($C_2H_4O_2$, 99,5% - P.A., Lafan), glutaraldeído ($C_5H_8O_2$, 25% - Vetec), ninidrina ($C_9H_6O_4$, 99% - Vetec), etanol (C_2H_6O , 99,5% - P.A., Synth), ácido sulfúrico (H_2SO_4 , 98% - P.A., Synth), papel filtro (J Prolab N°. 2 - PR, Brasil) e água destilada.

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Preparo das soluções e suspensões

Neste trabalho as soluções de gelatina foram identificadas como GeB90, GeB250 e GeB280 de acordo com o seu índice Bloom. Para o estudo do efeito do índice Bloom na habilidade de eletrofiacção (HE), foram preparadas soluções variando a concentração de gelatina de 18 a 32 % (m/v) para GeB90 e de 12 a 24 % (m/v) para GeB250 e GeB280 dissolvidas em ácido acético 89,6 % (v/v). Para o preparo da solução de 18 % (m/v) de gelatina em ácido acético 89,6 % (v/v), por exemplo, 0,5400 g de gelatina foi pesado em balança analítica, Shimadzu AUY220, e adicionada em 3,0 mL de solvente (2,7 mL de HAC e 0,3 mL de água destilada). A mistura foi agitada suavemente em agitador magnético (MS equipamentos, TLK 48) a 40 °C por 30 minutos e, então, a temperatura ambiente por 60 min para completa solubilização. O polímero e o solvente foram utilizados como recebidos, sem purificação adicional. A Figura 12 mostra soluções de GeB90, GeB250 e GeB280 18 % (m/v) em ácido acético 89,6 % (v/v).

Figura 12: Soluções de gelatina de diferentes índices 18 % (m/v) em ácido acético 89,6 % (v/v).



As suspensões de gelatina/Nanocristais de celulose foram preparadas utilizando GeB280 18 % (m/v). As concentrações de NCs em relação ao pó de gelatina foram de 0, 1, 2, 3 e 4 % (m/m), sendo as suspensões denominadas GeNC0, GeNC1, GeNC2, GeNC3 e GeNC4 respectivamente. Para o preparo da suspensão GeNC1, por exemplo, 9,0 mL de HAc foram adicionados a 1,0 mL de suspensão aquosa de NCs 1,8 % (m/v) (o processo de extração de NCs está detalhado no item 3.2.3) e a mistura foi mantida sob agitação magnética vigorosa durante 30 minutos. Em seguida, 0,5400 g de gelatina foi adicionada a 3,0 mL da suspensão e agitada suavemente em agitador magnético durante 30 minutos a 40 °C e 60 min à temperatura ambiente.

3.2.2 Planejamento fatorial

Um planejamento fatorial completo 2^4 foi realizado com o intuito de melhor compreender o sistema de eletrofiação. Para isto, foram considerados como fatores a concentração de GeB280, a distância entre a agulha e o coletor, a diferença de potencial elétrico e a vazão. Para cada fator foram escolhidos dois níveis, um inferior e um superior, representados pelos sinais negativo (-) e positivo (+), respectivamente. Na Tabela 1 são mostradas as condições experimentais codificadas, nos níveis -1 e +1, utilizadas nas eletrofiações. Por exemplo, o fator A corresponde à concentração de gelatina, na qual o nível inferior é representado por 9 % (m/v) e o superior por 12 % (m/v) dissolvidos em ácido acético glacial. O volume eletrofiado foi de 0,5 mL, o coletor utilizado foi folha de alumínio, 6,0 x 6,0 cm² aterrada e os demais parâmetros foram mantidos fixos e utilizados em todas as eletrofiações deste trabalho, ou seja, o diâmetro interno da agulha é de 0,723 mm, temperatura do meio de $23,0 \pm 0,5$ °C e umidade relativa de $55,0 \pm 2,0$ %.

Tabela 1: Fatores e respectivos níveis utilizadas no planejamento fatorial para eletrofiação de GeB280.

Fator	Condição		
	-	+	
A	[GeB280] / % (m/v)	9	12
B	Distância agulha-coletor / cm	8	12
C	Diferença de potencial elétrico / kV	17	22
D	Vazão / μ L/min	10	20

Fonte: Desenvolvido pelo autor.

A resposta deste planejamento foi obtida de forma qualitativa, observando a habilidade de eletrofiação, HE, que foi classificada em três grupos: ruim (R), boa (B) e excelente (E). Uma classificação “ruim” significa que o jato da eletrofiação quebra frequentemente em pequenas gotas ou que ocorre a dificuldade na ejeção do jato. Em ambos os casos pode ser observada a presença de solvente no coletor. Classificação “boa” significa formação de fibras com poucas gotas atingindo o coletor e “excelente” quando nenhuma gota foi observada no coletor formando um filme homogêneo.

O conjunto de 16 eletrofiações foi gerado pela combinação entre 2 níveis e 4 fatores apresentados na Tabela 1. Após análise dos resultados obtidos neste planejamento experimental, o efeito da concentração de solvente sobre a HE foi avaliado. Para isto, foram eletrofiadas soluções de GeB280 18 % (m/v) variando a concentração de ácido acético de 49,8 a 99,5 % (v/v).

3.2.3 Extração de Nanocristais de Celulose

A celulose de algodão utilizada para preparar as suspensões de NCs foi obtida a partir de fibras de celulose branqueada de papel filtro do tipo J Prolab N^o. 2 (PR, Brasil). A hidrólise foi realizada em meio contendo ácido sulfúrico seguindo a método utilizado por Dong; Revol; Gray (1998). O papel filtro foi cortado em pedaços de (0,5 × 0,5) cm², adicionado em solução aquosa de ácido sulfúrico 64 % (v/v) na proporção de 1:17,5 (g/mL) e mantido sob agitação magnética (MS equipamentos, TLK 48) por 60 minutos a 45 °C. Em seguida, a hidrólise foi interrompida, diluindo o volume da suspensão em 10 vezes com água fria. As suspensões foram centrifugadas em 10000 rpm por 10 min (Sigma, 2K15) e o corpo de fundo foi dialisado em membranas apropriadas (massa molecular de corte 12000-16000 Da e diâmetro de poro de 25 Å) em fluxo contínuo de água durante três dias para neutralização do pH. Após a diálise, a suspensão foi sonicada em sonda ultrassônica (Unique, disruptor) por 7 minutos para a obtenção de partículas dispersas e não agregadas.

3.2.4 Determinação da concentração de NCs

Em um vidro relógio previamente pesado, foram adicionados 5,0 mL da suspensão de NCs e condicionada em estufa a 105 °C por 24 h. Em seguida, a amostra foi armazenada em um dessecador por 24 h e posteriormente pesada para determinação da massa seca. As

concentrações das suspensões obtidas foram de aproximadamente 5,5 % (m/v).

3.2.5 Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros de FTIR das amostras de gelatina em pó com diferentes índices Bloom (90, 250 e 280) foram obtidos com o equipamento IRPrestige-21 da Shimadzu. Os ensaios de FTIR foram realizados com número de onda entre 400 e 4000 cm^{-1} usando 32 varreduras com resolução 4 cm^{-1} . Todas as amostras em pó foram preparadas na forma de discos de brometo de potássio (KBr) na proporção 1:100. Para as amostras de gelatina eletrofiadas com diferentes teores de NC e o filme de NC obtido pela técnica de preparo “casting”, os espectros foram obtidos por espectrômetro FTIR Agilent Technologies (Cary 600 Series) no modo de refletância total atenuada (ATR). Cada espectro foi adquirido em célula de cristal Zn/Se por acúmulo de 30 varreduras com resolução de 4 cm^{-1} e intervalo de número de onda de 4.000 a 650 cm^{-1} .

3.2.6 Viscosidade

As viscosidades aparentes das soluções de gelatina eletrofiadas foram determinadas em um viscosímetro Haake 6L plus, utilizando a haste L3 na rotação de 100 rpm. Todas as medidas foram realizadas em duplicata e com a temperatura de $23,0 \pm 0,1$ °C.

3.2.7 Condutividade elétrica

As medidas de condutividade elétrica das soluções de gelatina e suspensões gelatina/NCs eletrofiadas foram obtidas com condutivímetro Tecnopon MCA-150. Todas as medidas foram realizadas em duplicata e com a temperatura de $23,0 \pm 0,1$ °C.

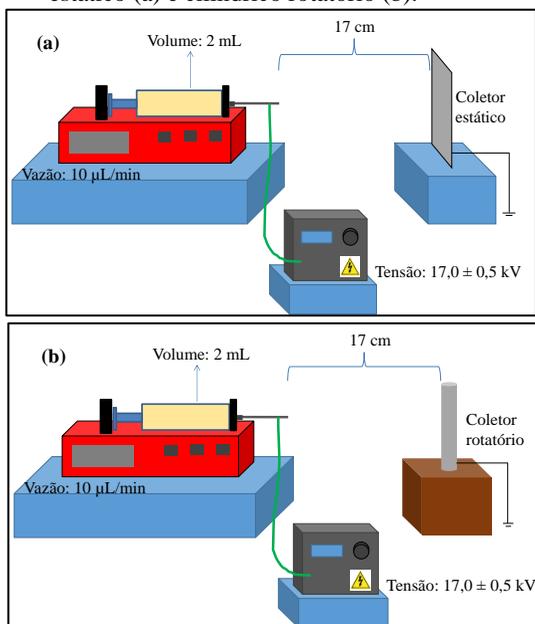
3.2.8 Eletrofição

As soluções e suspensões poliméricas foram transferidas para uma seringa de 5 mL equipada com uma agulha de diâmetro interno de 0,723 mm. O volume eletrofiado foi de 2 mL com vazão de 10 $\mu\text{L min}^{-1}$, controlada com uma bomba de infusão (New Era Pump Systems NE-300) e com temperatura de $23,0 \pm 0,5$ °C e umidade relativa de $55,0 \pm 2,0$ %. A diferença de potencial elétrica aplicada foi de $17,0 \pm 0,5$ kV e a

distância entre a ponta da agulha e o coletor aterrado (folha de alumínio, $6,0 \times 6,0 \text{ cm}^2$) foi de 17 cm. A Figura 13 (a) ilustra o sistema de eletrofição e as condições experimentais utilizadas. As MF eletrofiadas foram armazenadas em dessecador para testes posteriores.

Para o estudo da reticulação, as MF de gelatina foram coletadas em coletor cilíndrico rotatório, ilustrado na Figura 13 (b), com o objetivo de aumentar a área da membrana eletrofiada. As membranas foram coletadas em folha de alumínio ($9,0 \times 8,0 \text{ cm}^2$) fixada em cilindro metálico com diâmetro de 2,55 cm com rotação de 180 rpm. As MF eletrofiadas foram armazenadas em dessecador para testes posteriores.

Figura 13: Sistema de eletrofição e condições experimentais utilizando coletor estático (a) e cilíndrico rotatório (b).



Fonte: Desenvolvido pelo autor.

3.2.9 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A morfologia das MF de GeB90, GeB250 e de GeB280 foi examinada em MEV (JEOL, JSM-6390LV). Para as MF de gelatina/NCs as imagens foram obtidas por Microscopia Eletrônica de Varredura com Emissão de Campo (MEV-FEG) (JEOL, JSM-6701F). O

diâmetro das fibras foi determinado a partir do valor médio de 50 medidas de cada amostra, utilizando o programa Size Meter 1.1 (<http://lcp.eng.ufsc.br/novoprojeto/?nav=estat>).

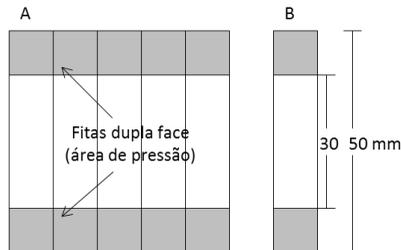
3.2.10 Análise Termogravimétrica (TGA)

A análise termogravimétrica das MF foi realizada utilizando o equipamento Netzsch 5TA 449 F3 Juppiter. As amostras foram condicionadas em dessecador a 45% de umidade relativa mantida com sílica gel durante 7 dias antes dos testes; em seguida, foram aquecidas sob atmosfera de gás nitrogênio em recipiente de alumina de 27 a 700 °C a uma taxa de aquecimento de 10 °C / min. Os resultados foram processados pelo software Netzsch Proteus Thermal Analysis.

3.2.11 Propriedades mecânicas

As amostras submetidas ao ensaio de tensão foram preparadas de acordo com Huang et al. (2004) e Chen et al. (2009) e com algumas modificações. Inicialmente, um molde feito em papel branco ($5,0 \times 5,0 \text{ cm}^2$) foi cortado como mostrado na Figura 14A. Uma fita dupla face foi colada nas áreas superior e inferior de um dos lados do molde. Este foi aderido na membrana a uma distância de 5 mm das bordas e cortado em pedaços retangulares ($1,0 \times 5,0 \text{ cm}^2$) ao longo das linhas verticais, como mostrado na Figura 14B. Em seguida, o papel de alumínio (coletor) foi cuidadosamente removido, fita adesiva de face única foi aplicada nas áreas de pressão e o molde de papel foi cortado de modo a não interferir nos ensaios.

Figura 14: (A) Modelo de papel usado para preparar as amostras da membrana fibrosa para o ensaio de tração e (B) modelo de uma amostra para o ensaio de tração.



Fonte: Adaptada de Huang et al. (2004).

Os testes de tração foram realizados utilizando um texturômetro (TA. HD. Plus, Stable Micro Systems) com célula de carga de 500 N, velocidade de deslocamento de 10 mm/min, distância inicial entre as garras de 30 mm e temperatura de 23 °C. Os resultados são a média de pelo menos 7 medidas de cada material. As espessuras, foram determinadas com um micrômetro digital (Digimess, IP54) com base em 10 medidas para cada membrana.

3.2.12 Reticulação em glutaraldeído

A reticulação foi realizada com membranas de GeB280 na concentração de 18% (m/v) seguindo o método utilizado por Kato et al. (1989) e por Zhang et al. (2006). Em um dessecador, colocou-se, ao fundo, uma placa de Petri contendo 10 mL de solução aquosa de GTA e, acima da porcelana perfurada, as MF de gelatina ($4,0 \times 4,0 \text{ cm}^2$) à temperatura ambiente; a seguir, as amostras foram deixadas sob fluxo de ar em capela por duas horas e submetidas ao tratamento térmico a 100 °C em estufa para remoção do GTA residual por 1 h. Foram avaliados os efeitos da concentração de GTA, 0,1, 0,5, 1, 2,5, 5, 7,5, 10 e 12,5% (v/v) no período de 3 dias (4320 min) e o efeito do tempo em 45, 60, 180, 360 e 4320 minutos fixando a concentração de GTA em 2,5 % (v/v).

3.2.13 Grau de reticulação

O grau de reticulação foi determinado por ensaios com ninidrina (2-dihidroxi-1,3-indanodiona) (DASH; FOSTON; RAGAUSKAS, 2013). Em um tubo eppendorf, foram adicionados 5 mg de membranas de gelatina eletrofiadas e 1,0 mL de solução de ninidrina 1,5 % (m/v) em etanol, seguido de aquecimento da mistura por 25 min a 80 °C. Após resfriar à temperatura ambiente, realizou-se diluição da amostra com água na proporção 1:9 e a absorbância óptica (A) foi medida usando espectrômetro UV/VIS (PG Instruments, T90) em 570 nm contra uma solução em branco, sem membrana, que passou pelo mesmo procedimento das membranas reticuladas. O grau de reticulação (GR) foi calculado pela Equação (1):

$$\text{GR (\%)} = \{1 - (A_{\text{membrana reticulada}} / A_{\text{membrana não reticulada}})\} \times 100 \quad (1)$$

3.2.14 Solubilidade em água

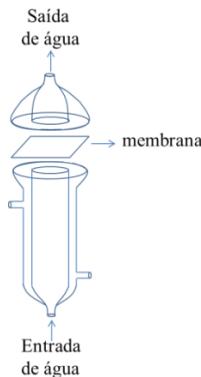
O teste de solubilidade (S) em água foi realizado seguindo a metodologia utilizada por Martucci, Accareddu e Ruseckaite (2012) com modificações quanto ao período em que as MF permaneceram submersas e a temperatura da água. As membranas fibrosas de GeNC0, GeNC4 (2,0 x 2,0 cm²), além daquelas reticuladas por glutaraldeído na concentração de 2,5 % (v/v), foram secas em estufa a 105 °C por 24 h. Em seguida, as amostras foram pesadas para determinar a massa inicial (m_i) e submersas em 30 mL de água destilada (pH ~ 6,4) sob agitação suave. As amostras GeNC0 e GeNC4 permaneceram submersas por 24 h à temperatura de 25 °C, enquanto as reticuladas permaneceram por 96 h nas temperaturas de 30 e 40 °C. Após este período as amostras foram secas novamente a 105 °C e pesadas para determinação da massa final (m_f). Os experimentos foram realizados em duplicata e a solubilidade foi calculada pela Equação (2):

$$S = \left(1 - \frac{m_f}{m_i}\right) \times 100 \quad (2)$$

3.2.15 Durabilidade das membranas em escoamento aquoso

As membranas de gelatina reticuladas foram avaliadas quanto à durabilidade ao escoamento aquoso utilizando o aparato ilustrado na Figura 15.

Figura 15: Esquema do aparato utilizado para determinação da durabilidade das membranas ao escoamento aquoso.



Fonte: Desenvolvido pelo autor.

O diâmetro do orifício recoberto pela membrana foi de 15 mm. Uma cânula ligada ao orifício de entrada de água foi conectada a uma bomba peristáltica (Masterflex, 7518-00) com vazão de 16 mL/min. O volume de água utilizado foi de 70 mL em reciclo durante 3 h a 23 °C. As massas inicial e final das membranas foram determinadas conforme descrito no item anterior e a durabilidade das membranas foi determinada a partir da Equação (3). Todos os experimentos foram realizados em duplicata.

$$D = \left(\frac{m_f}{m_i} \right) \times 100 \quad (3)$$

3.2.16 Análise estatística

As análises estatísticas dos resultados foram realizadas no *software* Statistica 10, utilizando o teste de Tukey com nível de significância $\alpha = 0,05$.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 AVALIAÇÃO DA HABILIDADE DE ELETROFIAÇÃO

4.1.1 Planejamento fatorial 2⁴

A habilidade de eletrofiação (HE) da gelatina dissolvida em ácido acético para os 16 experimentos, mostradas na Tabela 2, foram analisadas segundo os critérios apresentados no item 3.2.2.

Tabela 2: Habilidade de eletrofiação para as 16 condições experimentais do planejamento fatorial.

Fator	A	B	C	D	HE
Eletrofiação					
1	- (9)	- (8)	- (17)	- (10)	NFM
2	+ (12)	- (8)	- (17)	- (10)	NFM
3	- (9)	+ (12)	- (17)	- (10)	R
4	+ (12)	+ (12)	- (17)	- (10)	B
5	- (9)	- (8)	+ (22)	- (10)	NFM
6	+ (12)	- (8)	+ (22)	- (10)	NFM
7	- (9)	+ (12)	+ (22)	- (10)	R
8	+ (12)	+ (12)	+ (22)	- (10)	R
9	- (9)	- (8)	- (17)	+ (20)	NFM
10	+ (12)	- (8)	- (17)	+ (20)	NFM
11	- (9)	+ (12)	- (17)	+ (20)	R
12	+ (12)	+ (12)	- (17)	+ (20)	B
13	- (9)	- (8)	+ (22)	+ (20)	NFM
14	+ (12)	- (8)	+ (22)	+ (20)	NFM
15	- (9)	+ (12)	+ (22)	+ (20)	R
16	+ (12)	+ (12)	+ (22)	+ (20)	R

A = [Ge] / % (m/v); B = Distância agulha-coletor / cm; C = Diferença de potencial elétrico / kV; D = Vazão / μ L/min; E = Excelente; B = Boa; R = Ruim; NFM = Não formou membrana.

Fonte: Desenvolvido pelo autor.

Para as eletrofiações realizadas com distância entre agulha e coletor de 8 cm (1, 2, 5, 6, 9, 10, 13 e 14) não foi observada formação de membrana (NMF). Isso pode ser explicado pela baixa porção de evaporação do solvente, sugerindo que esta distância não é adequada em combinação com as demais condições. Entre aquelas realizadas na distância de 12 cm, os experimentos com concentração no nível inferior (3, 7, 11 e 15), além daqueles com diferença de potencial elétrico no

nível superior (7, 8, 15 e 16) apresentaram muitas gotas no coletor. Os ensaios 4 e 12 apresentaram boa HE, diferindo apenas no valor da vazão, 10 e 20 $\mu\text{L}/\text{min}$, respectivamente. É possível observar que houve melhora na HE combinando os níveis superiores da concentração da solução e da distância entre a ponta da agulha e o coletor com o nível inferior da diferença de potencial elétrico, e que os níveis de vazão utilizados não interferem na HE para esta combinação.

Com base nestes resultados, realizou-se um experimento aumentando a concentração de gelatina para 18 % (m/v) e a distância entre a agulha e coletor para 17 cm. A diferença de potencial elétrico foi mantida em 17 kV e a vazão em 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ (vazão menor garante maior evaporação do solvente). O resultado obtido foi uma eletrofiação excelente, sem gotas no coletor.

4.1.2 Variação da concentração de HAc

As eletrofiações com soluções de GeB280 em diferentes concentrações de HAc foram realizadas afim de se obter a solução mais diluída que resultasse em HE excelente. A Tabela 3 apresenta os resultados obtidos variando a concentração de HAc de 49,8 a 99,5 % (v/v) em 18 % (m/v) de GeB280, mantendo constante as demais condições experimentais.

Tabela 3: Habilidade de eletrofiação para soluções de GeB280 18% (m/v) com diferentes concentrações de HAc, distância entre agulha e o coletor de 17 cm, vazão de 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ e diferença de potencial elétrico de 17 kV.

[HAc] / % (v/v)	HE
49,8	R
59,7	R
69,7	R
79,6	B
89,6	E
99,5	E

E = Excelente; B = Boa; R = Ruim.

Fonte: Desenvolvido pelo autor.

A variação na concentração de HAc de 49,8 até 69,7 % (v/v) resultou em uma HE ruim, com 79,6 % (v/v) apresentou HE boa e com 89,6 e 99,5 % (v/v) o valor da HE foi excelente. A melhora na HE com o aumento da concentração de HAc pode ser atribuída ao aumento da viscosidade da solução. Gelatina dissolvida em meio ácido sofre

protonação dos seus grupos amina ($-\text{NH}_2$) e expande a estrutura tripla-hélice aumentando a viscosidade da solução (SONGCHOTIKUNPAN; TATTIYAKUL; SUPAPHOL, 2008). Com isto, os demais experimentos deste trabalho foram realizados em 89,6 % (v/v) de HAC.

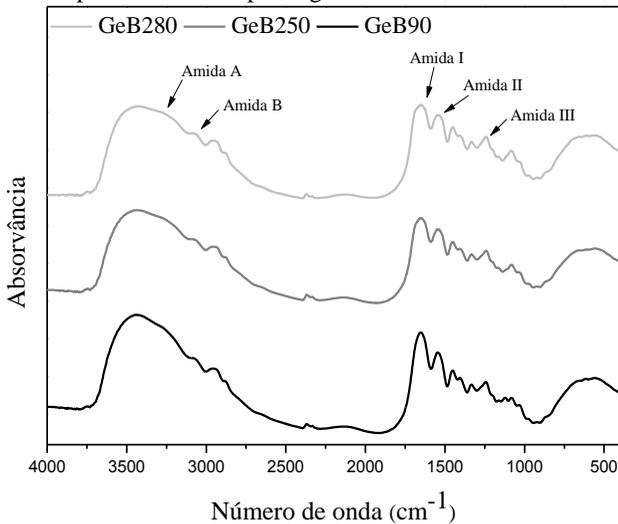
4.2 ELETROFIAÇÃO DE GELATINAS COM DIFERENTES ÍNDICES BLOOM

4.2.1 FTIR

A Figura 16 mostra os espectros de infravermelho para as gelatinas com diferentes índices Bloom. Os principais picos de absorção estão situados nas regiões das bandas de amidas. Amida A em $3290 \sim 3306 \text{ cm}^{-1}$, amida B em $3062 \sim 3065 \text{ cm}^{-1}$, estiramento assimétrico de CH_2 em aproximadamente 2935 cm^{-1} , estiramento simétrico de CH_3 em 2875 cm^{-1} , amida I em 1660 cm^{-1} , amida II em 1535 cm^{-1} e amida III em 1240 cm^{-1} (DHANDAYUTHAPANI; KRISHNAN; SETHURAMAN, 2010; ZHA et al., 2012).

As gelatinas de maior índice Bloom, 250 e 280 g, apresentaram menor intensidade nas bandas de amida I, II e III. A diminuição nestas bandas é um indicativo de maior desordem na gelatina e está associada com a perda da conformação tripla-hélice como resultado da desnaturação do colágeno (FRIESS; LEE, 1996). Geralmente, gelatinas com menor índice Bloom contêm maior quantidade de componentes de baixa massa molecular, em que o grupo funcional ($\text{C}=\text{O}$) poderia estar mais exposto e tornar-se mais reativo entre as cadeias alfa. Durante a liofilização da gelatina extraída, as frações de baixa massa molecular de gelatina podem submeter-se gradualmente a renaturação, formando uma rede com mais ligações de proteína-proteína do que as frações de elevada massa molecular (MUYONGA; COLE; DUODU, 2004).

Figura 16: Espectros FTIR de pó de gelatina de diferentes índices Bloom.



Fonte: Desenvolvido pelo autor.

4.2.2 Variação das concentrações de GeB90, GeB250 e GeB280

A eletrofiação foi analisada pela variação da concentração de gelatina de 18 a 32 % (m/v) para GeB90 e 12 a 24 % (m/v) para GeB250 e GeB280, enquanto a concentração de ácido acético foi mantida fixa em 89,6 % (v/v). A Tabela 4 apresenta os resultados da condutividade elétrica, viscosidade aparente e habilidade de eletrofiação (HE). Para todos os diferentes tipos de gelatina apresentados, a condutividade elétrica aumentou com o aumento da concentração da solução. Isto pode ser atribuído ao aumento na quantidade total de íons na solução, uma vez que a gelatina é um polieletrólito que possui grupos funcionais ionizáveis, como amina e carboxila, os quais podem ser ionizados por agentes ácidos ou ainda hidrolisados, adquirindo cargas positivas ou negativas (HUANG et al., 2004; SONGCHOTIKUNPAN; TATTIYAKUL; SUPAPHOL, 2008). Para uma mesma concentração, o valor da condutividade elétrica aumentou com a diminuição do índice Bloom. Proteínas submetidas a meio ácido, como neste caso, sofrem desestabilização da estrutura tripla hélice (KI et al., 2005) e, como citado anteriormente, quanto menor o índice Bloom, menor é o tamanho da cadeia polimérica, aumentando o número de grupos terminais ionizáveis, como amina e carboxila.

Tabela 4: Habilidade de eletrofiação, viscosidade e condutividade elétrica de soluções com diferentes concentrações de GeB90, GeB250 e GeB280 em solução aquosa de ácido acético 89,6 % (v/v).

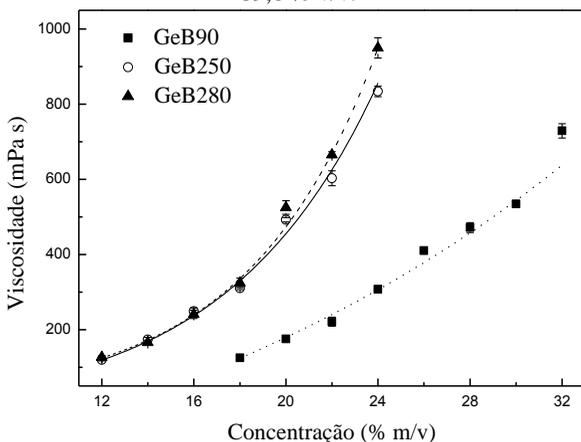
[Ge] (% m/v)	GeB90			GeB250			GeB280		
	HE	η_{ap} (mPa.s)	σ $\mu\text{S/cm}$	HE	η_{ap} (mPa.s)	σ $\mu\text{S/cm}$	HE	η_{ap} (mPa.s)	σ $\mu\text{S/cm}$
12	-	-	-	R	120±3	452±20	R	127±4	428±16
14	-	-	-	B	173±6	487±21	B	166±6	462±15
16	-	-	-	B	249±9	515±24	B	241±11	496±26
18	R	125±3	599±51	E	310±4	541±27	E	324±13	520±24
20	B	175±5	616±44	E	492±6	559±26	E	525±18	542±20
22	B	221±12	633±42	E	603±20	578±30	E	666±8	560±21
24	E	307±7	641±43	R	834±14	597±33	R	950±27	570±26
26	E	410±9	650±45	-	-	-	-	-	-
28	E	472±13	657±46	-	-	-	-	-	-
30	E	528±4	661±49	-	-	-	-	-	-
32	R	729±19	669±52	-	-	-	-	-	-

η_{ap} : viscosidade aparente; σ : condutividade; E = Excelente; B = Bom; R = Ruim.

Fonte: Desenvolvido pelo autor.

As propriedades viscoelásticas do fluido polimérico têm sido identificadas como o parâmetro de solução mais importante a ser considerado no processo de eletrofiação e esta propriedade pode ser bem representada pela viscosidade da solução para indicar a habilidade de eletrofiação (KI et al., 2005; RATANAVARAPORN et al., 2010). Os valores da viscosidade para as soluções investigadas aumentaram com o aumento da concentração de gelatina. Quando comparados nas mesmas concentrações, os valores encontrados para GeB90 foram muito menores do que aqueles para GeB250 e GeB280, que por sua vez apresentaram valores similares entre 12 e 20% (m/v) (Figura 17). A relação entre a viscosidade e a concentração da solução para GeB90, GeB250 e GeB280, pode ser aproximada empiricamente pelas equações exponenciais (4), (5) e (6), respectivamente.

Figura 17: Viscosidade em função da concentração de gelatina para soluções de gelatina de três diferentes índices Bloom em solução aquosa de ácido acético 89,6 % v/v.



Fonte: Desenvolvido pelo autor.

$$\eta_{ap} = 272,9e^{\left(\frac{[GeB90]}{22,7}\right)} - 478,9 \quad (R^2 = 0,99) \quad (4)$$

$$\eta_{ap} = 22,8e^{\left(\frac{[GeB250]}{6,6}\right)} - 22,7 \quad (R^2 = 0,98) \quad (5)$$

$$\eta_{ap} = 13,2e^{\left(\frac{[GeB280]}{5,6}\right)} + 13,2 \quad (R^2 = 0,99) \quad (6)$$

A HE de GeB90, GeB250 e GeB280 melhorou com o aumento da concentração da solução, mas nas concentrações mais elevadas a HE é ruim. Nas concentrações baixas, a HE ruim foi caracterizada pela formação de gotículas, como resultado da baixa viscosidade da solução (FONG; CHUN; RENEKER, 1999; MIT-UPATHAM; NITHITANAKUL; SUPAPHOL, 2004). Já nas concentrações mais elevadas, o aumento da viscosidade da solução polimérica dificultou a ejeção do jato. Embora tenha ocorrido a formação de fibras, observou-se instabilidade da solução polimérica na ponta da agulha e frequentemente o jato espesso foi ejetado atingindo o coletor ainda com solvente.

É interessante observar que a HE com classificação excelente foi obtida com intervalos de concentração mais elevada para GeB90 do que para GeB250 e GeB280. Para GeB90 não houve formação de membrana entre 12 e 16 % (m/v) e as melhores concentrações foram entre 24 e 30 % (m/v). Já a GeB250 e a GeB280 apresentaram o melhor intervalo entre 18 e 22 % (m/v). Isto pode ser explicado pela viscosidade da solução,

considerando que os presentes resultados confirmaram que quanto maior o índice Bloom da gelatina, maior é a viscosidade da solução.

Em se tratando do mesmo polímero, a massa molecular está associada com o tamanho da cadeia polimérica, que por sua vez afeta a viscosidade da solução, já que o tamanho da molécula determinará a quantidade de entrelaçamento das cadeias poliméricas no solvente.

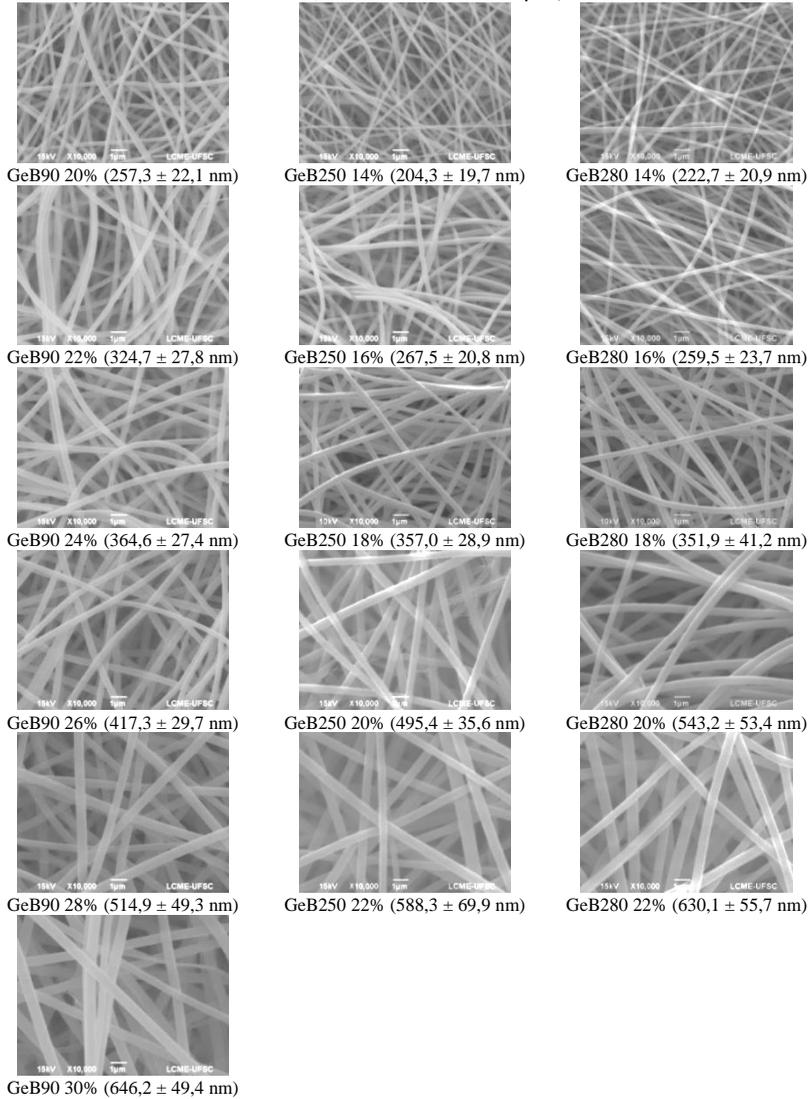
Outra maneira de aumentar a viscosidade da solução é aumentar a concentração do polímero. Similar ao aumento da massa molecular, o aumento na concentração resulta em maiores entrelaçamentos das cadeias poliméricas na solução, que é necessário para manter a continuidade do jato durante a eletrofição (RAMAKRISHNA et al., 2005). Com isto, analisando a habilidade de eletrofição pelos valores da viscosidade, é possível observar que os melhores valores de viscosidade para as gelatinas de diferentes índices Bloom são similares, isto é, 307,3 a 511,7 para GB90, 322,0 a 603,0 para GB250 e 324,3 a 665,7 mPa.s para GB280.

Baseado nos resultados mostrados na Tabela 4, é difícil estabelecer um intervalo de viscosidade preciso, mas os resultados estão de acordo com Songchotikunpan, Tattiyakul e Supaphol (2008), que investigaram a eletrofição de gelatina extraída de “Nile” tilapia (Bloom 328 g) em ácido acético e concluiu que gotículas foram formadas quando a viscosidade da solução apresentou valores abaixo de 336 mPa s. Também, relataram dificuldade para eletrofiar solução de gelatina com viscosidade de 994 mPa s utilizando solução aquosa de ácido acético 89,6 % (v/v).

4.2.3 Morfologia

A morfologia das MF de GeB90, GeB250 e GeB280 que resultaram em boa e excelente habilidade de fição foram analisadas por MEV. A partir das micrografias apresentadas na Figura 18, é possível observar que o aumento na concentração de 20 para 30 % (m/v) de GeB90 e de 14 para 22 % (m/v) de GeB250 e GeB280 resultou no aumento no diâmetro médio das fibras, passando de 257,3 para 646,2 nm, 204,3 para 588,3 nm e 222,7 para 630,1 nm, respectivamente. Relacionando estes resultados com aqueles apresentados na Tabela 4, verifica-se que os aumentos da viscosidade e da condutividade elétrica das soluções, resultaram em fibras mais espessas. Contudo, de acordo com o exposto no item 2.1.2 pode-se concluir que as forças viscoelásticas superaram a força de alongamento gerada pela repulsão elétrica.

Figura 18: Microscopia eletrônica de varredura das MF obtidas a partir das soluções de gelatina em ácido acético 89,6 % (v/v). O índice Bloom e a concentração da solução são mostrados abaixo de cada imagem (ampliação = 10000x, barra de escala = 1 μm).



Fonte: Desenvolvido pelo autor.

As Figuras 19a e 19b ilustram o diâmetro médio das fibras (d_m) eletrofiadas de GeB90, GeB250 e GeB280 em função da concentração e da viscosidade das soluções. A Figura 19a mostra que há uma relação entre as concentrações das soluções e os diâmetros médios das fibras, que pode ser bem representada pelas Equações exponenciais (7), (8) e (9) para GeB90, GeB250 e GeB280, respectivamente. Além disso, para uma dada concentração, GeB90 apresentou fibras mais finas do que GeB250 e GeB280, que demonstraram ser bastante compatíveis uma com a outra. Esta observação está enfatizada na Figura 19a pelas linhas verticais tracejadas no gráfico e pelas imagens obtidas por MEV. A Figura 19b mostra a relação dos diâmetros médios das fibras em função da viscosidade na forma associada. A dispersão sugere que existe uma relação comum entre elas, que foi melhor aproximada pela Equação linear (10). Esta afinidade entre o diâmetro das fibras e a viscosidade da solução de gelatina eletrofiada também pode ser observada a partir das imagens MEV apresentadas na Figura 19b. Independente do índice Bloom, soluções de gelatina com valores de viscosidades próximos geraram fibras com diâmetros semelhantes.

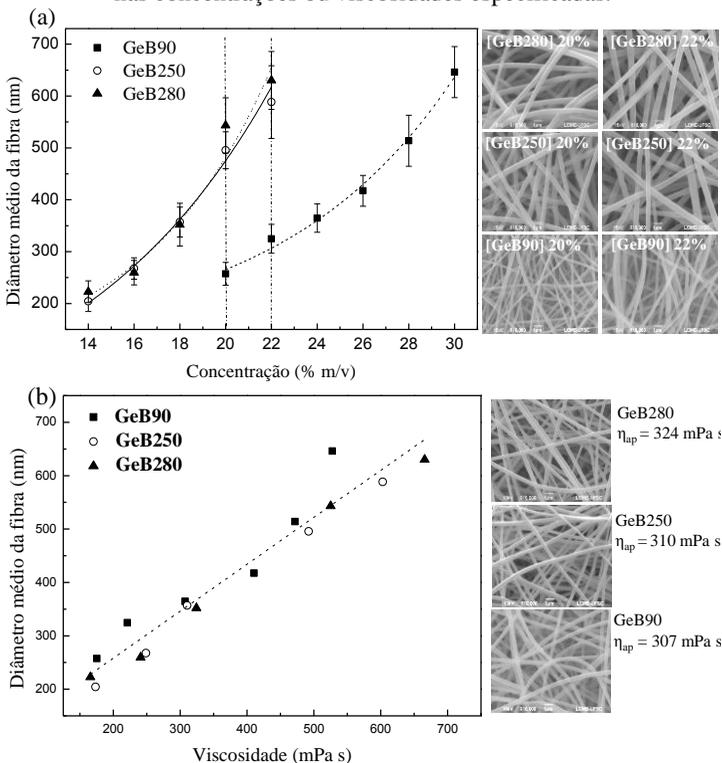
$$d_m = 10,2e^{\left(\frac{[GeB90]}{7,7}\right)} + 127,2 \quad (R^2 = 0,98) \quad (7)$$

$$d_m = 55,2e^{\left(\frac{[GeB250]}{7,7}\right)} - 74,9 \quad (R^2 = 0,98) \quad (8)$$

$$d_m = 11,7e^{\left(\frac{[GeB280]}{5,6}\right)} + 74,3 \quad (R^2 = 0,94) \quad (9)$$

$$d_m = 82,3 + 0,88\eta_{ap} \quad (R^2 = 0,94) \quad (10)$$

Figura 19: Diâmetro médio das fibras eletrofiadas a partir de GeB90, GeB250 e GeB280 plotadas em função da concentração (a) e da viscosidade (b) das soluções. Ao lado as imagens MEV das fibras de GeB90, GeB250 e GeB280 nas concentrações ou viscosidades especificadas.



Fonte: Desenvolvido pelo autor.

4.2.4 Propriedades mecânicas

Os ensaios de tração foram realizados para avaliar as propriedades mecânicas das MF eletrofiadas a partir de gelatina com diferentes índices Bloom. Para realizar estes ensaios foram escolhidas as membranas homogêneas, ou seja, aquelas que foram obtidas com excelente habilidade de eletrofiação. Os valores médios da espessura, do módulo de Young, da tensão máxima de tração e da deformação na ruptura das membranas estão resumidos na Tabela 5 e as curvas de tensão×deformação estão ilustradas na Figura 20.

Para todos os diferentes tipos de gelatina, são produzidas membranas mais espessas com concentrações mais elevadas. O aumento

na concentração gera aumento na viscosidade da solução, que está relacionada com o grau de enovelamento das cadeias de moléculas de polímero. A análise das espessuras das MF sugere que a partir de uma determinada viscosidade ocorra maior estabilidade do cone de Taylor, promovendo melhor orientação das fibras em direção ao coletor. Huang et al. (2004) obtiveram comportamento semelhante, ou seja, o aumento da concentração da solução de gelatina eletrofiada resultou em membranas mais espessas. No entanto, a diferença de espessura é minimizada no cálculo dos parâmetros de tensão e deformação. Por exemplo, requerer-se-á 2 vezes a carga para produzir a mesma elongação se a área da seção reta da amostra for dobrada (CALLISTER, 2007).

Tabela 5: Propriedades mecânicas das MF eletrofiadas a partir de soluções de gelatina de diferentes índices Bloom em ácido acético 89,6 % (v/v).

Índice Bloom	[Ge] (% m/v)	e (μm)	E (MPa)	σ_{max} (MPa)	ϵ_b (%)
90	24	55,4 \pm 12,7	88,0 \pm 25,6	1,5 \pm 0,1	1,2 \pm 0,2
	26	120,0 \pm 7,0	80,8 \pm 16,1	1,5 \pm 0,2	2,0 \pm 0,5
	28	144,4 \pm 1,1	72,0 \pm 16,4	1,4 \pm 0,1	1,8 \pm 0,2
	30	126,4 \pm 10,4	91,0 \pm 12,3	1,6 \pm 0,1	1,6 \pm 0,3
250	18	48,6 \pm 9,4	55,1 \pm 16,6	2,1 \pm 0,4	19,7 \pm 1,5
	20	91,5 \pm 2,1	74,1 \pm 18,5	2,2 \pm 0,3	28,9 \pm 8,7
	22	89,5 \pm 4,1	87,9 \pm 8,8	2,4 \pm 0,4	23,4 \pm 12,4
280	18	47,3 \pm 5,4	49,7 \pm 9,4	2,6 \pm 0,3	22,6 \pm 6,5
	20	96,3 \pm 5,4	87,4 \pm 11,1	2,5 \pm 0,2	22,2 \pm 9,0
	22	100,8 \pm 6,1	90,4 \pm 18,9	2,3 \pm 0,3	18,9 \pm 4,7

e : espessura média da membrana; E: Módulo de Young (MPa); σ_{max} : Tensão máxima de tração (MPa); ϵ_b : Deformação na ruptura (%).

Fonte: Desenvolvido pelo autor.

Para o módulo de Young, a influência da concentração na variabilidade da resposta só é significativa a um valor do coeficiente de determinação de 0,68. No entanto, o teste de Tukey não mostrou diferença ao nível de significância $\alpha = 0,05$, indicando que, nas condições estudadas, não é observada alteração do módulo de elasticidade (Tabela 6). Para a tensão máxima de tração, apenas a influência do Bloom é significativa na variabilidade da resposta, com valor de coeficiente de determinação de 0,86 (teste de Tukey significativo para todos os valores de Bloom a $p < 0,05$ – Tabela 7). Para a deformação na ruptura, embora os resultados da análise de variância não tenham sido globalmente significativos, foi observada

significância entre os valores encontrados para Bloom igual ou maior a 250 em relação ao de 90 (Tabela 8).

Tabela 6: Teste de Tukey aplicado para o módulo de Young das MF com diferentes índices Bloom.

Bloom	B90	B250	B280
	82,852	71,459	75,844
B90		0,104093	0,375424
B250	0,104093		0,719367
B280	0,375424	0,719367	

Fonte: Desenvolvido pelo autor.

Tabela 7: Teste de Tukey aplicado para a Tensão máxima de tração das MF com diferentes índices Bloom.

Bloom	B90	B250	B280
	1,519	2,220	2,467
B90		0,000128	0,000128
B250	0,000128		0,032077
B280	0,000128	0,032077	

Fonte: Desenvolvido pelo autor.

Tabela 8: Teste de Tukey aplicado para a deformação na ruptura das MF com diferentes índices Bloom.

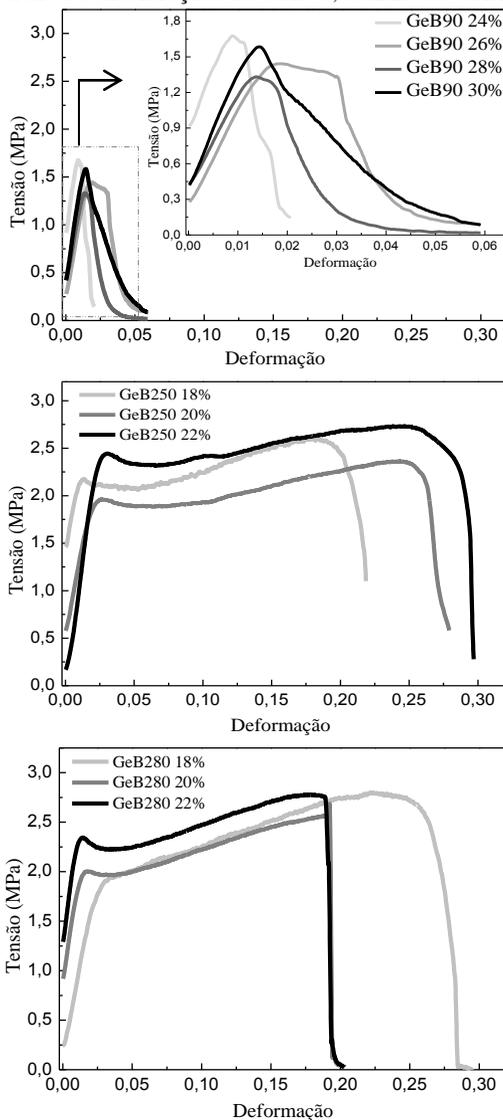
Bloom	B90	B250	B280
	1,662	24,347	21,206
B90		0,000128	0,000128
B250	0,000128		0,315085
B280	0,000128	0,315085	

Fonte: Desenvolvido pelo autor.

Estes resultados são ilustrados pelas curvas tensão deformação, Figura 20, que evidencia que as MF eletrofiadas a partir de GeB90 apresentam comportamento frágil, enquanto as eletrofiadas a partir de GeB250 e GeB280 comportam-se como plásticos. O alongamento das membranas eletrofiadas de GeB250 e GeB280 foram, em média, no mínimo dez vezes maior do que as membranas de GeB90. O aumento está de acordo com uma maior extensibilidade dos filmes contendo maiores quantidades de estrutura tripla hélice, a qual é proporcional ao índice Bloom (BIGI; PANZAVOLTA; RUBINI, 2004). Em outras palavras, com o aumento da massa molar, um número maior de moléculas parece “amarrar” ainda mais a estrutura do estado agregado.

Isto causa um aumento na flexibilidade e consequentemente aumento na tenacidade.

Figura 20: Curvas de tensão-deformação de membranas eletrofiadas a partir de diferentes concentrações de GeB90, GeB250 e GeB280.



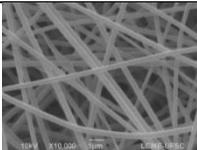
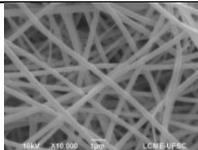
Fonte: Desenvolvido pelo autor.

4.3 RETICULAÇÃO

4.3.1 Coletor cilíndrico rotatório

Os resultados apresentados na Tabela 9 mostram que as MF coletadas em coletor cilíndrico rotatório não sofreram alterações na orientação e no diâmetro médio das fibras com relação às membranas obtidas em coletor estático. Por outro lado, o uso do coletor cilíndrico proporcionou a obtenção de uma membrana com dimensões maiores, mantendo a homogeneidade da espessura.

Tabela 9: Imagens de MEV, diâmetro médio das fibras, espessura média da membrana e dimensões das membranas obtidas a partir de solução de GeB280 18 % (m/v) em ácido acético 89,6 % (v/v) coletadas em coletores estático e cilíndrico rotatório.

Tipo de coletor	Estático	Cilíndrico rotatório
Imagens MEV		
Diâmetro médio das fibras / nm	$351,9 \pm 41,2^a$	$360,4 \pm 36,7^a$
Dimensões da membrana / cm ²	$6,0 \times 6,0$	$9,0 \times 8,0$
<i>e</i> / μm	$47,3 \pm 5,4^a$	$55,1 \pm 3,4^a$

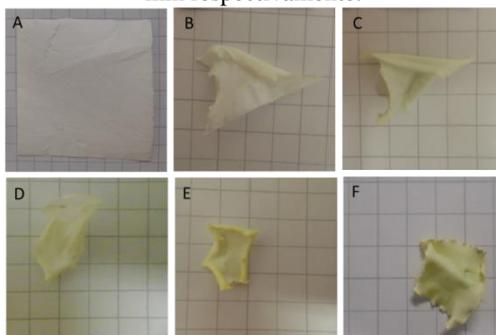
Letras diferentes na mesma linha indicam valores significativamente diferentes pelo teste Tukey ($p \leq 0,05$). *e*: diâmetro médio das membranas

Fonte: Desenvolvido pelo autor.

4.3.2 Morfologia

A reticulação de fibras de gelatina com glutaraldeído é acompanhada por retração da membrana com relação às dimensões iniciais, além de mudança na coloração. É observado o amarelamento da fibra, cujo tom aumenta em intensidade com o aumento do grau de reticulação, como apresentado na Figura 21. Estes dois fenômenos podem ser justificados em função da reação do grupo funcional aldeído do glutaraldeído com as aminas livres não protonadas da cadeia polimérica de proteína. Esta reação resulta na formação de novas ligações covalentes nas moléculas de gelatina, tanto intermolecular quanto intramolecular, com eliminação de moléculas de água (ZHANG et al., 2006; FARRIS; SONG; HUANG, 2010).

Figura 21: Imagens das membranas de gelatina eletrofiadas. A, não reticulada; B, C, D, E e F reticuladas em 2,5 % (v/v) de GTA por 45, 60, 180, 360 e 4320 min respectivamente.

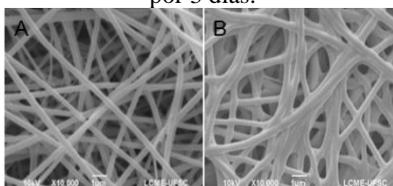


*cada quadrado do papel tem $0,5 \times 0,5 \text{ cm}^2$.

Fonte: Desenvolvido pelo autor.

Além de alterações de ordem macroscópica, é possível observar pelas imagens de MEV, Figura 22, que as membranas de gelatina eletrofiadas submetidas à reticulação sofrem deformação em suas fibras. Segundo Zhang et al. (2006), as MF de gelatina eletrofiadas sofrem fusão das fibras nos pontos de junção quando submetidas a ambientes com elevada umidade (80-90%).

Figura 22: Imagens de microscopia eletrônica de varredura das membranas de gelatina eletrofiadas: (A) não reticulada e (B) reticulada em 2,5% (v/v) de GTA por 3 dias.



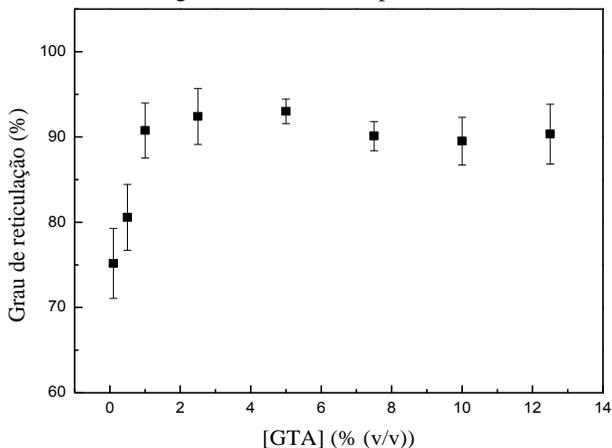
Fonte: Desenvolvido pelo autor.

4.3.3 Grau de reticulação

A eficiência da reticulação foi quantificada por determinação do grau de reticulação usando o ensaio com ninidrina. A Figura 23 mostra os resultados do grau de reticulação calculados a partir da Equação (1). Como pode ser observado, ao variar a concentração de GTA de 0,1 para 2,5 % (v/v), houve aumento de $75,2 \pm 4,1$ para $92,4 \pm 3,2$ %. Entre 2,5 e

12,5 % (v/v) de GTA o grau de reticulação não apresentou variação significativa, resultando em $90,3 \pm 3,5$ % de reticulação para a concentração mais elevada do reticulante.

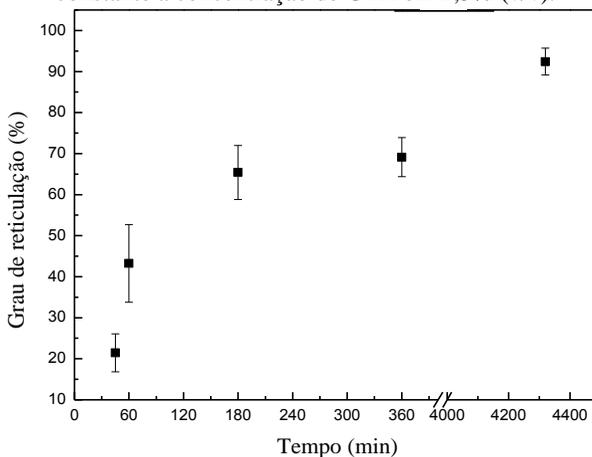
Figura 23: Efeito da variação da concentração de GTA no grau de reticulação de MF de gelatina reticuladas por 4320 min.



Fonte: Desenvolvido pelo autor.

O efeito do tempo na eficiência da reticulação das MF de gelatina foi avaliado aos 45, 60, 180, 360 e 4320 minutos à concentração de GTA de 2,5% (v/v). Aos 45 minutos, $21,4 \pm 4,6$ % da membrana de gelatina apresentou-se reticulada e em 60 minutos houve um aumento acentuado no grau de reticulação, passando a $43,2 \pm 9,5$ %, conforme pode ser observado na Figura 24. Aumentando o tempo de exposição das membranas ao glutaraldeído para 180 minutos obteve-se $65,4 \pm 6,6$ % de reticulação e, ao dobrar o tempo de reação com relação a este último, um aumento menos pronunciado foi observado, passando para $69,1 \pm 4,8$ %. Já para 4320 minutos obteve-se grau de reticulação de $92,4 \pm 3,3$ %.

Figura 24: Efeito do tempo no grau de reticulação das MF de gelatina mantendo constante a concentração de GTA em 2,5% (v/v).



Fonte: Desenvolvido pelo autor.

4.3.4 Solubilidade

O teste de solubilidade foi realizado para verificar a relação do tempo de reticulação (45, 60, 180, 360 e 4320 minutos) com a durabilidade das membranas em água nas temperaturas de 30 e 40 °C durante 96 h. Os resultados apresentados na Tabela 10 mostram a diminuição gradual da solubilidade com o aumento do tempo de reticulação em ambas as temperaturas, sendo que a membrana mais resistente foi obtida em 4320 minutos de reticulação.

Na temperatura de 30 °C, embora os resultados mostram que apenas a membrana reticulada no tempo de 4320 minutos foi insolúvel, não foi observada variabilidade estatisticamente significativa das médias obtidas para os tempos de reticulação de 60, 180, 360 e 4320 minutos. Na temperatura de 40 °C, a membrana mais resistente apresentou solubilidade de $4,7 \pm 1,1\%$. No entanto, pode-se observar que este resultado não apresentou diferença estatisticamente significativa para aqueles obtidos nos tempos de 180 e 360 minutos.

Tabela 10: Variação da porcentagem de massa solúvel da membrana de gelatina reticulada em 2,5 % (v/v) de GTA em função do tempo de reticulação nas temperaturas de 30 e 40 °C.

	Tempo de reticulação (min)				
	45	60	180	360	4320
Solubilidade a 30 °C (%)	17,8±0,5 ^a	9,6±4,2 ^{a,b}	6,8±4,5 ^{a,b}	1,8±2,5 ^b	0
Solubilidade a 40 °C (%)	33,9±7,3 ^a	30,3±5,9 ^{a,b}	12,6±4,2 ^{b,c}	9,0±1,9 ^c	4,7±1,1 ^c

Letras diferentes na mesma linha indicam valores são significativamente diferentes pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Fonte: Desenvolvido pelo autor.

Relacionando os resultados da Tabela 10 com o grau de reticulação apresentado na Figura 24, observa-se que em 45 minutos de exposição aos vapores de GTA obteve-se $21,4 \pm 4,6$ % de reticulação e a membrana apresentou $17,8 \pm 0,5$ % de solubilidade em água pelo período de 96 h a 30 °C. A membrana que sofreu $69,1 \pm 4,8$ % de reticulação (360 minutos) torna-se praticamente insolúvel em água, ou seja, solubilidade de $1,8 \pm 2,5$ % nas mesmas condições de tempo e temperatura.

4.3.5 Durabilidade ao escoamento

A durabilidade ao escoamento das MF de gelatina, reticuladas em diferentes tempos, foi determinada com o aparato experimental mostrado na Figura 15, com uma vazão de 16 mL/min por 3 h a 23 °C. Nem todas as amostras foram testadas em consequência da retração da membrana, como discutido no tópico 4.3.2. As amostras reticuladas por 360 e 4320 minutos apresentaram dimensões inferiores ao orifício do instrumento utilizado no teste de durabilidade ao escoamento, não sendo possível realizar o ensaio nesta condição. A Tabela 11 mostra os resultados para as demais membranas, reticuladas nos tempos de 45, 60 e 180 minutos.

Tabela 11: Porcentagem de durabilidade ao escoamento de membranas de gelatina reticuladas, em 2,5 % (v/v) de GTA, em função do tempo de reticulação.

	Tempo de reticulação (min)				
	45	60	180	360	4320
Durabilidade ao escoamento (%)	88,8±1,9 ^a	94,7±5,0 ^a	94,2±2,6 ^a	-	-

Letras diferentes indicam valores significativamente diferentes pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Fonte: Desenvolvido pelo autor.

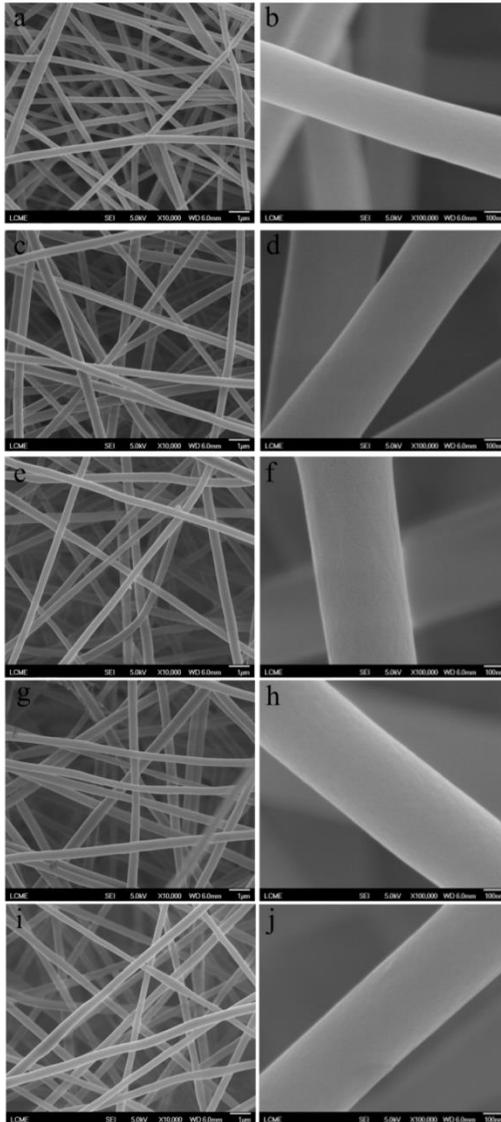
Embora o grau de reticulação aumente significativamente nesta faixa de tempo (Figura 24), a diferença na durabilidade ao escoamento não foi estatisticamente significativa.

4.4 EFEITO DA ADIÇÃO DE NANOCRISTAIS DE CELULOSE

4.4.1 Morfologia

As eletrofições das soluções e suspensões realizadas neste estudo resultaram em MF sem grânulos ou gotículas como podem ser vistas na Figura 25 (a, c, e, g e i). A adição de diferentes quantidades de NCs nas soluções de gelatina não afetou a morfologia da superfície das fibras, o que sugere, que nas concentrações investigadas, os NCs estão bem incorporados no interior das fibras. Resultados semelhantes foram obtidos por Liu, Yuan e Bhattacharyya (2012), que investigaram os efeitos da incorporação de nanocristais de celulose nas nanofibras eletrofiadas de poli (ácido láctico) na concentração de NC de 2,5 a 7,5 % (m/m). A razão atribuída por estes pesquisadores é que durante o processo de eletrofição os NCs, sob ação do campo elétrico, podem ser alinhados ao longo do eixo das fibras através de toda a fibra.

Figura 25: MEV-FEG das membranas fibrosas: GeCN0 (a e b), GeCN1 (c e d), GeCN2 (e e f), GeCN3 (g e h) e GeCN4 (I e j); a, c, e, g, i: 10,000×; b, d, f, h, j: 100,000×.



Fonte: Desenvolvido pelo autor.

O diâmetro médio das fibras de gelatina pura foi de $330,9 \pm 29,1$ nm (Tabela 12). A adição de NCs resultou em fibras mais espessas em todas as concentrações avaliadas, sendo o maior valor $434,8 \pm 69,9$ nm, obtido na concentração de 3% de NCs. Este efeito pode ser atribuído ao pequeno aumento da concentração global e o consequente aumento da viscosidade após a adição de NCs nas soluções de gelatina. No entanto, não houve uma variação estatisticamente significativa do diâmetro médio das fibras com o aumento da concentração de NCs. Efeito semelhante foi observado por Peresin et al. (2010) que afirmou não haver um efeito significativo entre o aumento do teor de nanocristais e o diâmetro das fibras.

Tabela 12. Diâmetro das fibras das correspondentes MF.

Amostra	Diâmetro das fibras / nm
GeNC0	$330,9 \pm 29,1^a$
GeNC1	$432,6 \pm 58,2^b$
GeNC2	$420,6 \pm 64,2^b$
GeNC3	$434,8 \pm 69,9^b$
GeNC4	$400,8 \pm 49,8^b$

Letras diferentes na mesma coluna indicam valores significativamente diferentes pelo teste Tukey ($p \leq 0,05$).

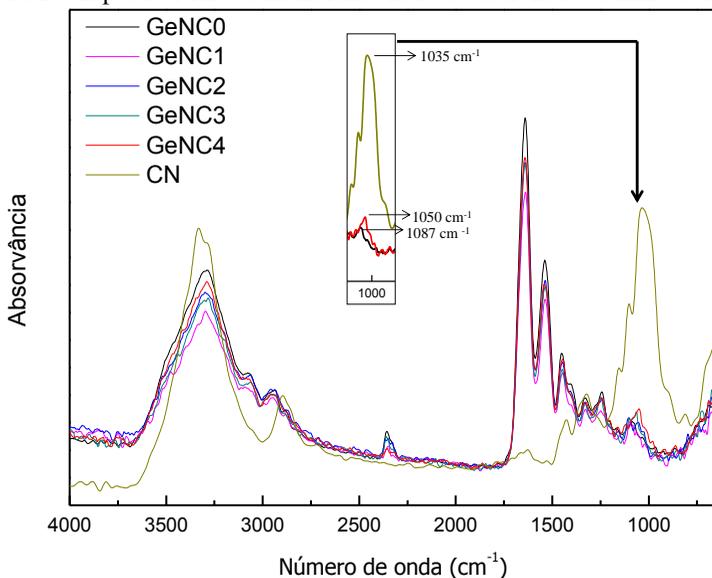
Fonte: Desenvolvido pelo autor.

4.4.2 ATR-FTIR

Na Figura 26 são mostrados os espectros ATR-FTIR das membranas fibrosas com diferentes teores de NCs, além do filme de NC puro, no intervalo de 4000 a 650 cm^{-1} . Picos de absorvância característicos para o filme de NC foram atribuídos ao estiramento O-H de ligações de hidrogênio entre 3700 - 3100 cm^{-1} (~ 3310 cm^{-1}), estiramento C-H em 2900 cm^{-1} e deformação C-OH em 1035 cm^{-1} (ZHOU et al., 2011). Para as MF de gelatina pura, bandas de absorção típicas foram identificadas em ~ 3286 cm^{-1} (amida A), ~ 1640 cm^{-1} (amida I), ~ 1538 cm^{-1} (amida II) e ~ 1243 cm^{-1} (amida III) (SANTOS et al., 2014). A banda em 1087 cm^{-1} pode ser atribuída à vibração CO (BENJAKUL et al., 2009). A análise dos espectros das membranas de compósitos mostrou que a adição de NC causou uma pequena redução nas intensidades das bandas das amidas A, I, II e III, que pode ser atribuída a um efeito de diluição da proteína gerado pela substituição parcial da gelatina por NC (NUÑEZ-FLORES et al., 2013; SANTOS et al., 2014). Além disso, a presença de NC nas MF de gelatina foi

identificada pela presença de picos entre 1035 cm^{-1} (C-OH do NCs) e 1087 cm^{-1} (CO da gelatina). Este pico pode ser visto em destaque para GeNC4 na Figura 26. Este deslocamento sugere interações entre os grupos hidroxila e carbonila de NC e gelatina, respectivamente (HUANG; LIU; YAO, 2011; SANTOS et al., 2014).

Figura 26: Espectro FTIR de membranas fibrosas eletrofiadas e filme de NCs.



Fonte: Desenvolvido pelo autor.

4.4.3 Propriedades térmicas

As curvas TG e DTG das MF com diferentes teores de NCs são mostradas nas Figuras 27 a e b, respectivamente. Parâmetros térmicos da TGA como T_{onset} e a temperatura na taxa máxima de perda de massa (T_D) estão resumidos na Tabela 13. Para GeNC0, T_{onset} foi $279,8\text{ }^\circ\text{C}$. Para o nanocompósito GeNC1 houve um ligeiro decréscimo para $278,9\text{ }^\circ\text{C}$; com o aumento no conteúdo de NC foi observado aumento dos valores de T_{onset} , atingindo o valor máximo de $291,3\text{ }^\circ\text{C}$ na concentração de 4 % (m/m). Em relação à T_D , o aumento do teor de NCs de 0 a 4 % (m/m) resultou no aumento da temperatura de $318,6\text{ }^\circ\text{C}$ para $340,1\text{ }^\circ\text{C}$.

Os resultados mostram que a incorporação de nanocristais de celulose nas MF de gelatina melhoraram a estabilidade térmica do material. Este resultado corrobora com a existência de interações entre

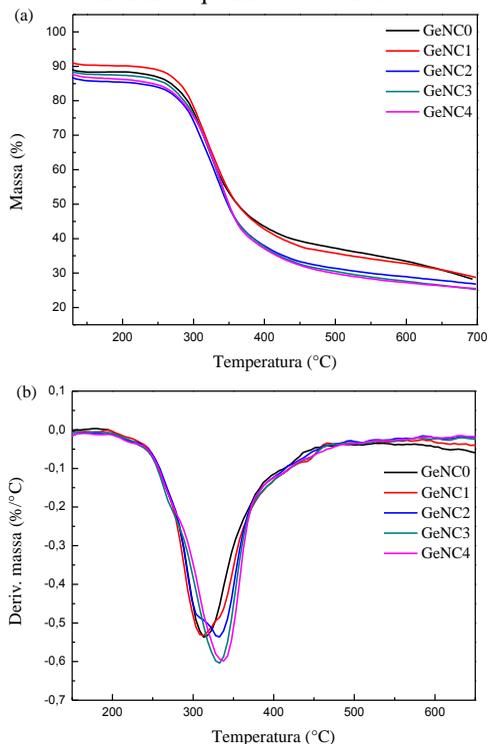
as moléculas de gelatina e NCs, uma vez que as ligações de hidrogênio restringem os movimentos dos segmentos de polímeros, aumentam a cristalinidade e, por consequência aumentam a T_D dos compósitos (KUO, 2008; SHI et al., 2012).

Tabela 13. Temperatura na taxa máxima de perda de massa (T_D) e os correspondentes valores dos picos onset.

Amostra	$T_{onset} / ^\circ\text{C}$	$T_D / ^\circ\text{C}$
GeNC0	279,8	318,6
GeNC1	278,9	315,2
GeNC2	283,7	334,0
GeNC3	286,2	334,2
GeNC4	291,3	340,1

Fonte: Desenvolvido pelo autor.

Figura 27: Curvas de TG (a) e DTG (b) das MF de gelatina eletrofiadas com diferentes quantidades de NCs.



Fonte: Desenvolvido pelo autor.

4.4.4 Propriedades mecânicas das membranas fibrosas GeNC

As MF eletrofiadas foram submetidas a ensaios de tração para investigar as propriedades mecânicas, os resultados estão ilustrados na Figura 28. Na Tabela 14 são apresentados os resultados da espessura, tensão máxima de tração, módulo de Young e deformação na ruptura em função de diferentes quantidades de NCs. Ao aumentar o teor de NCs de 0 a 1 % (m/m) o módulo de Young passou de $56,7 \pm 14,04$ para $70,6 \pm 13,03$ MPa, não sendo este um aumento estatisticamente significativo. No entanto, ao elevar a concentração de NCs para 2 % (m/m) o módulo de Young passou para $116,8 \pm 11,1$ MPa, um aumento significativo de 2 e 1,6 vezes com relação a GeCN0 e GeCN1, respectivamente. Os resultados obtidos para as MF de GeNC3 e GeNC4 não apresentaram variações estatisticamente significativas em relação a GeNC2.

Para a tensão máxima de tração, a adição de NCs resultou em melhores propriedades mecânicas, que atingiu um patamar entre 1 e 3% (m/m) e diminuiu na concentração mais elevada de NCs. Santos et al. (2014) relataram que uma das vantagens de nanocompósitos sobre compósitos convencionais é que são necessárias cargas relativamente pequenas de enchimento (tipicamente menos de 5% em massa) para obtenção da dispersão em escala nanométrica do material de enchimento na matriz, e que carga adicional pode resultar no nivelamento ou até uma diminuição de algumas propriedades. Shi et al. (2012) também observaram aumento do módulo de Young e da tensão máxima de ruptura para filmes de PLA carregados com até 5% em massa de nanocristais de celulose. Em concentrações mais elevadas, a diminuição das propriedades mecânicas foi atribuída pelo autor a uma possível agregação de NCs e consequente diminuição da coesão entre as fibras.

A deformação na ruptura, ao contrário das demais propriedades mecânicas anteriormente mencionadas, diminuiu com o aumento do teor de NC. Ao aumentar a quantidade de NC de 0 para 1% (m/m), a deformação permanece em cerca de 23 %. A adição de quantidades maiores de NCs reduz a deformação para $8,7 \pm 1,6$ % em 4 % (m/m) de NCs. Em geral, a adição de NCs na solução de gelatina eletrofiada resultou em MF mais fortes e mais resistentes à deformação. Os grupos hidroxilas abundantes na superfície dos NCs e os grupos carbonila da gelatina podem interagir por pontes de hidrogênio. Assim, o efeito de reforço mecânico pode ser atribuído à transferência de tensão da gelatina para NCs pelas ligações de hidrogênio entre estes dois componentes (ZHOU; WANG; WU, 2012; SANTOS et al., 2014).

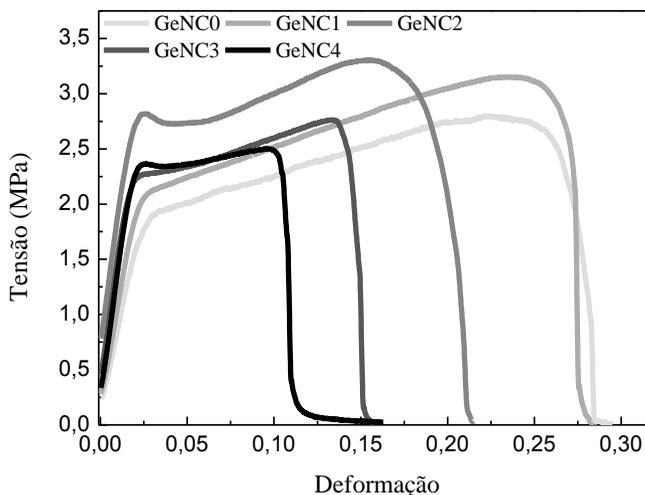
Tabela 14: Propriedades mecânicas das MF de gelatina com diferentes teores de NC.

Amostra	$e / \mu\text{m}$	E (MPa)	σ_{max} (MPa)	ε_b (%)
GeNC0	51,8±3,8	56,7±14,0 ^a	2,5±0,3 ^a	22,9±5,7 ^{a,b}
GeNC1	180,8±5,6	70,6±13,0 ^a	3,5±0,4 ^b	23,8±6,1 ^a
GeNC2	175,4±9,2	116,9±11,1 ^b	3,5±0,3 ^b	17,0±3,8 ^{b,c}
GeNC3	188,2±10,2	117,3±20,4 ^b	3,2±0,4 ^{a,b}	13,2±1,5 ^{c,d}
GeNC4	190,0±11,3	112,2±21,5 ^b	2,5±0,4 ^a	8,7±1,6 ^d

Letras diferentes na mesma coluna indicam valores significativamente diferentes pelo teste Tukey ($p \leq 0,05$). e : espessura média da membrana; E: Módulo de Young (MPa); σ_{max} : Tensão máxima de tração (MPa); ε_b : Deformação na ruptura (%).

Fonte: Desenvolvido pelo autor.

Figura 28: Curvas tensão-deformação de membranas de gelatina eletrofiadas com diferentes teores de NCs.



Fonte: Desenvolvido pelo autor.

4.4.5 Solubilidade

As membranas fibrosas GeNC0 e GeNC4 foram submersas em água por 24h a 25°C para verificar o efeito da incorporação de NCs na solubilidade das MF de gelatina. A Tabela 15 apresenta os resultados em porcentagem de massa solúvel, em que pode ser observado que GeNC4 apresentou uma diminuição de 8,0 % de massa solúvel quando comparada com GeNC0.

Embora tenham sido apresentadas evidências de interações entre os polímeros do nanocompósito, esta variação não foi significativamente diferente pelo teste Tukey ($p \leq 0,05$). Este resultado pode ser explicado pelo fato de que os NCs, sob ação do campo elétrico, podem ser alinhados ao longo do eixo das fibras e estão incorporados no interior das mesmas, como discutido no item 4.4.1. Desta forma, a semelhança na solubilidade é justificada já que a camada externa da fibra é formada apenas por gelatina, a qual é solúvel em água.

Tabela 15: Solubilidade após 24h sob agitação suave a 25°C.

Amostra	Massa solúvel / %
GeNC0	35,9 \pm 4,6 ^a
GENC4	29,2 \pm 0,6 ^a

Letras diferentes na mesma coluna indicam valores significativamente diferentes pelo teste Tukey ($p \leq 0,05$).

Fonte: Desenvolvido pelo autor.

5 CONCLUSÕES

Neste trabalho foi investigada a habilidade de eletrofiação de soluções de gelatina de diferentes índices Bloom, as propriedades mecânicas das membranas formadas, a relação do grau de reticulação com a durabilidade em meio aquoso além da eletrofiação do compósito GeNC e caracterização das membranas. Considerando que a viscosidade é a propriedade mais importante para obtenção de uma eletrofiação de sucesso, quanto mais baixo o índice Bloom da gelatina, mais concentrada deve ser a solução para que se atinja a viscosidade ideal. Os resultados indicaram que um intervalo de viscosidade adequado para produção de MF homogêneas é aproximadamente de 300 a 700 mPa s, e que, portanto, a gelatina de índice Bloom mais alto pode ser uma alternativa mais econômica do que gelatina de baixo índice Bloom. As MF de gelatina de GeB90 mostraram comportamento mecânico diferente daquelas obtidas com GeB250 e GeB280, sugerindo que gelatinas de baixo índice Bloom produzem MF quebradiças, frágeis, enquanto as de alto índice Bloom produzem MF com comportamento plástico. Com relação à ação do reticulante (glutaraldeído) sobre as MF, pode-se concluir que a partir de aproximadamente 50% de reticulação, estas apresentam boa durabilidade em sistemas aquosos nas condições investigadas. Admitindo que o processo de reticulação se inicie na camada externa e avance para o interior das fibras, pode-se sugerir que a reticulação iniciada na superfície protege a membrana, garantindo durabilidade mesmo que esta não esteja 100% reticulada.

Perante as informações que se tem até o momento, este é o primeiro trabalho a eletrofiar e caracterizar as MF de gelatina/NCs. Embora a presença de NCs não tenha gerado alterações na morfologia superficial das fibras de gelatina, analisadas por SEM-FEG, o seu efeito sobre as MF de gelatina pôde ser observado pelo aumento no diâmetro médio das fibras, nas alterações do espectro de FTIR e melhora na estabilidade térmica das MF de gelatina, indicando miscibilidade entre os polímeros através de ligação de hidrogênio. Além disso, a adição de NCs melhorou as propriedades mecânicas, aumentando o módulo de Young e diminuindo a elasticidade. Embora as MF contendo NCs não apresentem melhora tão significativa no que concerne à solubilidade em água como aquelas reticuladas por glutaraldeído, este trabalho confirma que NC é um bom material de enchimento para melhorar as propriedades mecânicas de gelatina, o que contribui para o avanço da pesquisa futura na área biomédica.

5.1 SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS

NCs oxidados com periodato de sódio (NaIO_4) apresentam propriedades reticulantes para materiais colagenosos (DASH; FOSTON; RAGAUSKAS, 2013). No entanto, a reação de reticulação não é favorecida em pH ácido, pH este em que a solução de gelatina tem sido eletrofiada. Como uma sugestão coloca-se a substituição do solvente por outro de pH mais elevado e adição de NCs oxidados à solução de gelatina a ser eletrofiada. Outra sugestão seria substituir a gelatina suína pela gelatina de peixe, que apresenta menor capacidade de gelificação, possibilitando o uso do solvente água/HAc com maior proporção de água.

Avaliar a morfologia, por MEV, da secção transversal das fibras reticuladas por glutaraldeído e das fibras de nanocomposito GeNC.

REFERÊNCIAS

ALAOUI, I. M.; MENZEL, E. R. Substituent effects on luminescence enhancement in europium and terbium Ruhemann's purple complexes. **Forensic Science International**, v. 77, n. 1-2, p. 3-11, Jan 12 1996.

AZHAR, F. F.; OLAD, A.; SALEHI, R. Fabrication and characterization of chitosan-gelatin/nanohydroxyapatite-polyaniline composite with potential application in tissue engineering scaffolds. **Designed Monomers and Polymers**, v. 17, n. 7, p. 654-667, Oct 3 2014.

BENJAKUL, S.; OUNGBHO, K.; VISESSANGUAN, W.; THIANILAKUL, Y.; ROYTRAKUL, S. Characteristics of gelatin from the skins of bigeye snapper, *Priacanthus tayenus* and *Priacanthus macracanthus*. **Food Chemistry**, v. 116, n. 2, p. 445-451, 2009.

BHARDWAJ, N.; KUNDU, S. C. Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique. **Biotechnology Advances**, v. 28, n. 3, p. 325-347, 2010.

BIGI, A.; PANZAVOLTA, S.; RUBINI, K. Relationship between triple-helix content and mechanical properties of gelatin films. **Biomaterials**, v. 25, n. 25, p. 5675-5680, Nov 2004.

CALLISTER, W. D. **Materials science and engineering : an introduction**. 7th, New York: 2007.

CAO, X.; CHEN, Y.; CHANG, P. R.; MUIR, A. D.; FALK, G. Starch-based nanocomposites reinforced with flax cellulose nanocrystals. **Express Polymer Letters**, v. 2, n. 7, p. 502-510, Jul 2008.

CAO, X.; HUANG, M.; DING, B.; YU, J.; SUN, G. Robust polyacrylonitrile nanofibrous membrane reinforced with jute cellulose nanowhiskers for water purification. **Desalination**, v. 316, n. 0, p. 120-126, 2013.

CHANGSARN, S.; MENDEZ, J. D.; SHANMUGANATHAN, K.; FOSTER, E. J.; WEDER, C.; SUPAPHOL, P. Biologically Inspired Hierarchical Design of Nanocomposites Based on Poly(ethylene oxide)

and Cellulose Nanofibers. **Macromolecular Rapid Communications**, v. 32, n. 17, p. 1367-1372, Sep 1 2011.

CHEN, Z.; WEI, B.; MO, X.; LIM, C. T.; RAMAKRISHNA, S.; CUI, F. Mechanical properties of electrospun collagen-chitosan complex single fibers and membrane. **Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications**, v. 29, n. 8, p. 2428-2435, Oct 15 2009.

CHOKTAWEESSAP, N.; ARAYANARAKUL, K.; AHT-ONG, D.; MEECHAISUE, C.; SUPAPHOL, P. Electrospun gelatin fibers: Effect of solvent system on morphology and fiber diameters. **Polymer Journal**, v. 39, n. 6, p. 622-631, 2007 2007.

COX, M. M.; NELSON, D. L. **Lehninger - Princípios de Bioquímica**. 3ª, São Paulo - SP: 2002.

CUI, W. G.; ZHOU, S. B.; LI, X. H.; WENG, J. Drug-loaded biodegradable polymeric nanofibers prepared by electrospinning. **Tissue Engineering**, v. 12, n. 4, p. 1070-1070, Apr 2006.

DASH, R.; FOSTON, M.; RAGAUSKAS, A. J. Improving the mechanical and thermal properties of gelatin hydrogels cross-linked by cellulose nanowhiskers. **Carbohydrate Polymers**, v. 91, n. 2, p. 638-645, Jan 2013.

DE CARVALHO, R. A.; GROSSO, C. R. F. Characterization of gelatin based films modified with transglutaminase, glyoxal and formaldehyde. **Food Hydrocolloids**, v. 18, n. 5, p. 717-726, Sep 2004.

DHANDAYUTHAPANI, B.; KRISHNAN, U. M.; SETHURAMAN, S. Fabrication and characterization of chitosan-gelatin blend nanofibers for skin tissue engineering. **Journal of Biomedical Materials Research Part B-Applied Biomaterials**, v. 94B, n. 1, p. 264-272, Jul 2010.

DONG, X. M.; REVOL, J. F.; GRAY, D. G. Effect of microcrystallite preparation conditions on the formation of colloid crystals of cellulose. **Cellulose**, v. 5, n. 1, p. 19-32, Mar 1998.

DOSHI, J.; RENEKER, D. H. ELECTROSPINNING PROCESS AND APPLICATIONS OF ELECTROSPUN FIBERS. **Journal of Electrostatics**, v. 35, n. 2-3, p. 151-160, Aug 1995.

DURAN, N.; LEMES, A. P.; SEABRA, A. B. Review of Cellulose Nanocrystals Patents: Preparation, Composites and General Applications. **Recent Patents on Nanotechnology**, v. 6, n. 1, p. 16-28, Jan 2012.

ERENCIA, M.; CANO, F.; TORNERO, J. A.; MACANAS, J.; CARRILLO, F. Resolving the Electrospinnability Zones and Diameter Prediction for the Electrospinning of the Gelatin/Water/Acetic Acid System. **Langmuir**, v. 30, n. 24, p. 7198-7205, Jun 24 2014.

FARRIS, S.; SONG, J.; HUANG, Q. Alternative Reaction Mechanism for the Cross-Linking of Gelatin with Glutaraldehyde. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 2, p. 998-1003, Jan 27 2010.

FONG, H.; CHUN, I.; RENEKER, D. H. Beaded nanofibers formed during electrospinning. **Polymer**, v. 40, n. 16, p. 4585-4592, Jul 1999.

FRENOT, A.; CHRONAKIS, I. S. Polymer nanofibers assembled by electrospinning. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 8, n. 1, p. 64-75, Mar 2003.

FRIESS, W.; LEE, G. Basic thermoanalytical studies of insoluble collagen matrices. **Biomaterials**, v. 17, n. 23, p. 2289-2294, Dec 1996.

GAST, K.; SIEMER, A.; ZIRWER, D.; DAMASCHUN, G. Fluoroalcohol-induced structural changes of proteins: some aspects of cosolvent-protein interactions. **European Biophysics Journal with Biophysics Letters**, v. 30, n. 4, p. 273-283, Aug 2001.

GELTMEYER, J.; VAN DER SCHUEREN, L.; GOETHALS, F.; DE BUYSSER, K.; DE CLERCK, K. Optimum sol viscosity for stable electrospinning of silica nanofibres. **Journal of Sol-Gel Science and Technology**, v. 67, n. 1, p. 188-195, Jul 2013.

GOISSIS, G.; JUNIOR, E. M.; MARCANTONIO, J. A. C.; LIA, R. C. C.; CANCIAN, D. C. J.; DE CARVALHO, M. Biocompatibility studies

of anionic collagen membranes with different degree of glutaraldehyde cross-linking. **Biomaterials**, v. 20, n. 1, p. 27-34, Jan 1999.

GREINER, A.; WENDORFF, J. H. Electrospinning: A fascinating method for the preparation of ultrathin fibres. **Angewandte Chemie-International Edition**, v. 46, n. 30, p. 5670-5703, 2007 2007.

HOMAYONI, H.; RAVANDI, S. A. H.; VALIZADEH, M. Electrospinning of chitosan nanofibers: Processing optimization. **Carbohydrate Polymers**, v. 77, n. 3, p. 656-661, Jul 2009.

HUANG, J.; LIU, L.; YAO, J. Electrospinning of Bombyx mori Silk Fibroin Nanofiber Mats Reinforced by Cellulose Nanowhiskers. **Fibers and Polymers**, v. 12, n. 8, p. 1002-1006, Dec 2011.

HUANG, Z. M.; ZHANG, Y. Z.; KOTAKI, M.; RAMAKRISHNA, S. A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites. **Composites Science and Technology**, v. 63, n. 15, p. 2223-2253, Nov 2003.

HUANG, Z. M.; ZHANG, Y. Z.; RAMAKRISHNA, S.; LIM, C. T. Electrospinning and mechanical characterization of gelatin nanofibers. **Polymer**, v. 45, n. 15, p. 5361-5368, Jul 2004.

JING, X.; SALICK, M. R.; CORDIE, T.; MI, H.-Y.; PENG, X.-F.; TURNG, L.-S. Electrospinning Homogeneous Nanofibrous Poly(propylene carbonate)/Gelatin Composite Scaffolds for Tissue Engineering. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 53, n. 22, p. 9391-9400, Jun 4 2014.

KATO, Y. P.; CHRISTIANSEN, D. L.; HAHN, R. A.; SHIEH, S. J.; GOLDSTEIN, J. D.; SILVER, F. H. MECHANICAL-PROPERTIES OF COLLAGEN-FIBERS - A COMPARISON OF RECONSTITUTED AND RAT TAIL TENDON FIBERS. **Biomaterials**, v. 10, n. 1, p. 38-41, Jan 1989.

KHOR, E. Methods for the treatment of collagenous tissues for bioprotheses. **Biomaterials**, v. 18, n. 2, p. 95-105, Jan 1997.

KI, C. S.; BAEK, D. H.; GANG, K. D.; LEE, K. H.; UM, I. C.; PARK, Y. H. Characterization of gelatin nanofiber prepared from gelatin-formic acid solution. **Polymer**, v. 46, n. 14, p. 5094-5102, 2005.

KRIEGEL, C.; ARRECHI, A.; KIT, K.; MCCLEMENTS, D. J.; WEISS, J. Fabrication, functionalization, and application of electrospun biopolymer nanofibers. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 48, n. 8, p. 775-797, 2008 2008.

KUO, S.-W. Hydrogen-bonding in polymer blends. **Journal of Polymer Research**, v. 15, n. 6, p. 459-486, Dec 2008.

LAI, J.-Y. The Role of Bloom Index of Gelatin on the Interaction with Retinal Pigment Epithelial Cells. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 10, n. 8, p. 3442-3456, Aug 2009.

LEE, J.; DENG, Y. Increased mechanical properties of aligned and isotropic electrospun PVA nanofiber webs by cellulose nanowhisker reinforcement. **Macromolecular Research**, v. 20, n. 1, p. 76-83, Jan 2012.

LI, J. X.; HE, A. H.; ZHENG, J. F.; HAN, C. C. Gelatin and gelatin-hyaluronic acid nanofibrous membranes produced by electrospinning of their aqueous solutions. **Biomacromolecules**, v. 7, n. 7, p. 2243-2247, Jul 2006a.

LI, M.; GUO, Y.; WEI, Y.; MACDIARMID, A. G.; LELKES, P. I. Electrospinning polyaniline-contained gelatin nanofibers for tissue engineering applications. **Biomaterials**, v. 27, n. 13, p. 2705-2715, 2006b.

LIN, W.-H.; TSAI, W.-B. In situ UV-crosslinking gelatin electrospun fibers for tissue engineering applications. **Biofabrication**, v. 5, n. 3, Sep 2013.

LIU, D.; YUAN, X.; BHATTACHARYYA, D. The effects of cellulose nanowhiskers on electrospun poly (lactic acid) nanofibres. **Journal of Materials Science**, v. 47, n. 7, p. 3159-3165, Apr 2012.

LUU, Y. K.; KIM, K.; HSIAO, B. S.; CHU, B.; HADJIARGYROU, M. Development of a nanostructured DNA delivery scaffold via

electrospinning of PLGA and PLA-PEG block copolymers. **Journal of Controlled Release**, v. 89, n. 2, p. 341-353, Apr 29 2003.

MA, Z. W.; KOTAKI, M.; RAMAKRISHNA, S. Electrospun cellulose nanofiber as affinity membrane. **Journal of Membrane Science**, v. 265, n. 1-2, p. 115-123, Nov 15 2005.

MA, Z. W.; KOTAKI, M.; RAMAKRISHNA, S. Surface modified nonwoven polysulphone (PSU) fiber mesh by electrospinning: A novel affinity membrane. **Journal of Membrane Science**, v. 272, n. 1-2, p. 179-187, Mar 15 2006.

MARTUCCI, J. F.; ACCAREDDU, A. E. M.; RUSECKAITE, R. A. Preparation and characterization of plasticized gelatin films cross-linked with low concentrations of Glutaraldehyde. **Journal of Materials Science**, v. 47, n. 7, p. 3282-3292, Apr 2012.

MESQUITA, J. P. D. **Nanocristais de celulose para preparação de bionanocompósitos com quitosana e carbonos nanoestruturados para aplicações tecnológicas e ambientais**. Tese. Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2012.

MIT-UPPATHAM, C.; NITHITANAKUL, M.; SUPAPHOL, P. Ultrathin electrospun polyamide-6 fibers: Effect of solution conditions on morphology and average fiber diameter. **Macromolecular Chemistry and Physics**, v. 205, n. 17, p. 2327-2338, Nov 26 2004.

MUYONGA, J. H.; COLE, C. G. B.; DUODU, K. G. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopic study of acid soluble collagen and gelatin from skins and bones of young and adult Nile perch (*Lates niloticus*). **Food Chemistry**, v. 86, n. 3, p. 325-332, Jul 2004.

NAGIAH, N.; MADHAVI, L.; ANITHA, R.; SRINIVASAN, N. T.; SIVAGNANAM, U. T. Electrospinning of poly (3-hydroxybutyric acid) and gelatin blended thin films: fabrication, characterization, and application in skin regeneration. **Polymer Bulletin**, v. 70, n. 8, p. 2337-2358, Aug 2013.

NGUYEN THUY BA, L.; LEE, B.-T. Electrospinning of polyvinyl alcohol/gelatin nanofiber composites and cross-linking for bone tissue

engineering application. **Journal of Biomaterials Applications**, v. 27, n. 3, p. 255-266, Sep 2012.

NÚÑEZ-FLORES, R.; GIMÉNEZ, B.; FERNÁNDEZ-MARTÍN, F.; LÓPEZ-CABALLERO, M. E.; MONTERO, M. P.; GÓMEZ-GUILLÉN, M. C. Physical and functional characterization of active fish gelatin films incorporated with lignin. **Food Hydrocolloids**, v. 30, n. 1, p. 163-172, 2013.

OKUTAN, N.; TERZI, P.; ALTAY, F. Affecting parameters on electrospinning process and characterization of electrospun gelatin nanofibers. **Food Hydrocolloids**, v. 39, p. 19-26, Aug 2014.

PANTHI, G.; BARAKAT, N. A. M.; RISAL, P.; YOUSEF, A.; PANT, B.; UNNITHAN, A. R.; KIM, H. Y. Preparation and characterization of nylon-6/gelatin composite nanofibers via electrospinning for biomedical applications. **Fibers and Polymers**, v. 14, n. 5, p. 718-723, May 2013.

PANZAVOLTA, S.; GIOFFRÈ, M.; FOCARETE, M. L.; GUALANDI, C.; FORONI, L.; BIGI, A. Electrospun gelatin nanofibers: Optimization of genipin cross-linking to preserve fiber morphology after exposure to water. **Acta Biomaterialia**, v. 7, n. 4, p. 1702-1709, 2011.

PELIPENKO, J.; KRISTL, J.; JANKOVIĆ, B.; BAUMGARTNER, S.; KOCBEK, P. The impact of relative humidity during electrospinning on the morphology and mechanical properties of nanofibers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 456, n. 1, p. 125-134, 2013.

PERESIN, M. S.; HABIBI, Y.; ZOPPE, J. O.; PAWLAK, J. J.; ROJAS, O. J. Nanofiber Composites of Polyvinyl Alcohol and Cellulose Nanocrystals: Manufacture and Characterization. **Biomacromolecules**, v. 11, n. 3, p. 674-681, Mar 2010.

PHADKE, K. V.; MANJESHWAR, L. S.; AMINABHAVI, T. M. Biodegradable polymeric microspheres of gelatin and carboxymethyl guar gum for controlled release of theophylline. **Polymer Bulletin**, v. 71, n. 7, p. 1625-1643, Jul 2014.

PIOTROWSKA, B.; SZTUKA, K.; KOŁODZIEJSKA, I.; DOBROSIELSKA, E. Influence of transglutaminase or 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC) on the properties of fish-

skin gelatin films. **Food Hydrocolloids**, v. 22, n. 7, p. 1362-1371, 2008.

POVERENOV, E.; ZAITSEV, Y.; ARNON, H.; GRANIT, R.; ALKALAI-TUVIA, S.; PERZELAN, Y.; WEINBERG, T.; FALLIK, E. Effects of a composite chitosan-gelatin edible coating on postharvest quality and storability of red bell peppers. **Postharvest Biology and Technology**, v. 96, p. 106-109, Oct 2014.

RAMAKRISHNA, S.; FUJIHARA, K.; TEO, W.-E.; LIM, T.-C.; MA, Z. **An Introduction to Electrospinning and Nanofibers**. World Scientific Publishing Company 396. 2005.

RAMAKRISHNA, S.; FUJIHARA, K.; TEO, W.-E.; YONG, T.; MA, Z.; RAMASESHAN, R. Electrospun nanofibers: solving global issues. **Materials Today**, v. 9, n. 3, p. 40-50, Mar 2006.

RATANA VARAPORN, J.; RANGKUPAN, R.; JEERATAWATCHAI, H.; KANOKPANONT, S.; DAMRONGSAKKUL, S. Influences of physical and chemical crosslinking techniques on electrospun type A and B gelatin fiber mats. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 47, n. 4, p. 431-438, 2010.

RENEKER, D. H.; CHUN, I. Nanometre diameter fibres of polymer, produced by electrospinning. **Nanotechnology**, v. 7, n. 3, p. 216-223, Sep 1996.

SACUI, I. A.; NIEUWENDAAL, R. C.; BURNETT, D. J.; STRANICK, S. J.; JORFI, M.; WEDER, C.; FOSTER, E. J.; OLSSON, R. T.; GILMAN, J. W. Comparison of the Properties of Cellulose Nanocrystals and Cellulose Nanofibrils Isolated from Bacteria, Tunicate, and Wood Processed Using Acid, Enzymatic, Mechanical, and Oxidative Methods. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 6, n. 9, p. 6127-6138, May 14 2014.

SANTOS, T. M.; SOUZA FILHO, M. D. S. M.; CACERES, C. A.; ROSA, M. F.; MORAIS, J. P. S.; PINTO, A. M. B.; AZEREDO, H. M. C. Fish gelatin films as affected by cellulose whiskers and sonication. **Food Hydrocolloids**, v. 41, p. 113-118, Dec 2014.

SAXENA, A.; SACHIN, K.; BOHIDAR, H. B.; VERMA, A. K. Effect of molecular weight heterogeneity on drug encapsulation efficiency of gelatin nano-particles. **Colloids and Surfaces B-Biointerfaces**, v. 45, n. 1, p. 42-48, Sep 25 2005.

SCHACHT, E.; BOGDANOV, B.; VANDENBULCKE, A.; DEROOZE, N. Hydrogels prepared by crosslinking of gelatin with dextran dialdehyde. **Reactive & Functional Polymers**, v. 33, n. 2-3, p. 109-116, Aug 1997.

SCHRIEBER, R.; GAREIS, H. **Gelatine Handbook - Theory and Industrial Practice**. Weinheim: Wiley-VCH-Verl. 2007.

SEGTNAN, V. H.; ISAKSSON, T. Temperature, sample and time dependent structural characteristics of gelatine gels studied by near infrared spectroscopy. **Food Hydrocolloids**, v. 18, n. 1, p. 1-11, 2004.

SHEFY-PELEG, A.; FOOX, M.; COHEN, B.; ZILBERMAN, M. Novel Antibiotic-Eluting Gelatin-Alginate Soft Tissue Adhesives for Various Wound Closing Applications. **International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials**, v. 63, n. 14, p. 699-707, Sep 22 2014.

SHI, Q.; ZHOU, C.; YUE, Y.; GUO, W.; WU, Y.; WU, Q. Mechanical properties and in vitro degradation of electrospun bio-nanocomposite mats from PLA and cellulose nanocrystals. **Carbohydrate Polymers**, v. 90, n. 1, p. 301-308, 2012.

SONG, J.-H.; KIM, H.-E.; KIM, H.-W. Production of electrospun gelatin nanofiber by water-based co-solvent approach. **Journal of Materials Science-Materials in Medicine**, v. 19, n. 1, p. 95-102, Jan 2008.

SONGCHOTIKUNPAN, P.; TATTIYAKUL, J.; SUPAPHOL, P. Extraction and electrospinning of gelatin from fish skin. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 42, n. 3, p. 247-255, Apr 2008.

SOUZA, V. C.; QUADRI, M. G. N. Preparation and Properties of Cellulose Nanocrystals Derived from Corn Cobs: Application as a

Reinforcing Material for "Green Nanocomposite" Films. **Journal of Biobased Materials and Bioenergy**, v. 8, n. 5, p. 495-505, Oct 2014.

STAROSZCZYK, H.; PIELICHOWSKA, J.; SZTUKA, K.; STANGRET, J.; KOLODZIEJSKA, I. Molecular and structural characteristics of cod gelatin films modified with EDC and TGase. **Food Chemistry**, v. 130, n. 2, p. 335-343, Jan 2012.

STEVENS, E. S. **Green Plastics: An Introduction to the New Science of Biodegradable Plastics**. Princeton University Press. 2002.

SUBBIAH, T.; BHAT, G. S.; TOCK, R. W.; PARARNESWARAN, S.; RAMKUMAR, S. S. Electrospinning of nanofibers. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 96, n. 2, p. 557-569, Apr 15 2005.

SUNG, H. W.; HUANG, D. M.; CHANG, W. H.; HUANG, R. N.; HSU, J. C. Evaluation of gelatin hydrogel crosslinked with various crosslinking agents as bioadhesives: In vitro study. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 46, n. 4, p. 520-530, Sep 15 1999.

TAYLOR, G. ELECTRICALLY DRIVEN JETS. **Proceedings of the Royal Society of London Series a-Mathematical and Physical Sciences**, v. 313, n. 1515, p. 453-&, 1969 1969.

WELLE, A.; KROEGER, M.; DOERING, M.; NIEDERER, K.; PINDEL, E.; CHRONAKIS, I. S. Electrospun aliphatic polycarbonates as tailored tissue scaffold materials. **Biomaterials**, v. 28, n. 13, p. 2211-2219, Apr 2007.

YARIN, A. L.; KOOMBHONGSE, S.; RENEKER, D. H. Bending instability in electrospinning of nanofibers. **Journal of Applied Physics**, v. 89, n. 5, p. 3018-3026, Mar 1 2001.

YOSHIMATSU, K.; YE, L.; LINDBERG, J.; CHRONAKIS, I. S. Selective molecular adsorption using electrospun nanofiber affinity membranes. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 23, n. 7, p. 1208-1215, Feb 28 2008.

ZHA, Z. B.; TENG, W. B.; MARKLE, V.; DAI, Z. F.; WU, X. Y. Fabrication of gelatin nanofibrous scaffolds using ethanol/phosphate

buffer saline as a benign solvent. **Biopolymers**, v. 97, n. 12, p. 1026-1036, Dec 2012.

ZHANG, Y. Z.; VENUGOPAL, J.; HUANG, Z. M.; LIM, C. T.; RAMAKRISHNA, S. Crosslinking of the electrospun gelatin nanofibers. **Polymer**, v. 47, n. 8, p. 2911-2917, Apr 5 2006.

ZHOU, C.; CHU, R.; WU, R.; WU, Q. Electrospun Polyethylene Oxide/Cellulose Nanocrystal Composite Nanofibrous Mats with Homogeneous and Heterogeneous Microstructures. **Biomacromolecules**, v. 12, n. 7, p. 2617-2625, Jul 2011.

ZHOU, C.; WANG, Q.; WU, Q. UV-initiated crosslinking of electrospun poly(ethylene oxide) nanofibers with pentaerythritol triacrylate: Effect of irradiation time and incorporated cellulose nanocrystals. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, n. 2, p. 1779-1786, Jan 15 2012.