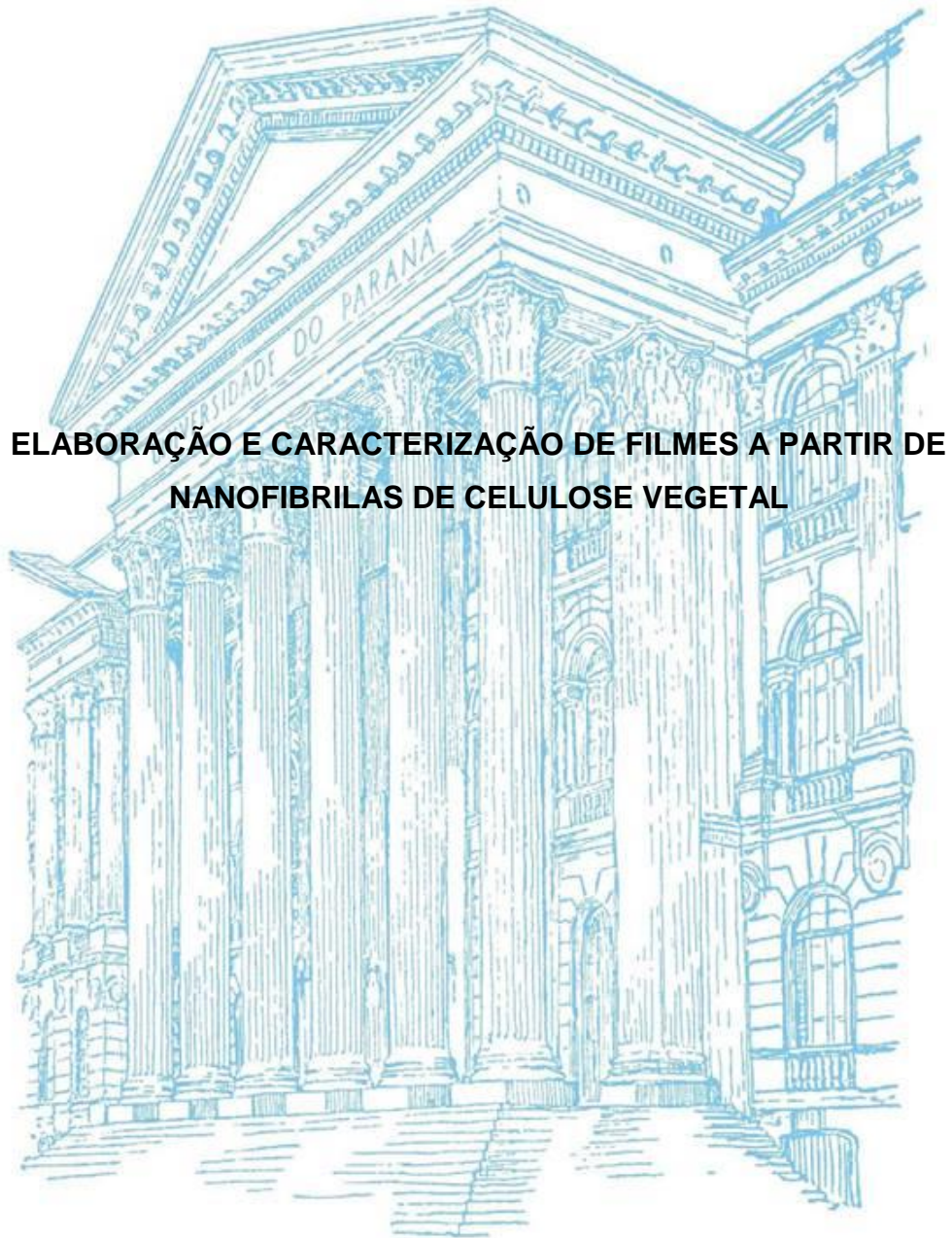


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

FRANCINE CECCON CLARO



**ELABORAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE FILMES A PARTIR DE
NANOFIBRILAS DE CELULOSE VEGETAL**

CURITIBA

2017

FRANCINE CECCON CLARO

**ELABORAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE FILMES A PARTIR DE
NANOFIBRILAS DE CELULOSE VEGETAL**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção de grau de Mestre. Área de concentração: Engenharia e Ciência dos Materiais, Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência dos Materiais - PIPE. Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Washington Luiz Esteves Magalhães.

CURITIBA

2017

C613e

Claro, Francine Ceccon

Elaboração e caracterização de filmes a partir de nanofibrilas de celulose vegetal / Francine Ceccon Claro. – Curitiba, 2017.

115 f. : il. color. ; 30 cm.

Dissertação - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência dos Materiais, 2017.

Orientador: Washington Luiz Esteves Magalhães .

Bibliografia: p. 108-115.

1. Células – Membranas. 2. Celulose. 3. Hemicelulose. 4. Ferimentos e lesões – Tratamento. 5. Queimaduras. 6. Curativos. 7. Filme de nanocelulose. 8. Óleo de calêndula. 9. Nanopartículas de prata. I. Universidade Federal do Paraná. II. Magalhães, Washington Luiz Esteves. III. Título.

CDD: 660.634



ATA Nº333

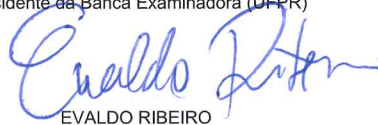
ATA DE SESSÃO PÚBLICA DE DEFESA DE MESTRADO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DOS MATERIAIS

No dia dezessete de Julho de dois mil e dezessete às 14:00 horas, na sala Auditório Léo Grossman, Campus Politécnico da UFPR, foram instalados os trabalhos de arguição da mestranda **FRANCINE CECCON CLARO** para a Defesa Pública de sua dissertação intitulada **ELABORAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE FILMES A PARTIR DE NANOFIBRILAS DE CELULOSE VEGETAL**. A Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em ENGENHARIA E CIÊNCIA DOS MATERIAIS da Universidade Federal do Paraná, foi constituída pelos seguintes Membros: WASHINGTON LUIZ ESTEVES MAGALHÃES (UFPR), EVALDO RIBEIRO (UFPR), GISELLE MARIA MACIEL (UTFPR). Dando início à sessão, a presidência passou a palavra a discente, para que a mesma expusesse seu trabalho aos presentes. Em seguida, a presidência passou a palavra a cada um dos Examinadores, para suas respectivas arguições. A aluna respondeu a cada um dos arguidores. A presidência retomou a palavra para suas considerações finais. A Banca Examinadora, então, reuniu-se e, após a discussão de suas avaliações, decidiu-se pela aprovação da aluna. A mestranda foi convidada a ingressar novamente na sala, bem como os demais assistentes, após o que a presidência fez a leitura do Parecer da Banca Examinadora. A aprovação no rito de defesa deverá ser homologada pelo Colegiado do programa, mediante o atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca dentro dos prazos regimentais do programa. A outorga do título de mestre está condicionada ao atendimento de todos os requisitos e prazos determinados no regimento do Programa de Pós-Graduação. Nada mais havendo a tratar a presidência deu por encerrada a sessão, da qual eu, WASHINGTON LUIZ ESTEVES MAGALHÃES, lavrei a presente ata, que vai assinada por mim e pelos membros da Comissão Examinadora.

CURITIBA, 17 de Julho de 2017.


WASHINGTON LUIZ ESTEVES MAGALHÃES

Presidente da Banca Examinadora (UFPR)


EVALDO RIBEIRO

Avaliador Interno (UFPR)


GISELLE MARIA MACIEL

Avaliador Externo (UTFPR)

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Ademir e Rita, pelo apoio em toda minha trajetória.

Ao meu marido Bruno pela paciência e apoio nos momentos mais difíceis.

Aos meus amigos por estarem ao meu lado em todos os momentos.

Ao grupo de pesquisa do Laboratório de Tecnologia da Madeira onde fiz amigos que levarei por toda a vida, Tainise, Tielidy, Mailson, Diana e Bruno.

Ao meu orientador Dr. Washington Luiz Esteves Magalhães, pela oportunidade, aprendizado, orientação e incentivo que tornaram possível a conclusão deste trabalho.

A Empresa Brasileira de Pesquisa e Agropecuária - Embrapa Florestas, pela disponibilização do espaço de pesquisa, e as colaboradoras Dayanne, Patrícia, Edson, Cristiane e Simone.

A todos os professores e pesquisadores que de alguma maneira colaboraram para meu aprendizado.

Aos laboratórios de Polpa e Papel, Anatomia e Qualidade da Madeira, Óptica e instrumentação de Raios x e Centro de Microscopia Eletrônica, da Universidade Federal do Paraná, pela disponibilidade e auxílio no desenvolvimento da pesquisa.

A Pontifícia Universidade Católica do Paraná, em especial ao professor José Ademar Villanova Junior e sua equipe de pesquisa.

A Universidade Tecnológica Federal do Paraná, em especial a professora Giselle Maciel por disponibilizar o laboratório de microbiologia e pelo auxílio no desenvolvimento da pesquisa.

Ao Instituto de Tecnologia do Paraná.

Ao apoio financeiro da CAPES e CNPq.

“Não é sobre chegar no topo do mundo

E saber que venceu

É sobre escalar e sentir

Que o caminho te fortaleceu”

Ana Vilela.

RESUMO

A pele sendo o maior órgão do corpo humano exerce a função de barreira natural do corpo, quando sofre lesões como as queimaduras é importante a aplicação de curativos para rápida reepitelização. Membranas de celulose bacteriana (BC) são tradicionalmente utilizadas como pele artificial na cicatrização de feridas desde a década de 80. No entanto, a fabricação destas membranas é um processo de baixo rendimento e alto custo. A celulose é o biopolímero de maior abundância, muito utilizada devido as suas propriedades químicas e físicas, onde a nanotecnologia permite potencializar essas propriedades. O objetivo deste trabalho foi desenvolver e caracterizar membranas de nanofibrilas de celulose vegetal com adição de agente cicatrizante e bacteriostático para a cicatrização de feridas de parede corpórea. Para assemelhar-se à BC a polpa celulósica bruta (PB) foi tratada para extração da hemicelulose (PT), para posterior obtenção dos filmes. As nanofibrilas foram obtidas pelo método mecânico de desfibrilação da celulose, e posteriormente os filmes por filtração e secagem sob pressão. Filmes de nanocelulose vegetal, obtidos da PB, foram impregnados com óleo essencial de calêndula e nanopartículas de prata. As técnicas empregadas para a caracterização foram difração de raios x, espectroscopia de infravermelho, análise termogravimétrica, microscopia eletrônica de varredura, ensaios físicos, mecânicos e aplicação *in vivo*. Os filmes da PB apresentaram resistência à tração entre 47 e 62 MPa, enquanto os filmes da PT apresentaram resultados entre 10 e 11 MPa. Os filmes da PB apresentaram resultados de cicatrização *in vivo* estatisticamente semelhantes ao curativo comercial. Os filmes impregnados com óleo essencial de calêndula e nanopartículas de prata apresentaram características químicas e físicas adequadas para potencial uso em feridas corpóreas, porém nas concentrações testadas não apresentaram ação antimicrobiana contra *S.aureus* e *E.coli* nos testes *in vitro*.

Palavras-chave: filme de nanocelulose, curativo, queimadura, óleo de calêndula, nanopartículas de prata.

ABSTRACT

The skin being the largest organ in the human body carries the natural barrier function of the body, when suffering injuries such as burns is important the application of dressings for quick re-epithelialization. Bacterial cellulose membranes (BC) are traditionally used as artificial skin in the healing of wounds since the 80's. However, the manufacture of these membranes is a process of low yield and high cost. Cellulose is the biopolymer of greatest abundance, widely used due to its chemical and physical properties, where nanotechnology allows improvement of these properties. The objective of this study was to develop and characterize nanofibrils membranes of plant cellulose with addition of healing and bacteriostatic agent for healing of body wall. To resemble BC the cellulosic pulp (PB) was treated for extraction of hemicellulose (PT), to later obtain the films. The nanofibrils were obtained by mechanical method of defibrillation of cellulose, and later the films by filtering and drying under pressure. Films of plant nanocellulose, obtained from PB, were impregnated with essential oil of Calendula and silver nanoparticles. The techniques employed for characterization were x-ray diffraction, infrared spectroscopy, thermogravimetric analysis, scanning electron microscopy, physical testing, mechanical test and application *in vivo*. The films of PB presented tensile strength between 47 and 62 MPa, while the films of PT presented results between 10 and 11 MPa. The films of PB *in vivo* healing results are statistically similar to commercial dressing. The films impregnated with essential oil of Calendula and silver nanoparticles showed adequate chemical and physical features with potential for use in wounds, but at concentrations tested showed no bactericidal action against *S.aureus* and *E.coli in vitro*.

Keywords: nanocellulose films, wound dressing, burn, Calendula oil, silver nanoparticles.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1- ESTRUTURA QUÍMICA DA CELULOSE	20
FIGURA 2- ESQUEMA DA ESTRUTURA DAS FIBRAS DA MADEIRA	21
FIGURA 3- COMPOSTOS DA PAREDE CELULAR VEGETAL.....	22
FIGURA 4- REPRESENTAÇÃO ESTRUTURAL DOS PRINCIPAIS MONOSSACARÍDEOS CONSTITUINTES DAS HEMICELULOSES.....	23
FIGURA 5- CÉLULA UNITÁRIA DA CELULOSE I β	25
FIGURA 6- ESQUEMA DA CONVERSÃO DA CELULOSE EM POLIMORFOS	25
FIGURA 7 - ESCALA DAS ESTRUTURAS DA CELULOSE	28
FIGURA 8- CÉLULA UNITÁRIA DA CELULOSE I α	30
FIGURA 9- FLOR DA CALENDULA OFFICINALIS.....	32
FIGURA 10- ESTRUTURAS DOS MONOÉSTERES DO FARADIOL ONDE R = LAURIL, MIRISTIL OU PALMITIL.	33
FIGURA 11- OXIDAÇÃO DA CELULOSE PELO REAGENTE DE TOLLENS .	36
FIGURA 12- EFEITO DO ÍON PRATA EM CÉLULAS DE MICROORGANISMOS.....	38
FIGURA 13 A) MOINHO MASSCOLOIDER MASUKO SANGYO B) MOINHO EM FUNCIONAMENTO C) DISCO DE PEDRA ROTATIVO.....	41
FIGURA 14 -- FLUXOGRAMA DO PROCESSO DE DESFIBRILAÇÃO MECÂNICA	41
FIGURA 15 - A) FILTRAÇÃO DA SUSPENSÃO DE NANOCELULOSE B) SISTEMA DE FILTRAÇÃO.....	44
FIGURA 16 – FLUXOGRAMA DO PROCESSO DE OBTENÇÃO DOS FILMES DE NANOCELULOSE	44
FIGURA 17 - EQUIPAMENTO ELETRÔNICO MICRÔMETRO PARA DETERMINAÇÃO DA MEDIDA DE ESPESSURA.....	49
FIGURA 18 – EQUIPAMENTO GURLEY PARA ENSAIOS DE PERMEÂNCIA AO AR	50
FIGURA 19 – MÁQUINA UNIVERSAL E DINAMÔMETRO PARA ENSAIOS DE TRAÇÃO	52
FIGURA 20 - MICROPLACA PARA ANÁLISE MICROBIOLÓGICA.....	57

FIGURA 21 - MICROGRAFIAS DAS SUSPENSÕES DE PB. A) MAGNIFICAÇÃO 800X B) MAGNIFICAÇÃO 25 kX E DA PT C) MAGNIFICAÇÃO 800X D) MAGNIFICAÇÃO 3 kX.....	61
FIGURA 22 – A) FILMES DE NANOCELULOSE DA PB B) FILME DE NANOCELULOSE E PAPEL BRANCO.....	63
FIGURA 23 – A) FILME DE NANOCELULOSE DA PT B) FILME DA PT PAPEL BRANCO E FILME DA PB	64
FIGURA 24 – MICROGRAFIAS DO FILME DE NANOCELULOSE DA PB. A) MAGNIFICAÇÃO 500X B) MAGNIFICAÇÃO 10 kX	65
FIGURA 25 - MICROGRAFIAS DO FILME DE NANOCELULOSE DA PT. A) MAGNIFICAÇÃO 500X B) MAGNIFICAÇÃO 10 kX.....	66
FIGURA 26 - DIFRATOGRAMA DE RAIOS X DA CELULOSE DOS FILMES DE NANOCELULOSE DA PB (A) E DA PT (B).....	67
FIGURA 27 – ESPECTRO DE FTIR DOS FILMES DA PB E DA PT. B) APROXIMAÇÃO DA BANDA EM 1245 CM ⁻¹	68
FIGURA 28 - TGA E DTG DO FILME DA PB.....	70
FIGURA 29 - TGA E DTG DO FILME DA PT	70
FIGURA 30 - FILMES IMPREGNADOS COM ÓLEO ESSENCIAL DE CALÊNDULA. A) 5% ÓLEO ESSENCIAL DE CALÊNDULA, B) 10% ÓLEO ESSENCIAL DE CALÊNDULA.....	77
FIGURA 31 - MICROGRAFIA DO FILME DE NANOCELULOSE IMPREGNADO COM 5% DE ÓLEO DE CALÊNDULA A) MAGNIFICAÇÃO 3 kX B) MAGNIFICAÇÃO 15 kX	79
FIGURA 32 - MICROGRAFIA FILME DE NANOCELULOSE IMPREGANADO COM 10 % DE ÓLEO DE CALÊNDULA A) MAGNIFICAÇÃO 5 kX B) MAGNIFICAÇÃO 10 kX	80
FIGURA 33 - DIFRATOGRAMA DE RAIOS X DOS FILMES COM 5% DE ÓLEO ESSENCIAL DE CALÊNDULA. B) 10 % DE ÓLEO ESSENCIAL DE CALÊNDULA.....	81
FIGURA 34 - TGA e DTG ÓLEO ESSENCIAL DE CALÊNDULA	82
FIGURA 35 - TGA E DTG FILME IMPREGNADO COM 5% DE ÓLEO	83
FIGURA 36 - TGA E DTG FILME IMPREGNADO COM 10 % DE ÓLEO	83

FIGURA 37 - ESPECTRO DE FTIR A) ÓLEO ESSENCIAL DE CALÊNDULA, B) FILME COM 10 % DE ÓLEO, C) FILME COM 5 % DE ÓLEO, D) FILME DE NANOCELULOSE PURO.....	84
FIGURA 38 - LIBERAÇÃO DE PRATA DE 0,05 m ² DA MEMBRANA 32 mg/kg NA ÁGUA EM FUNÇÃO DO TEMPO.....	88
FIGURA 39 - LIBERAÇÃO DE PRATA DE 0,05 m ² DA MEMBRANA 89 mg/Kg NA ÁGUA EM FUNÇÃO DO TEMPO.....	89
FIGURA 40 - MICROGRAFIA DOS FILMES DE NANOCELULOSE IMPREGNADOS COM 32 mg/kg DE PRATA A) MAGNIFICAÇÃO 5 kX B) MAGNIFICAÇÃO 10 kX	90
FIGURA 41 - MICROGRAFIA DOS FILMES DE NANOCELULOSE IMPREGNADOS COM 89 mg/kg DE PRATA A) MAGNIFICAÇÃO 13,4 kX B) MAGNIFICAÇÃO 12,2 kX	91
FIGURA 42 - ESPECTRO DE EDS DO FILME DE NANOCELULOSE IMPREGNADO COM 32 mg/kg DE PRATA.....	92
FIGURA 43 - ESPECTRO DE EDS DO FILME DE NANOCELULOSE IMPREGNADO COM 89 mg/kg DE PRATA.....	92
FIGURA 44 - DIFRATOGRAMA DE RAIOS X DOS FILMES IMPREGNADOS COM NANOPARTÍCULAS DE PRATA A) 32 mg/kg B) 89 mg/kg.....	93
FIGURA 45 - ESPECTRO DE INFRAVERMELHO DOS FILMES IMPREGNADOS COM NANOPARTÍCULAS DE PRATA A) 89 mg/kg B) 32 mg/kg C) FILME DE NANOCELULOSE PURO.....	95
FIGURA 46 - TGA E DTG FILME DE NANOCELULOSE IMPREGNADO COM NANOPARTÍCULAS DE PRATA 32 mg/kg.....	96
FIGURA 47 - TGA E DTG FILME DE NANOCELULOSE IMPREGNADO COM NANOPARTÍCULAS DE PRATA 89 mg/kg.....	97
FIGURA 48 - TGA E DTA FILME DE NANOCELULOSE PURO.....	97
FIGURA 49 - ÁREA DE CICATRIZAÇÃO DAS LESÕES AOS 7 DIAS A) SEM CURATIVO B) MEMBRACEL C) CELULOSE VEGETAL	100
FIGURA 50 - PLACA DE DISCO-DIFUSÃO PARA E.coli	101
FIGURA 51 - PLACA DE DISCO-DIFUSÃO DE ANTIBIÓTICOS PARA E.coli	102
FIGURA 52 - PLACA DE DISCO-DIFUSÃO PARA ANTIBIÓTICOS EM S.aureus.....	103

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - ESTRUTURA DAS CADEIAS CELULÓSICAS I E II	27
TABELA 2 - CONDIÇÕES INSTRUMENTAIS DO ICP-OES PARA DETERMINAÇÃO DE PRATA.....	53
TABELA 3 - TEOR MÉDIO DE AÇÚCARES DA POLPA CELULÓSICA BRANQUEADA	59
TABELA 4 - TEOR DE AÇÚCARES DAS SUSPENSÕES DE NANOFIBRILAS	62
TABELA 5 - ÍNDICE DE CRISTALINIDADE DA CELULOSE DOS FILMES DA PB E DA PT.....	67
TABELA 6 - ESPESSURA, GRAMATURA E UMIDADE DOS FILMES DA PB E DA PT.....	71
TABELA 7 - DENSIDADE APARENTE, COBB E GURLEY DOS FILMES DA PB E DA PT	73
TABELA 8 - RESISTÊNCIA À TRAÇÃO E RESISTÊNCIA AO ARREBENTAMENTO DOS FILMES DA PB E DA PT	74
TABELA 9 - CONTEÚDO DE PRATA EM CURATIVOS DISPONÍVEIS COMERCIALMENTE	87
TABELA 10 - VALORES DE MÉDIA E DESVIO PADRÃO DAS MEDIDAS DE CICATRIZAÇÃO CRÂNIO-CAUDAL	98
TABELA 11 - VALORES DE MÉDIA E DESVIO PADRÃO DAS MEDIDAS DE CICATRIZAÇÃO LÁTERO-LATERAL	99
TABELA 12 - VALORES DE MÉDIA E DESVIO PADRÃO DAS MEDIDAS DE CICATRIZAÇÃO DA DIMENSÃO MÉDIA DA FERIDA	99

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Ag – Prata

Ag₂O - Óxido de prata

AgNO₃ – Nitrato de prata

Ag- SD – Sulfadiazina de prata

AMX – Amoxicilina + clavulanato

BC – Celulose bacteriana

CFL – Cefalotina

CFX - Cefalexina

CO₂ – Dióxido de carbono

CNC - Nano cristal de celulose

DMSO - Dimetilsulfóxido

DRX – Difração de raios x

DTG – Análise termogravimétrica derivada

EDS – Espectroscopia de energia dispersiva

FPB – Filme de nanocelulose da polpa bruta

FPT – Filme de nanocelulose da polpa tratada

FTIR – Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier

H₂SO₄ – Ácido sulfúrico

ICP-OES – Espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado

M - Molar

MET – Microscopia Eletrônica de Transmissão

MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura

MIC – Concentração mínima inibitória

NaBH₄ – Borohidreto de sódio

NFC – Nanofibrila de celulose

NaOH – Hidróxido de sódio

NPs- Ag – Nanopartícula de prata

PB – Polpa bruta

PT – Polpa tratada

SH – Tiol

TGA – Análise térmica por termogravimetria

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	18
2.REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
2.1.CELULOSE VEGETAL.....	20
2.2.HEMICELULOSE	21
2.3 CRISTALINIDADE DA CELULOSE.....	24
2.4.NANOCELULOSE	27
2.5.CELULOSE BACTERIANA	29
2.6.CALENDULA OFFICINALIS.....	31
2.7.NANOPARTÍCULAS DE PRATA.....	35
3.MATERIAL E MÉTODOS	39
3.1.MATERIAL	39
3.2.CARACTERIZAÇÃO DA POLPA CELULÓSICA BRANQUEADA.....	39
3.2.1.Teor de lignina.....	39
3.2.2.Teor de cinzas	40
3.2.3.Teor de açúcares	40
3.3.SUSPENSÃO DE NANOFIBRILAS DE CELULOSE	40
3.4.CARACTERIZAÇÃO DA SUSPENSÃO DE NANOFIBRILAS DE CELULOSE	42
3.4.1.Teor de açúcares	42
3.4.2.Microscopia eletrônica de transmissão (MET).....	42
3.5.OBTENÇÃO DE FILMES DE NANOFIBRILAS	43
3.6.EXTRAÇÃO DA HEMICELULOSE.....	44
3.7.IMPREGNAÇÃO DE ÓLEO ESSENCIAL DE CALÊNDULA	45
3.8.IMPREGNAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA.....	45
3.9.CARACTERIZAÇÃO GERAL DOS FILMES OBTIDOS.....	46
3.9.1.Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	46

3.9.2. Difração de raios X	46
3.9.3. Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)	47
3.9.4. Análise térmica por termogravimetria (TGA) e análise termogravimétrica derivada (DTG).....	47
3.10. CARACTERIZAÇÃO FÍSICA DOS FILMES	48
3.10.1. Espessura	48
3.10.2. Gramatura	49
3.10.3. Densidade aparente	49
3.10.4. Absorção de água	50
3.10.5. Permeância a passagem do ar.....	50
3.10.6. Teor de umidade	51
3.11. CARACTERIZAÇÃO MECÂNICA DOS FILMES	51
3.11.1. Ensaio de tração	51
3.11.2. Ensaio de arrebentamento	52
3.12. QUANTIFICAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE CALÊNDULA DEPOSITADO AO FILME	52
3.13. QUANTIFICAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA DEPOSITADAS NO FILME	53
3.14. LIBERAÇÃO DE PRATA DOS FILMES DE NANOCELULOSE	54
3.15. APLICAÇÃO DO FILME DE NANOCELULOSE COMO CURATIVO EM DORSO DE RATOS.....	54
3.16. TESTE ANTIBACTERIANO DOS FILMES DE NANOFIBRILAS DE CELULOSE	55
3.16.1. Método de disco-difusão	56
3.16.2. Microdiluição em caldo	56
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
4.1. CARACTERIZAÇÃO DA POLPA CELULÓSICA BRANQUEADA.....	59

4.2.CARACTERIZAÇÃO DA SUSPENSÃO DE NANOFIBRILAS	60
4.2.1.Microscopia eletrônica de transmissão (MET).....	60
4.2.2.Teor de açúcares	61
4.3.FILMES DE NANOFIBRILAS DE CELULOSE	63
4.3.1.Filmes de nanofibrilas de celulose da polpa bruta.....	63
4.3.2.Filmes de nanofibrilas de celulose da polpa tratada.....	64
4.4.CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES DE NANOFIBRILAS A PARTIR DA POLPA BRUTA E DA POLPA TRATADA	65
4.4.1.Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	65
4.4.2.Difração de raios x	66
4.4.3.Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....	68
4.4.4.Análise térmica por termogravimetria (TGA) e análise termogravimétrica derivada (DTG).....	69
4.4.5.ENSAIOS FÍSICOS	71
4.4.5.1.Espessura, gramatura e umidade	71
4.4.5.2.Densidade aparente, Cobb e Gurley	72
4.4.6.Resistência à tração e resistência ao arrebentamento.....	74
4.5.OBTENÇÃO DOS FILMES DE NANOCELULOSE COM ÓLEO ESSENCIAL DE CALÊNDULA.....	77
4.6.CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES DE NANOCELULOSE COM ÓLEO ESSENCIAL DE CALÊNDULA.....	77
4.6.1. Quantificação do óleo essencial de calêndula depositado ao filme.....	77
4.6.2.Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	78
4.6.3.Difração de raios X.....	80
4.6.4.Análise térmica por termogravimetria (TGA) e análise termogravimétrica derivada (DTG).....	81
4.6.5.Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier	84

4.7.CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES DE NANOCELULOSE IMPREGNADOS COM NANOPARTÍCULAS DE PRATA	86
4.7.1.Quantificação de nanopartículas de prata sintetizadas no filme de nanocelulose	86
4.7.2.Liberação de nanopartículas de prata em água	87
4.7.3.Microscopia eletrônica de Varredura (MEV)	90
4.7.4.Difração de raios X	92
4.7.5.Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier	94
4.7.6.Análise térmica por termogravimetria (TGA) e análise termogravimétrica derivada	96
4.8.APLICAÇÃO COMO CURATIVO DO FILME DE NANOCELULOSE EM DORSO DE RATOS	98
4.9.TESTE ANTIBACTERIANO DOS FILMES DE NANOFIBRILAS DE CELULOSE	101
4.9.1.Método de disco-difusão	101
4.9.2.Microdiluição em caldo	103
5.CONSIDERAÇÕES FINAIS	107
REFERÊNCIAS	108

1.INTRODUÇÃO

As queimaduras são lesões caracterizadas por perda de pele que apresentam uma resposta inflamatória intensa que se perpetua por todo o tecido lesionado, tornando-se um desafio clínico e cirúrgico. Ocorrem quando algumas ou todas as células da pele são destruídas por substâncias ou temperaturas extremas, radiação, radioatividade, eletricidade ou fricção. Acidentes com queimaduras ocorrem com grande frequência devido à pele exercer a função de barreira natural do corpo com o meio externo sendo a região mais agredida do organismo (MOSER; PEREIMA; PEREIMA, 2013).

Ao longo dos anos uma grande variedade de substâncias tem sido utilizada como agentes protetores nas lesões por queimaduras. O princípio básico de um curativo para queimaduras é não agredir a pele, proporcionando um ambiente adequado para a reepitelização, ou seja, um ambiente estéril, úmido e protegido do meio externo (MOSER; PEREIMA; PEREIMA, 2013; PITANGUY; SALGADO; MARACAJÁ, 1988).

Membranas de celulose bacteriana são utilizadas como pele artificial na cicatrização de feridas desde a década de 80 (BAUA, 2007; PITANGUY; SALGADO; MARACAJÁ, 1988). No entanto, a fabricação destas membranas é um processo de baixo rendimento e alto custo, por ser tratar de uma síntese bacteriana. Uma alternativa neste contexto é a produção de uma membrana de nanocelulose vegetal.

A celulose é o polímero natural de maior abundância terrestre possuindo várias aplicações industriais, a mais comum delas é a produção de papel e embalagens. A maior fonte industrial de celulose são os plantios florestais, porém o processamento de alguns materiais gera uma grande quantidade de resíduos, ricos em celulose representando um problema na agroindústria (BERGAMASCHINE; BRAGA; SOUSA, 2005; HOENICH, 2006).

A nanotecnologia permite potencializar propriedades físicas e químicas que agregam maior valor ao material, neste caso podendo reaproveitar um

subproduto como a celulose vegetal das agroindústrias desenvolvendo a nanocelulose, além de minimizar problemas ambientais (KAMEL, 2007).

A celulose nos vegetais sempre está associada à presença de hemicelulose, que juntamente com a celulose e lignina formam os componentes poliméricos mais importantes da parede celular. A maioria dos processos de polpação industrial usa o método kraft, e mesmo após o branqueamento, a polpa produzida contém cerca de 15% em massa de hemicelulose. Um pré-tratamento extraído a hemicelulose da polpa celulósica possibilitaria diminuir o consumo energético no processo de desfibrilação mecânica, na obtenção da suspensão de nanocelulose fibrilada e produziria filmes semelhantes às membranas de celulose bacteriana podendo diminuir o risco de reações alérgicas à membrana durante o uso em feridas abertas (CARVALHO et al., 2009; HAYASHI; MARSDEN; DELMER, 1987).

A adição de um agente cicatrizante e bacteriostático nas membranas potencializa a eficácia da aplicação como curativo em queimaduras, dentre os possíveis agentes estão os naturais como óleo essencial de calêndula ou os desenvolvidos pela nanociência como as nanopartículas de prata. O controle de micro-organismos na ferida favorece a cicatrização, uma vez que a presença e a proliferação de bactérias e fungos em feridas podem rapidamente contaminar e retardar o processo de cicatrização (CITADINI-ZANETTE; NEGRELLE; BORBA, 2012; SERAFIM, 2010).

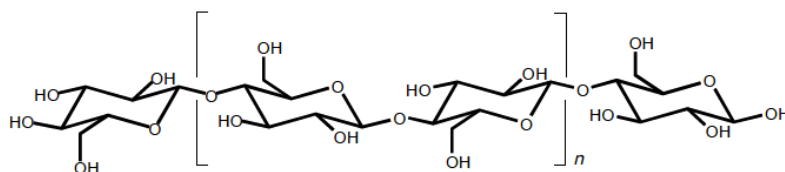
Neste contexto, este estudo visa desenvolver uma membrana de nanofibrilas de celulose vegetal com adição de um agente cicatrizante e bacteriostático para a cicatrização de feridas de parede corpórea. Não foram encontrados trabalhos anteriores que avaliassem a aplicação de filmes de nanocelulose vegetal no tratamento de ferimentos.

2.REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1.CELULOSE VEGETAL

A celulose é o polímero natural mais abundante na Terra, com uma elevada taxa de regeneração via fotossíntese, sendo o principal componente estrutural das plantas. Polissacarídeo de fórmula molecular $(C_6H_{10}O_5)_n$ é composto pela união de moléculas de B-D-glucopiranosose através das ligações β -1,4-glicosídicas (FIGURA 1), com característica fibrosa (HOENICH, 2006; VIERA, 2013). A unidade de repetição é um dímero de glicose conhecido como celobiose com grau de polimerização de cerca de 10000 na madeira (GRAÇA, 2009; ZHU et al., 2014).

FIGURA 1- ESTRUTURA QUÍMICA DA CELULOSE



FONTE: GRAÇA, 2009

A molécula de celulose foi isolada a partir da madeira pela primeira vez em 1885 por Charles F. Cross e Edward Bevan em Londres (HOENICH, 2006).

Moléculas de celulose formam ligações de hidrogênio inter e intramoleculares. Agregam-se na forma de microfibrilas na qual regiões ordenadas (cristalinas) se alternam com regiões não ordenadas (amorfias) (GRAÇA, 2009; IWAMOTO; NAKAGAITO; YANO, 2007).

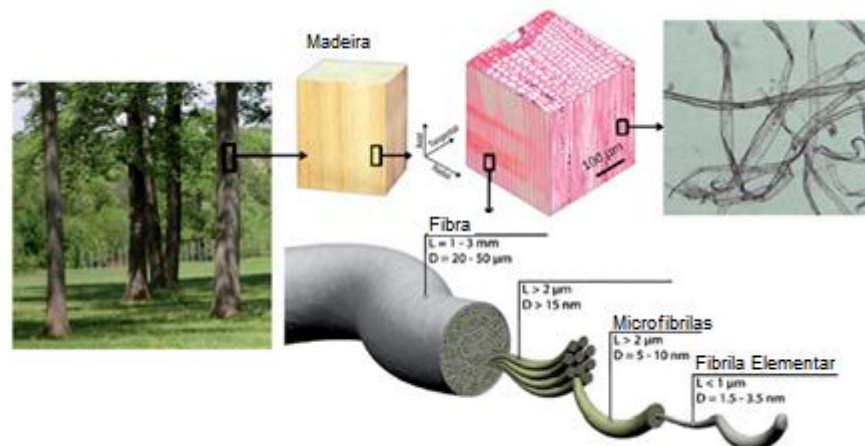
A celulose pode ser encontrada em uma ampla variedade de plantas, algas e bactérias. No caso da madeira compõe de 40 - 45% das fibras, associada à hemicelulose e lignina na parede celular. Uma vasta gama de estruturas de

celulose (fibras, nanofibrilas, cristais entre outras) estão sendo estudadas para inumeráveis aplicações comerciais (HOENICH, 2006; IOELOVICH, 2008; VIERA, 2013).

A parede celular da madeira apresenta uma espessura de aproximadamente $4\ \mu\text{m}$, sendo composta por milhares de microfibrilas com diâmetros de $15\ \text{nm}$ e comprimento maior de $2\ \mu\text{m}$ (FIGURA 2). A estrutura da madeira permite a liberação das microfibrilas através do processo de desintegração química, enzimático ou mecânico. As microfibrilas ou também chamadas nanofibrilas possuem propriedades únicas como excelente resistência mecânica, área de superfície e capacidade de inibir o espalhamento da luz (ZHU et al., 2014).

As fibrilas elementares contém cerca de 36 moléculas de celulose e as microfibrilas possuem cerca de 10 - 20 fibrilas elementares (MOON et al., 2011).

FIGURA 2- ESQUEMA DA ESTRUTURA DAS FIBRAS DA MADEIRA

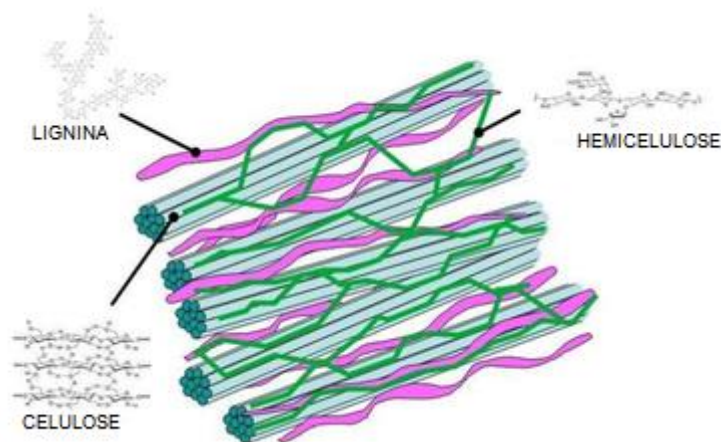


FONTE:ADAPTADO DE ZHU et al., 2014

2.2. HEMICELULOSE

As proporções entre os componentes lignina, celulose e hemicelulose da parede celular (FIGURA 3) dependem da espécie vegetal e variam de camada para camada (CARVALHO et al., 2009).

FIGURA 3- COMPOSTOS DA PAREDE CELULAR VEGETAL



FONTE: AUTOR DESCONHECIDO

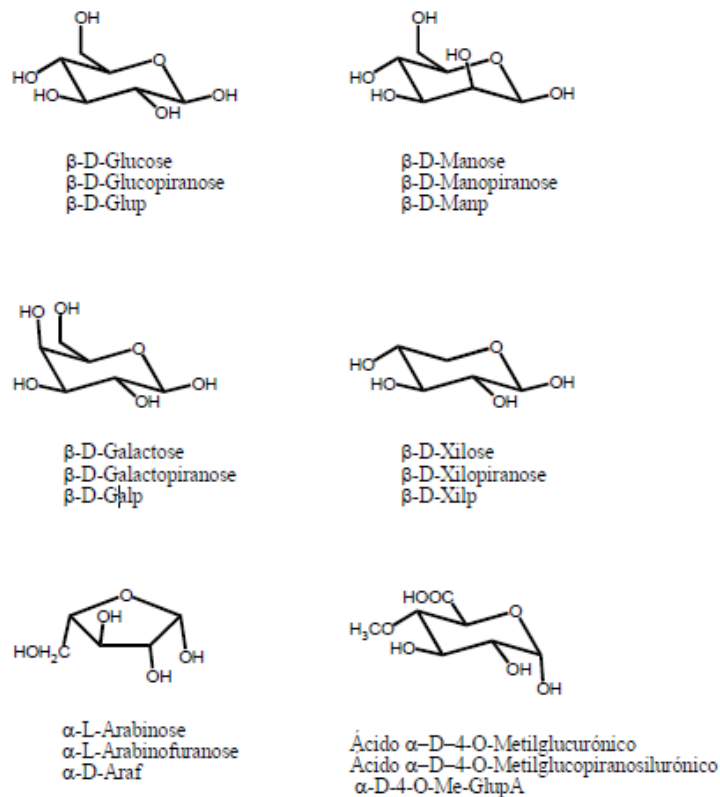
O termo hemicelulose ou poliose é utilizado para denominar grupos distintos de polissacarídeos de cadeia ramificada e baixa massa molecular, constituídos por açúcares pentoses (xilose e arabinose) e/ou hexoses (glucose, manose e galactose), ácidos urônicos e grupos acetila (CARVALHO et al., 2009). As hemiceluloses são depositadas entre as microfibrilas ligando-se a celulose através de ligações de hidrogênio, atuando como agente de ligação entre celulose e lignina, formando uma estrutura sólida que compõe a parede celular vegetal primária (HAYASHI; MARSDEN; DELMER, 1987).

Apresentam configuração irregular e ausência de cristalinidade, contribuindo para o aumento da flexibilidade das fibras ao absorver água facilmente (CORREA, 2010).

Em geral, enquanto as madeiras de folhosas são compostas principalmente por heteroxilanas altamente acetiladas, as madeiras de coníferas apresentam uma elevada proporção de glucomanas e galactoglucomanas parcialmente acetiladas (CARVALHO et al., 2009).

A composição das polioses apresenta proporções variadas de unidades de açúcar como β -D-xilose, β -D-manose, β -D-glucose, α -L-arabinose, α -D-galactose, ácido β -D-glucourônico, ácido β -D-galacturônico, ácido α -D-4-O-metilglucurônico (FIGURA 4) (RAZERA, 2006).

FIGURA 4- REPRESENTAÇÃO ESTRUTURAL DOS PRINCIPAIS MONOSSACARÍDEOS CONSTITUINTES DAS HEMICELULOSES



FONTE UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

Existem várias tecnologias de pré - tratamento sugeridos para a remoção de hemiceluloses a partir de biomassa, como explosão de vapor, solventes orgânicos, diluição em ácido, auto hidrólise, enzimática e tratamento alcalino. Porém a extração de hemicelulose pode afetar a celulose, as condições severas em água quente e a extração com ácido podem ter um impacto negativo sobre as fibras. Entretanto o filme resultante apresenta estrutura de alta resistência, baixa absorção de umidade, baixa expansão térmica e alta estabilidade térmica (HASANJANZADEH et al., 2014).

Extrações alcalinas são realizadas em pressões e temperaturas baixas. As soluções alcalinas hidrolisam as ligações éster liberando a hemicelulose em meio aquoso (SUN et al., 2014). Extrações com água quente geralmente ocorrem por catálise dos grupos acetilas (LIU; WYMAN, 2003).

Nos últimos anos está em constante crescimento o interesse pela caracterização das hemiceluloses extraídas de diferentes meios a fim de encontrar novas aplicações (BURANOV; MAZZA, 2010).

As hemiceluloses servem como inibidores da coalescência das microfibrilas durante a secagem, ou seja, estão firmemente ligadas as microfibrilas de celulose através de múltiplas ligações de hidrogênio preenchendo o espaço entre as microfibrilas e atuando como uma barreira física inibindo a agregação das mesmas e facilitando a nanofibrilação. Além disso proporcionam aderência às nanofibras contribuindo para a redução da expansão térmica e aumento das propriedades mecânicas dos compósitos (CHAKER et al., 2013; IWAMOTO; ABE; YANO, 2008).

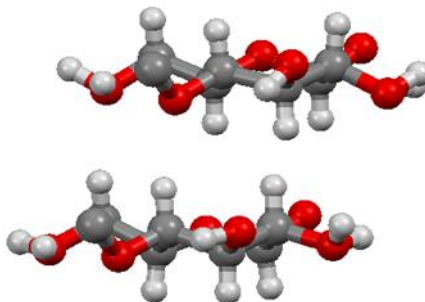
2.3 CRISTALINIDADE DA CELULOSE

Na celulose nativa (tipo I) as moléculas são sintetizadas de forma contínua por complexos terminais (TC) em fileiras biológicas na membrana celular. Cada TC sintetiza uma fibrila elementar cristalina em direção a fibra da planta. Tais fibras produzem padrões de difração de raios-X com alta orientação. Podem ser encontradas duas fases cristalinas, I α e I β , não apenas dentro da mesma amostra de celulose, mas ao longo da microfibrila. Entretanto, a fase cristalina I α é encontrada em maior quantidade em algas e celulose bacteriana enquanto a fase I β é encontrada preferencialmente em algodão e madeira (NISHIYAMA.Y et al., 2003; NISHIYAMA; LANGAN; CHANZY, 2002).

A fase cristalina I β apresenta célula unitária, menor agrupamento de átomos representativo de uma estrutura cristalina, monoclinica com duas cadeias paralelas (FIGURA 5). Como consequência das diferentes células unitárias a fase cristalina I β apresenta ligações de hidrogênio distribuídas por uma melhor geometria tornando-se mais favorável às ligações de hidrogênio intramoleculares (NISHIYAMA.Y et al., 2003; NISHIYAMA; LANGAN; CHANZY, 2002).

O polimorfo Ia é metaestável e pode ser convertido a I β por tratamento térmico em soluções alcalinas (MOON et al., 2011).

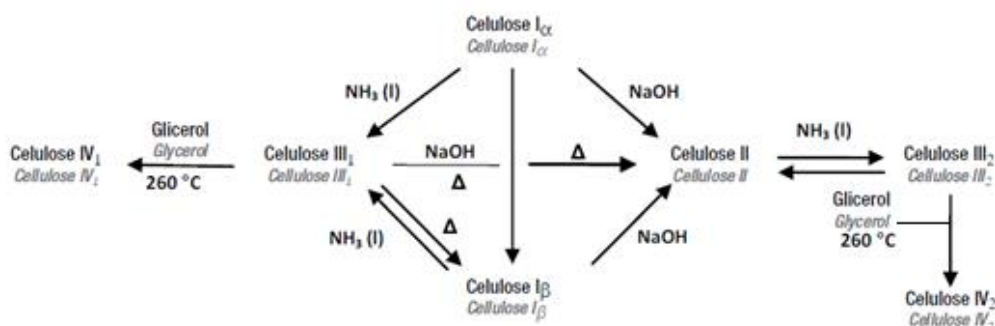
FIGURA 5- CÉLULA UNITÁRIA DA CELULOSE I β



FONTE: SOFTWARE MERCURY 3.7

A celulose nativa quando submetida a tratamentos térmicos ou químicos pode resultar em diferentes polimorfos de celulose (I, II, III, IV) (FIGURA 6), ou seja, ocorrem alterações nas dimensões da cela unitária e consequentemente na estrutura cristalina (DE JESUS SILVA; D'ALMEIDA, 2009). Alguns polimorfos são mais estudados e portanto considerados mais importantes, como o caso da celulose I e a celulose II (DE JESUS SILVA; D'ALMEIDA, 2009; WANG et al., 2014).

FIGURA 6- ESQUEMA DA CONVERSÃO DA CELULOSE EM POLIMORFOS



FONTE: ADAPTADO DE KLEMM; SCHMAUDER; HEINZE, 2002

A transição ocorre por meio da dissolução da celulose nativa e sua posterior regeneração, conhecida como celulose regenerada. Ao sofrer o tratamento alcalino, a base penetra na estrutura cristalina da celulose interrompendo as ligações intermoleculares, ocorrendo um rearranjo na estrutura interna da fibra para a celulose tipo II. As ligações intramoleculares de hidrogênio da celulose II são as mesmas da celulose, entretanto a diferença de ligações intermoleculares que podem ser formadas acrescenta maior estabilidade à celulose II, o que explica a conversão da celulose I para II, mas não a reação inversa, ou seja, a celulose II tem maior estabilidade termodinâmica (WANG et al., 2014).

A diferença na cristalinidade pode ser observada pela técnica de difração de raios-X, onde a celulose I apresenta picos em aproximadamente $15^\circ < 2\theta < 18^\circ$ e $22^\circ < 2\theta < 23^\circ$, enquanto a celulose II apresenta picos em aproximadamente $13^\circ < 2\theta < 15^\circ$ e $18^\circ < 2\theta < 22^\circ$ (LENGOWSKI et al., 2013; WANG et al., 2014).

SEGAL et al., 1959 desenvolveram um método de cálculo para o percentual da celulose cristalina, determinado pela diferença da intensidade máxima do pico cristalino referente ao plano cristalino (002) localizado em aproximadamente $2\theta = 22,6^\circ$ e a intensidade mínima entre os dois picos cristalinos referente à região amorfa da celulose a partir da técnica de difração de raios-X.

A celulose I possui os grupos redutores e não redutores da cadeia na mesma direção, ou seja, paralelas, enquanto a celulose II possui os grupos redutores e não redutores de forma alternada, antiparalelas (TABELA 1) (KLEMM et al., 2005; NISHIYAMAN; KUGA; OKANO, 2000).

TABELA 1 - ESTRUTURA DAS CADEIAS CELULÓSICAS I E II

Alomorfo	Estrutura	Disposição das cadeias
Celulose I α	Triclínica	Paralela
Celulose I β	Monoclínica	Paralela
Celulose II	Monoclínica	Antiparalela

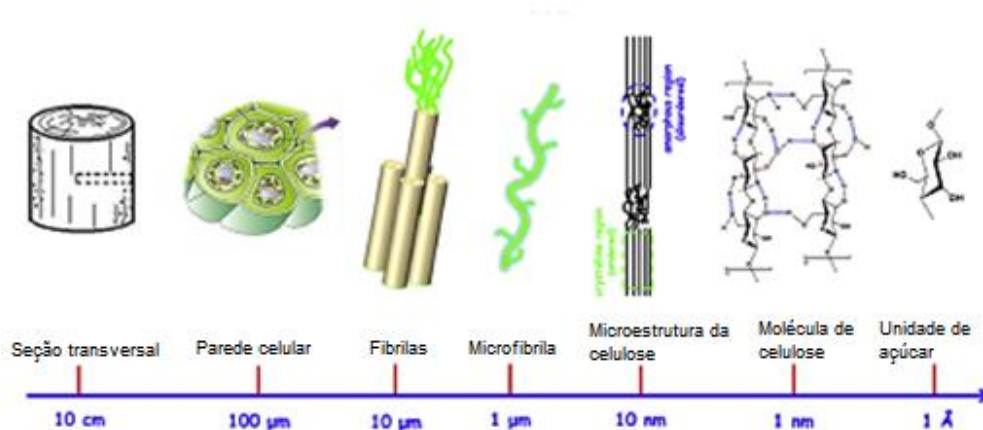
FONTE: ADAPTADO DE DE JESUS SILVA; D'ALMEIDA, 2009

2.4.NANOCELULOSE

Os interesses pela nanotecnologia na busca por novos materiais têm crescido nas últimas décadas. O principal diferencial na escala nanométrica é a potencialização das propriedades físicas e químicas, resultante de uma área superficial elevada, maior grau de dispersão e funcionalidades, possibilitando maior eficiência e desempenho de materiais já conhecidos (KAMEL, 2007).

A nanocelulose possui ao menos uma dimensão na escala nanométrica entre 1 – 100 nm. Dependendo das condições da produção, das dimensões e propriedades pode ser dividida em nanocristais de celulose (CNC), nanofibrilas de celulose (NFC) e celulose bacteriana (BC), ocorrendo naturalmente na estrutura da parede celular vegetal ou na síntese bacteriana (FIGURA 7). Podem ser obtidas por diversos processos mecânicos ou químicos que abram a estrutura da fibra expondo as microfibrilas (NECHYPORCHUK; BELGACEM; BRAS, 2015).

FIGURA 7 - ESCALA DAS ESTRUTURAS DA CELULOSE



FONTE: ADAPTADO DE IGUCHI; YAMANAKA; BUDHIONO, 2000; LIN; DUFRESNE, 2014

A desfibrilação é feita principalmente por tratamentos mecânicos utilizando homogeneização, moagem, refinação e *cryocrushing*. As nanofibrilas podem ser obtidas por desintegração da celulose através de processo mecânico de homogeneização, promovendo a exposição das fibrilas. O maior desafio deste processo é o elevado consumo energético. Portanto algumas metodologias combinam o processo mecânico com pré-tratamentos enzimáticos, químicos, refinação ou *cryocrushing*, reduzindo a dimensão das fibras antes da homogeneização auxiliando a redução do consumo energético do processo mecânico (ABDUL KHALIL et al., 2014).

Os nanomateriais celulósicos possuem grande área superficial e a capacidade de formar ligações de hidrogênio, o que permite criar uma rede forte e densa, tornando-se excelente para aplicações como barreiras (FERRER; PAL; HUBBE, 2017).

A nanocelulose possui ampla variedade de aplicações devido a propriedades únicas como baixa expansão térmica, transparência óptica, biodegradabilidade, baixo custo e baixa toxicidade (SACUI et al., 2014). É utilizada em nanocompósitos, fabricação de papel, fármacos, cosméticos, aditivos de revestimento, embalagens de alimentos, barreira para gases e biomedicina (ABDUL KHALIL et al., 2014).

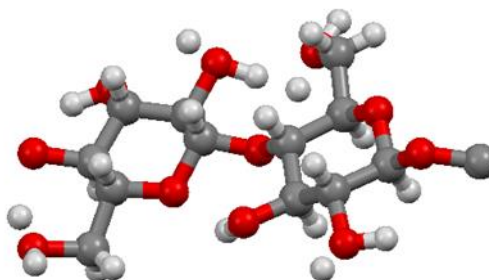
As propriedades da estrutura da nanocelulose dependem principalmente da origem da celulose e do processo de extração (MAITI et al., 2013).

A celulose tem grandes aplicações na área biomédica, muito utilizada em tratamentos renais, substituto temporário de pele, agente hemostático, reconstrução de tecidos, barreira pós-operatória e material de cultura de hepatócitos (HOENICH, 2006).

2.5.CELULOSE BACTERIANA

A celulose também pode ser sintetizada por bactérias do gênero *Acetobacter*, *Agrobacterium*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* e *Sarcina*, durante o crescimento celular. Apresenta fórmula química e ligações β -1,4-glicosídicas iguais à da celulose vegetal, porém é encontrada pura e na escala nano (RAJWADE; PAKNIKAR; KUMBHAR, 2015; VIERA, 2013).

A celulose bacteriana foi descoberta em 1886 por A. J. Brown no processo de fermentação do vinagre, porém o uso na biomedicina é recente (RAJWADE; PAKNIKAR; KUMBHAR, 2015). Apresenta majoritariamente célula unitária $I\alpha$, ou seja, triclínica (FIGURA 8), diferente da celulose vegetal $I\beta$, monoclínica, o que resulta em propriedades físicas distintas tais como tamanho, resistência e capacidade de absorção de água, apesar da similaridade nas propriedades químicas. Em comparação às fibrilas de celulose vegetal as nanofibrilas de celulose bacteriana possuem maior área superficial o que permite maior capacidade de retenção de água (WANG; ZHU; DU, 2011).

FIGURA 8- CÉLULA UNITÁRIA DA CELULOSE I α 

FONTE: SOFTWARE MERCURY 3.7

BC apresenta alta cristalinidade de aproximadamente 60% e alto grau de polimerização entre 16000 e 20000 (WANG; ZHU; DU, 2011).

Atualmente a celulose bacteriana é utilizada como substituta da pele em caso de feridas por possuir grande potencial no processo de cicatrização, reduzindo a dor e acelerando a granulação (RAJWADE; PAKNIKAR; KUMBHAR, 2015; VIERA, 2013). No entanto por ser um processo de síntese bacteriana, trata-se de um processo de baixo rendimento e alto custo (BAUA, 2007; IWAMOTO; NAKAGAITO; YANO, 2007).

BC apresenta biocompatibilidade, ou seja, não é tóxica para o sistema biológico principalmente pela semelhança estrutural com o colágeno (KUCIŃSKA-LIPKA; GUBANSKA; JANIĆ, 2015; RAJWADE; PAKNIKAR; KUMBHAR, 2015).

YAMANAKA et al., 1989 obtiveram diferentes valores de resistência à tração para películas de celulose bacteriana variando as condições de secagem, pressão e temperatura. A maior resistência encontrada foi nas condições de secagem em 150 °C e pressão de 49 MPa, atingindo resistência à tração de 260 MPa. Quando seca ao ar sem a variável de pressão atinge resistência de 256 MPa. Após a síntese da celulose bacteriana obtiveram uma polpa por desintegração mecânica e em seguida produziram um papel com resistência a tração de 85 MPa.

BODIN et al., 2007 obtiveram tubos de celulose bacteriana variando as razões de oxigênio no processo de fermentação e avaliaram a influência das condições de cultivo nas propriedades mecânicas e morfológicas. Os tubos apresentaram resistência à tração em torno de 0,4 MPa.

BACKDAHLA et al., 2006 estudaram anéis de celulose bacteriana para aplicações como enxertos vasculares de pequeno calibre. As propriedades mecânicas da celulose bacteriana foram medidas em solução de Krebs e comparadas às propriedades das artérias carótidas porcinas. Os anéis apresentaram resistência à tração em torno de 0,16 MPa.

A BC é utilizada comumente nas indústrias de papel e alimento, e com grande desenvolvimento da área biomédica em enxertos vasculares, regeneração de nervos, implantes dentários, administração de fármacos e curativos (KUCIŃSKA-LIPKA; GUBANSKA; JANIK, 2015).

2.6.CALENDULA OFFICINALIS

Calendula officinalis L., espécie medicinal de origem europeia e pertencente à família *Asteraceae* (BORELLA; CARVALHO, D.M.A. TEIXEIRA; RIBEIRO, 2012), é uma planta herbácea, nativa em toda região do Mediterrâneo e cultivada em toda a Europa, onde floresce quase o ano todo (GAZIM et al., 2007).

É uma planta ornamental e amplamente utilizada na medicina popular, como anti-inflamatório, antisséptico, cicatrizante, antiespasmódico, calmante, antimicrobiano, antiviral, tonificante, anti-alérgica entre outras. Sua rica composição química de substâncias biologicamente ativas inclui óleo essencial, flavonóides, ácido oleanóico, saponinas, mono, di, triterpenos, entre outros, que traz suas características terapêuticas. O conteúdo total de flavonóides na planta depende da espécie e da região de crescimento (ABDULLABEKOVA et al., 2014; TESKE; TRENTINE, 1995).

Dada a beleza de suas inflorescências amarelo-alaranjadas e seu amplo período de floração, a *Calendula officinalis* tem sido cultivada em quase todo o

mundo como planta ornamental tanto para vasos como para jardins. Estas plantas e suas inflorescências podem ser utilizadas como inseticida natural (CITADINI-ZANETTE; NEGRELLE; BORBA, 2012).

No Brasil é conhecida popularmente como calêndula, mal-me-quer, maravilha, mal-me-quer-dos-jardins, margarida-dourada, calêndula do campo, calêndula do jardim, maravilhas do campo e calêndula de panela (MINISTÉRIO DA SAÚDE E ANVISA., 2014).

Considerando seu amplo espectro de ação a *Calendula officinalis* é utilizada em diversas indústrias como as farmacêuticas, alimentícias e cosmética (ABDULLABEKOVA et al., 2014).

O aroma característico das flores de calêndula (FIGURA 9) é associado à presença dos sesquiterpenos na fração volátil, dentre esses o d-cadineno que confere as notas verdes, doces e refrescantes, e o a-cadinol responsável pelas notas amadeiradas (GAZIM et al., 2007).

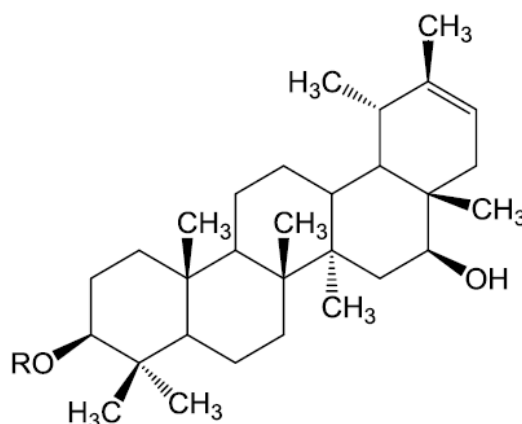
FIGURA 9- FLOR DA CALENDULA OFFICINALIS



FONTE: MINISTÉRIO DA SAÚDE E ANVISA., 2014

Os princípios ativos em preparações de Calêndula que agem contra inflamações da pele e mucosas e atuam na cicatrização de feridas são os triterpenóides, especialmente os ésteres palmitato de faradiol, miristato de faradiol e laurato de faradiol (MINISTÉRIO DA SAÚDE E ANVISA., 2014).

FIGURA 10- ESTRUTURAS DOS MONOÉSTERES DO FARADIOL ONDE R = LAURIL, MIRISTIL OU PALMITIL.



FONTE: ADAPTADO ZITTERL- EGLSEER et al., 1997

Os triterpenos, sobretudo os monoésteres de faradiol (FIGURA 10), têm sido relatados como os principais responsáveis pela atividade anti-inflamatória da planta. A ação cicatrizante igualmente tem sido cientificamente comprovada. A tintura de calêndula a 5% propiciou obtenção dos maiores valores médios das células envolvidas no processo cicatricial, os fibroblastos, resultando em resposta mais satisfatória na cicatrização que os outros tratamentos aplicados sobre feridas cutâneas experimentais em coelhos (CITADINI-ZANETTE; NEGRELLE; BORBA, 2012).

O óleo essencial extraído desta planta tem alta atividade contra tricomoníase, resultados confirmados por ABDULLABEKOVA et al., 2014; GRACZA, 1987; MARCZAL et al., 1987. O óleo também apresenta grande potencial para extinguir as reações de radicais livres, possuindo aplicação na

área de cosméticos como antioxidante (MISHRA; CHATTOPADHYAY; MISHRA, 2012; MISHRA et al., 2012). GAZIM et al., 2008 em ensaios antifúngicos mostraram que o óleo essencial da calêndula apresenta potencial atividade antifúngica sendo eficaz contra os 23 fungos clínicos testados.

Vários estudos de toxicidade aguda foram desenvolvidos envolvendo extratos de *Calêndula officinalis*, administração por via oral (gavagem) a ratos ou camundongos, comprovando ausência de toxicidade dos extratos em doses de até 5g/kg peso, porém o significado destes estudos não é diretamente correlacionável devido ao uso da Calêndula ser majoritariamente tópico (MINISTÉRIO DA SAÚDE E ANVISA., 2014).

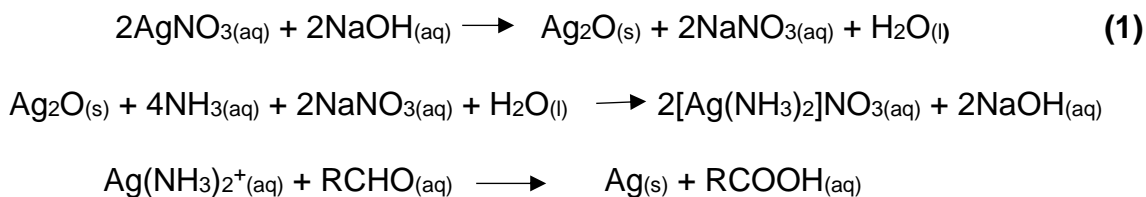
PEREZ-CARREON et al., 2002, investigou o efeito genotóxico e antigenotóxico de extratos de calêndula incluindo o aquoso, hidroalcoólico, etanólico, e clorofórmico em um modelo de cultura de células hepáticas de rato. O extrato aquoso e o hidroalcoólico em concentrações de ng/mL protegem completamente as células hepáticas frente à síntese de DNA, entretanto em concentrações três ordens de magnitude maior são genotóxicas. Os extratos etanólico e clorofórmico não são genotóxicos em concentrações de até 50 microgramas/mL e protegem parcialmente as células hepáticas da síntese de DNA (MINISTÉRIO DA SAÚDE E ANVISA., 2014; PEREZ-CARREON et al., 2002; RAMOS et al., 1998).

Várias espécies da família *Asteracea* são reconhecidas por causarem reações de hipersensibilidade tardia, porém este efeito é relativamente raro com extratos de *Calendula officinalis*. A *Cosmetic, Toiletry and Fragrance Association* alega que o uso de extrato de calêndula em preparações cosméticas apresentou resultados negativos para ensaios de sensibilização dérmica. A *Cosmetic* também realizou testes de irritação cutânea que mostram baixo potencial de irritação. Um teste com o extrato de calêndula a 10% realizado em nove coelhos apresentou índice primário de irritação dérmica de 0% (FIUME, 2001; MINISTÉRIO DA SAÚDE E ANVISA., 2014).

2.7. NANOPARTÍCULAS DE PRATA

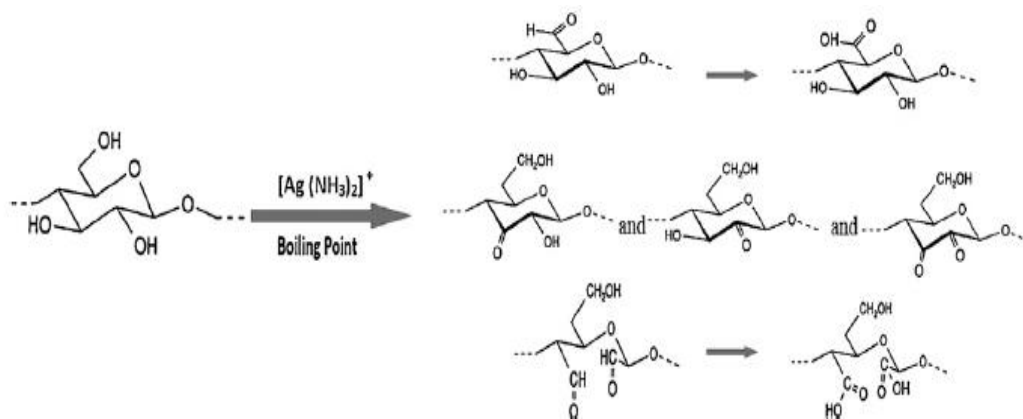
O termo nanopartículas refere-se a partículas com dimensões entre 1 a 100 nm, abrangendo a área da nanotecnologia. Nanomateriais apresentam propriedades físicas e químicas potencializadas ou únicas comparadas ao mesmo material na escala macroscópica, agregando mais valor ao material (SHARMA; YNGARD; LIN, 2009).

As nanopartículas de prata podem ser preparadas pela redução química de nitrato de prata (AgNO_3) por borohidreto de sódio (NaBH_4) na presença de citrato trissódico para estabilização (JANA; GEARHEART; MURPHY, 2001). Outro método muito utilizado é pelo reagente de Tollen's, baseado na redução do complexo $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$ por aldeídos na presença de amônia, conforme a Equação (1) (MONTAZER et al., 2012a):



O reagente de Tollens é um agente oxidante leve que reduz a prata e oxida a cadeia de celulose em oxixelulose (FIGURA 11). É difícil ter tanto uma oxidação seletiva quanto uma oxidação completa de uma posição desejada na cadeia de celulose. As cadeias de celulose apresentam extremidades redutoras e não redutoras, as redutoras são muito reativas, mas estão presentes em números muito pequenos. É esperado que o processo de oxidação da celulose ocorra nos C2 e C3 com grupos alcoólicos secundários conduzindo a formação de grupos cetônicos. Além disso ocorre oxidação no C6 com grupo alcoólico primário resultando na criação de compostos aldeídos que reagem com o complexo $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$ resultando nas NPs Ag (MONTAZER et al., 2012a).

FIGURA 11- OXIDAÇÃO DA CELULOSE PELO REAGENTE DE TOLLENS



FONTE: MONTAZER et al., 2012a

MONTAZER et al., 2012a sintetizaram nanopartículas de prata de diâmetro médio de 88 nm na superfície de algodão pelo método de reagente de Tollen. WU et al., 2014 sintetizaram NPs entre 10 e 100 nm em membranas de celulose bacteriana.

Podem ser sintetizadas também por métodos eletroquímicos, ablação a laser, irradiação por micro-ondas, decomposição térmica dentre outros (JIAN; YONGCHANG; YIMIN, 2004; YIN et al., 2004).

As NPs Ag possuem grande tendência a se agregarem e perderem a geometria e as propriedades da nanoescala. Uma maneira de prevenir a agregação e controlar a deposição das partículas é utilizar um material nanoporoso como suporte para uma distribuição espacial bem definida. Para a impregnação muitos estudos utilizam a interação eletrostática entre os íons metálicos e o momento de dipolo das moléculas de celulose (WU et al., 2014).

A prata possui ação antimicrobiana conhecida desde os primórdios da civilização, utilizada contra patologias provocadas por bactérias *Staphylococcus aureus* em queimaduras (CHOPRA, 2007). As partículas coloidais de prata devido ao aumento de sua relação área por volume possuem um efeito de superfície que revelam sua atividade antibacteriana comparada à prata metálica. Sua utilização na forma de nanopartículas potencializa esta propriedade. As propriedades físicas e fotofísicas dos metais sobre a escala nanométrica são

influenciados pela forma, estrutura, distribuição e o processo de síntese das nanopartículas (MONTAZER et al., 2012b; SERAFIM, 2010).

O primeiro agente a ser introduzido no manejo das queimaduras em 1960 foi o nitrato de prata (AgNO_3) por Moyer e Monafó na forma de solução de nitrato de prata, seguido pela sulfadiazina de prata (Ag-SD), em 1968 por Fox. As diversas formas de preparações contendo prata foram ganhando espaço, com o desuso dos antibióticos, devido à alta resistência bacteriana, durante a Segunda Guerra Mundial para tratamento de infecções e queimaduras (MOSER; PEREIMA; PEREIMA, 2013).

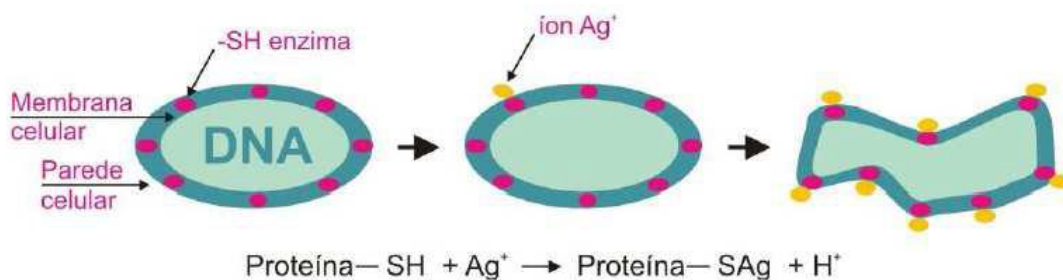
Outras preparações com prata vêm ganhando mais espaço no tratamento de queimaduras, visando principalmente uma atividade bactericida mais duradoura e menor toxicidade para as células lesadas na queimadura. Os curativos são tipicamente compostos de uma cadeia polimérica impregnada com sal ou metal de prata e apresentam grande espectro antimicrobiano contra bactérias Gram positivas (*Staphylococcus aureus*) e Gram negativas (*Escherichia coli*), além da atividade contra fungos e vírus (MOSER; PEREIMA; PEREIMA, 2013; PETICA et al., 2008).

No âmbito da medicina encontram-se à venda curativos de diversos materiais impregnados com NPs Ag, como polietileno de alta densidade, rayon, nylon, celulose bacteriana entre outros. Como exemplo o Acticoat um curativo de prata nanocristalina utilizado em feridas causadas por queimaduras, úlceras e enxertos. Testes confirmam a liberação sustentada da prata, fazendo com que sua ação dure por alguns dias, sendo recomendado o tempo máximo de aplicação de 3 dias. (MOSER; PEREIMA; PEREIMA, 2013). O Aquacel Ag é um curativo de carboximetilcelulose sódica contendo cerca de 1,2% de prata iônica. O tecido absorve o líquido do exsudato da ferida formando um gel com os íons sódio e liberando íons prata na ferida (GARCIA, 2011).

Estudos mostram que as NPs Ag agem contra mais de 650 agentes patogênicos sem desenvolver resistência (MONTAZER et al., 2012b). A ação bactericida das NPs Ag está relacionada aos danos causados no processo de respiração celular e permeabilidade ao entrarem em contato com a membrana celular dos micro-organismos. As NPs Ag interagem com os grupos tióis ($-\text{SH}$)

das enzimas e proteínas que transportam substâncias pela membrana celular, além de se ligarem ao fósforo presentes no DNA impedindo a divisão celular (FIGURA 12). Apesar da grande atividade bactericida os íons de prata não apresentam perigo para células humanas, em determinado limite de concentração (LEVIN et al., 2009; MANEERUNG; TOKURA; RUJIRAVANIT, 2008; MONTAZER et al., 2012b; MORONES; ELECHIGUERRA, J.L. CAMACHO; RAMIREZ, 2005).

FIGURA 12- EFEITO DO ÍON PRATA EM CÉLULAS DE MICROORGANISMOS.



FONTE: SERAFIM, 2010,SONAI, 2008

A NP Ag é um bactericida seguro e eficaz não sendo tóxica para as células animais em determinada concentração e altamente tóxica para bactérias (JANARDHANAN et al., 2009). Entretanto muitas NPs são pequenas o suficiente para ter acesso à pele, pulmões e cérebro. Atualmente não há informações suficientes disponíveis sobre os efeitos adversos na saúde humana (SHARMA; YNGARD; LIN, 2009).

MORONES; ELECHIGUERRA, J.L. CAMACHO; RAMIREZ, 2005 afirmam que atividade antimicrobiana nas seguintes bactérias: *P. aeruginosa*, *V. cholera*, *E. coli* e *S. typhus* em concentrações de 75 µg / mL de nanopartículas de prata são suficientes para inibir o crescimento das mesmas. NPs de prata entre 1 e 100 nm podem ser encontradas no interior e nas membranas das bactérias, porém não são observadas interações com aglomerados de prata.

3.MATERIAL E MÉTODOS

3.1.MATERIAL

Neste estudo foi utilizada polpa branqueada pelo processo Kraft obtida da madeira de *Pinus sp.* cedida por uma empresa de Papel e Celulose da região de São Paulo.

O óleo essencial de *Calendula officinalis* utilizado em todos os experimentos foi adquirido da empresa Laszlo, obtido pelo método de extração CO₂ hipercrítico com composição de óleo essencial 4%, carotenoides 0,85-1,3% e Faradiol éster 25%.

3.2.CARACTERIZAÇÃO DA POLPA CELULÓSICA BRANQUEADA

Foram realizadas análises de caracterização da composição da polpa celulósica branqueada utilizada como matéria-prima para obtenção dos filmes de nanocelulose.

3.2.1.Teor de lignina

Para 1 g de amostra foram adicionados 15 mL de ácido sulfúrico (H₂SO₄) 72% e mantido 2 h em repouso. Em seguida foram adicionados 560 mL de água destilada e levado para ebulição em condensador por 4 h. Após resfriar, o material foi filtrado e o teor de lignina determinado pelo método gravimétrico (EMBRAPA FLORESTAS/LABORATÓRIO TECNOLOGIA DA MADEIRA, 2012a).

3.2.2. Teor de cinzas

A amostra foi calcinada em mufla a 525 °C por 1 h. O teor de cinzas foi determinado pelo método gravimétrico (EMBRAPA FLORESTAS/LABORATÓRIO TECNOLOGIA DA MADEIRA, 2012b).

3.2.3. Teor de açúcares

O teor de carboidratos da polpa celulósica branqueada foi quantificado por cromatografia de troca iônica em HPAEC/PAD da Thermo. A separação foi feita em coluna CarboPac PA 20 (4 mm x 250 mm, 5 µL looping, taxa de fluxo 0,5 mL min⁻¹ e temperatura 30 °C). A quantificação dos açúcares foi realizada por uma curva externa com os padrões de arabinose (0,4 – 9,9 mg/L), galactose (0,4 – 10,1 mg/L), glicose (3,8 – 95,3 mg/L), xilose (0,98 – 24,6 mg/L), manose (1,19 – 29,8 mg/L) e celobiose (0,65 – 16,2mg/L). O preparo da amostra foi realizado por hidrólise ácida total (H₂SO₄ 12 M) da holocelulose (EMBRAPA FLORESTAS/LABORATÓRIO TECNOLOGIA DA MADEIRA, 2012c).

3.3. SUSPENSÃO DE NANOFIBRILAS DE CELULOSE

Para obtenção da celulose nanofibrilada a polpa celulósica branqueada foi dispersa em água destilada e homogeneizada em liquidificador laboratorial para obtenção de uma pasta. Para o processo mecânico de desfibrilação a pasta, na concentração de 3 % em base seca, foi inserida no moinho Super Masscoloider Masuko Sangyo (FIGURA 13 A), sob rotação de 1500 rpm e 20 passes, sendo o passe um ciclo completo de moagem da pasta (FIGURA 13 B).

O moinho é composto por um disco de pedra rotativo (FIGURA 13 C) e um disco de pedra estático com uma abertura ajustável entre os discos. Através do processo mecânico de compressão e forças de cisalhamento quando a polpa

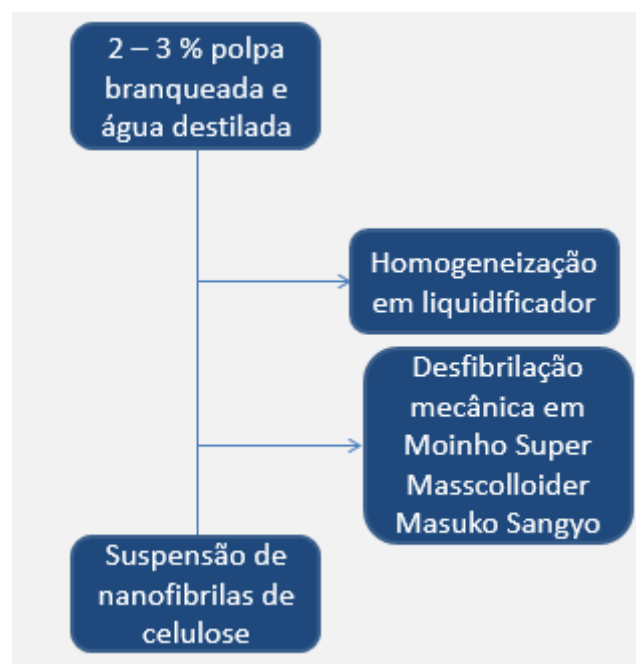
é forçada pela abertura entre os discos ocorre o processo de desfibrilação mecânica.

FIGURA 13 A) MOINHO MASSCOLOIDER MASUKO SANGYO B) MOINHO EM FUNCIONAMENTO C) DISCO DE PEDRA ROTATIVO



FONTE: O AUTOR 2017

FIGURA 14 -- FLUXOGRAMA DO PROCESSO DE DESFIBRILAÇÃO MECÂNICA



FONTE: O AUTOR 2017

Para a suspensão da polpa celulósica branqueada pura foi adotada a nomenclatura de polpa bruta (PB) para a apresentação dos resultados.

3.4. CARACTERIZAÇÃO DA SUSPENSÃO DE NANOFIBRILAS DE CELULOSE

3.4.1. Teor de açúcares

O teor de carboidratos das suspensões de nanofibrilas de celulose foi quantificado por cromatografia de troca iônica em HPAEC/PAD da Thermo. A separação foi feita em coluna CarboPac PA 20 (4 mm x 250 mm, 5 μ L looping, taxa de fluxo 0,5 mL min⁻¹ e temperatura 30 °C). A quantificação dos açúcares foi realizada por uma curva externa com padrões de arabinose (0,4 – 9,9 mg/L), galactose (0,4 – 10,1 mg/L), glicose (3,8 – 95,3 mg/L), xilose (0,98 – 24,6 mg/L), manose (1,19 – 29,8 mg/L) e celobiose (0,65 – 16,2mg/L). O preparo das amostras foi realizado por hidrólise ácida total (H₂SO₄ 12 M) das suspensões de nanocelulose previamente secas em estufas a 60 °C (EMBRAPA FLORESTAS/LABORATÓRIO TECNOLOGIA DA MADEIRA, 2012c).

3.4.2. Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

As estruturas e as dimensões das nanofibrilas de celulose em suspensão foram analisadas por Microscópio Eletrônico de Transmissão modelo JEM 1200 EX-II da JEOL com resolução de 0,5 nm que permite magnificações de até 600 kX, localizado no Centro de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal do Paraná.

Duas gotas de cada amostra das suspensões nanocelulósicas foram diluídas em 50 mL de água destilada e sonificadas em ultrassom durante 20 minutos. Uma gota de cada diluição foi depositada sobre grade de cobre com

filme de carbono destinada à observação no microscópio eletrônico de transmissão. As grades foram deixadas em estufa 35 °C até a secagem.

3.5.OBTENÇÃO DE FILMES DE NANOFIBRILAS

Com base no valor da umidade de cada suspensão nanocelulósica foram calculadas as massas necessárias para a produção dos filmes com gramatura objetivada (20 a 60 g/m²), considerando a área de cada filme sendo 0,0294 m².

Os filmes foram produzidos por meio de filtração (FIGURA 15 A) com membranas de nylon de abertura de 22 µm. As massas de suspensão necessária para obter cada filme foram diluídas em água destilada até concentração de 3 x 10⁻³ g.mL⁻¹, as misturas foram agitadas por 1 min até completa homogeneização. Após foram filtradas em membrana de nylon 22 µm suportada em peneira de 60 Mesh (FIGURA 15 B). As suspensões foram prensadas com placa de vidro para a retirada do excesso de água, em seguida o conjunto peneira, material e placa de vidro foram colocados em estufa a 60 °C para secagem por 24 h (FIGURA 16).

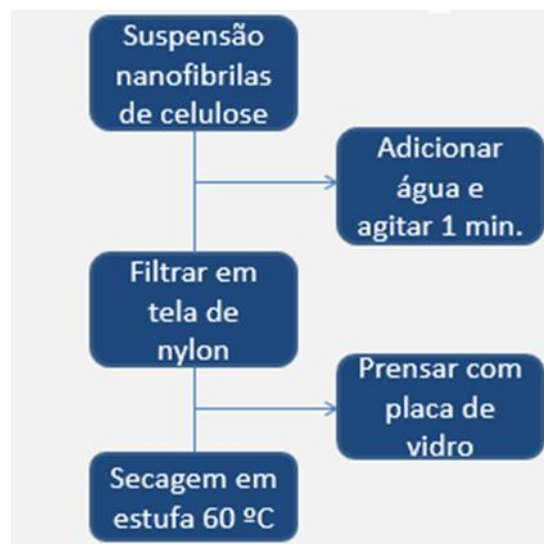
Para os filmes de nanocelulose obtidos da polpa celulósica branqueada pura foi adotada a nomenclatura de filme da polpa bruta (FPB) para apresentação dos resultados.

FIGURA 15 - A) FILTRAÇÃO DA SUSPENSÃO DE NANOCELULOSE B) SISTEMA DE FILTRAÇÃO



FONTE: O AUTOR 2017

FIGURA 16 – FLUXOGRAMA DO PROCESSO DE OBTENÇÃO DOS FILMES DE NANOCELULOSE



FONTE: O AUTOR 2017

3.6. EXTRAÇÃO DA HEMICELULOSE

Para 60 g da polpa celulósica foram adicionados 300 mL de hidróxido de sódio (NaOH) 17,5%. Foram feitas mais 3 adições de 150 mL de NaOH a cada 5 minutos, deixando a polpa repousar por 30 min. Sob agitação foram adicionados 990 mL de água destilada, deixando-a repousar por 1 h. A mistura foi filtrada e lavada com 3 L de NaOH 8,3% e água destilada quente. O material permaneceu imerso em 450 mL de ácido acético 10% durante 3 min e

posteriormente foi lavado com água destilada até atingir pH neutro. Em seguida foi seco em estufa 60 °C por 24 h (ROWELL, 1984).

Após o processo de extração da hemicelulose da polpa celulósica obteve-se a suspensão de celulose nanofibrilada e o filme conforme procedimento descrito em 3.3 e 3.5 respectivamente.

Para a polpa celulósica a qual foi realizado o processo de extração da hemicelulose foi adotada a nomenclatura de polpa tratada (PT) e o respectivo filme de polpa tratada (FPT) para apresentação dos resultados.

3.7.IMPREGNAÇÃO DE ÓLEO ESSENCIAL DE CALÊNDULA

O óleo essencial de calêndula foi adicionado às nanofibrilas de celulose antes da obtenção dos filmes. Foram feitas adições de 5% e 10% (m:m) de óleo essencial de calêndula em relação à massa de nanofibrilas de celulose. As adições foram feitas nas suspensões de nanofibrilas de celulose obtidas da polpa bruta e seguiram o procedimento de obtenção dos filmes descrito em 3.5.

3.8.IMPREGNAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA

As nanopartículas de prata foram sintetizadas pelo método de reagente de Tollen. Uma solução de nitrato de prata (AgNO_3) 0,5 M foi misturada com hidróxido de sódio (NaOH) 0,5 M formando um precipitado de óxido de prata (Ag_2O). O precipitado foi decantado centrifugado (10 min e 3000 rpm) e lavado. Em seguida foi adicionado lentamente uma solução de amônia 2% (m:v), solubilizando o óxido de prata e formando o complexo $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$. A solução foi colocada em banho ultrassom por 15 min.

Para a impregnação, os filmes foram imersos na solução do complexo $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$ em banho de aquecimento a 80 °C por 30 min. Após foram lavados com água destilada e secos em câmara climática 20 °C e 50 u.r. Foram

preparadas soluções de Ag_2O em amônia nas concentrações de 10 e 35 ppm. As NPs Ag foram sintetizadas diretamente na superfície das fibras, usando as próprias cadeias da celulose como redutor e estabilizante (MONTAZER et al., 2012a).

3.9.CARACTERIZAÇÃO GERAL DOS FILMES OBTIDOS

3.9.1.Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A distribuição das nanofibrilas nos filmes foi analisada por microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo. Os filmes foram inseridos sobre fita de carbono dupla-face, previamente coladas sobre porta amostras de alumínio (stubs), e recobertas com ouro. As micrografias foram obtidas por Microscópio Eletrônico de Varredura FEI Quanta 450 FEG com resolução de 1nm que permite magnificações de até 2 MX, localizado no Centro de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal do Paraná. Os dados extraídos das micrografias foram medidos com o auxílio do *Software ImageJ*.

Foram analisadas as morfologias dos filmes obtidos da polpa bruta (PB), polpa tratada (PT), impregnados com óleo essencial de calêndula e nanopartículas de prata.

Análise química elementar por espectroscopia de energia dispersiva (EDS) foi realizada no Microscópio Eletrônico de Varredura FEI Quanta 450 FEG com resolução de 131 eV e detector Apollo X SDD para os filmes de nanocelulose com nanopartículas de prata.

3.9.2.Difração de raios X

A cristalinidade da celulose foi determinada com difratômetro de Raios-X XRD 7000 da SHIMADZU, localizado no Laboratório de Óptica de Raios-X e

Instrumentação no Departamento de Física da Universidade Federal do Paraná. Operando a 40 kV com uma corrente 20 mA e velocidade de 2 °/min usando radiação de Cu-K α com comprimento de onda de 0,15418 nm.

De acordo como método sugerido por SEGAL et al., 1959, o índice de cristalinidade para celulose I foi calculado a partir da intensidade máxima obtida no plano cristalino (002) localizado a aproximadamente $2\theta = 22,6^\circ$ e da intensidade mínima obtida entre os dois picos cristalinos localizados a $2\theta = 16,5^\circ$ e $22,6^\circ$. Utilizando o software Origin Pro os dados tiveram um tratamento de alisamento por transformada de Fourier com 15 % de corte.

3.9.3. Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros foram coletados utilizando o espectrofotômetro Bruker Tensor 37, em modo de absorvância com 64 varreduras (scans) e resolução de 4 cm^{-1} , com varredura de 400 a 4000 cm^{-1} .

As amostras foram previamente secas a $60\text{ }^\circ\text{C}$ e incorporadas ao KBr na proporção de 1:100 (m:m), maceradas e homogeneizadas.

3.9.4. Análise térmica por termogravimetria (TGA) e análise termogravimétrica derivada (DTG)

As análises térmicas foram conduzidas em um analisador térmico modelo DTG-60H da Shimadzu com uma taxa de aquecimento de $10\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ em atmosfera inerte de N_2 da temperatura ambiente até $600\text{ }^\circ\text{C}$.

3.10. CARACTERIZAÇÃO FÍSICA DOS FILMES

Os ensaios físicos foram realizados no Laboratório Polpa e Papel da Universidade Federal do Paraná em ambiente controlado [temperatura de (23 ± 2) °C e umidade relativa do ar (50 ± 2) %]. Foram analisados filmes da polpa bruta e da polpa tratada de duas gramaturas (40 e 50 g/m²). Para cada ensaio foram analisados cinco corpos de prova. As gramaturas para os testes foram determinadas a partir da gramatura que os filmes da polpa tratada formavam um filme suficiente uniforme para a realização dos testes.

As nomenclaturas adotadas foram FPB40 e FPB50 para os filmes de nanocelulose da polpa bruta e FPT40 e FPT50 para os filmes da polpa tratada.

3.10.1. Espessura

A espessura dos filmes foi determinada utilizando o equipamento micrômetro eletrônico da Regmed (FIGURA 17), seguindo a Norma T411-om97 (TECHNICAL ASSOCIATION OF THE PULP AND PAPER INDUSTRY, 1997).

FIGURA 17 - EQUIPAMENTO ELETRÔNICO MICRÔMETRO PARA DETERMINAÇÃO DA MEDIDA DE ESPESSURA



FONTE: O AUTOR 2017

3.10.2. Gramatura

A gramatura relaciona a massa em gramas pela área em metro quadrado de um papel ou filme. Os filmes foram pesados em balança analítica e as massas relacionadas com as áreas definidas seguindo a Norma T410-om02 (TECHNICAL ASSOCIATION OF THE PULP AND PAPER INDUSTRY, 2002a).

3.10.3. Densidade aparente

A densidade aparente dos filmes foi calculada pela relação entre a gramatura e a espessura do papel segundo a Norma T220-om01 (TECHNICAL ASSOCIATION OF THE PULP AND PAPER INDUSTRY, 2001).

3.10.4. Absorção de água

A absorção de água foi determinada pelo método Cobb ($\text{g}\cdot\text{m}^{-2}$) que corresponde à massa de água absorvida por 1 m^2 do filme em um determinado intervalo de tempo, O método foi adaptado da Norma T441-om98 sendo adotado o tempo de 60 segundos (TECHNICAL ASSOCIATION OF THE PULP AND PAPER INDUSTRY, 1998).

3.10.5. Permeância a passagem do ar

Pelo método *Gurley* foi determinada a permeância à passagem do ar, medindo a quantidade de tempo necessário para um determinado volume de ar passar através do filme expresso em $\text{s}/100 \text{ cm}^3$, segundo a Norma T460-om02 (TECHNICAL ASSOCIATION OF THE PULP AND PAPER INDUSTRY, 2002b).

FIGURA 18 – EQUIPAMENTO GURLEY PARA ENSAIOS DE PERMEÂNCIA AO AR



FONTE: O AUTOR 2017

3.10.6. Teor de umidade

Seguindo a Norma T412-om02 o teor de umidade foi determinado pelo método gravimétrico (TECHNICAL ASSOCIATION OF THE PULP AND PAPER INDUSTRY, 2002c).

3.11. CARACTERIZAÇÃO MECÂNICA DOS FILMES

Os ensaios mecânicos foram realizados no Laboratório Polpa e Papel da Universidade Federal do Paraná em ambiente controlado [temperatura de (23 ± 2) °C e umidade relativa do ar $(50 \pm 2)\%$]. Para cada ensaio foram analisados cinco corpos de prova.

3.11.1. Ensaio de tração

O ensaio de tração foi realizado utilizando uma máquina universal (FIGURA 19) e dinamômetro com distância entre as garras ajustada para 100 mm e velocidade de ensaio de 10 mm/min, adaptando a norma NBR NM-ISO 1924-3:2006. Determinou-se a resistência a tração (MPa) correspondente ao corpo de prova com largura de 1,5 cm (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, 2006).

FIGURA 19 – MÁQUINA UNIVERSAL E DINAMÔMETRO PARA ENSAIOS DE TRAÇÃO



FONTE: O AUTOR 2017

3.11.2. Ensaio de arrebentamento

Segundo a Norma NBR NM ISO 2471:2001 utilizando equipamento Mullen foi determinada a resistência ao arrebentamento dos filmes obtidos das suspensões da polpa bruta e da polpa tratada (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, 2001).

3.12. QUANTIFICAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE CALÊNDULA DEPOSITADO AO FILME

O óleo essencial de calêndula depositado ao filme foi quantificado pelo processo de extração com solvente. A partir de uma massa conhecida do filme foi realizada a extração em soxhlet utilizando éter etílico. Pelo método

gravimétrico foi quantificada a massa de óleo essencial de calêndula depositada ao filme.

3.13. QUANTIFICAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA DEPOSITADAS NO FILME

A concentração de prata depositada nos filmes de nanocelulose foi determinada por espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES). O espectrômetro utilizado foi o ICP OES modelo Vista - Pró simultâneo com observação axial Varian (Mulgrave, Austrália) do Instituto de Tecnologia do Paraná (TECPAR). A curva de calibração obtida na faixa de concentração de 0,5 mg L⁻¹ a 2,0 mg L⁻¹, obtida por diluições sucessivas da solução padrão estoque de Ag (AccuStandard No. ICP-53N-1, New Haven, USA) de 1000 mg L⁻¹, resultando em $r^2 = 0,999$. A TABELA 2 mostra as condições instrumentais.

TABELA 2 - CONDIÇÕES INSTRUMENTAIS DO ICP-OES PARA DETERMINAÇÃO DE PRATA

Parâmetros	Valores/definição
Vazão do gás Plasma	~15,0 L/min
Vazão do gás auxiliar	~ 1,5 L/min
Potência	~ 1,10 kW
Tempo de integração / estabilização	2 s / 15 s
Velocidade da bomba	15 rpm
Pressão no nebulizador	~ 200 kPa / nebulizador concêntrico de vidro
Tocha	Padrão axial Varian com tubo de alumina de 1,8 mm (id)
Comprimento de onda λ / nº integrações	328,068 nm / 03 integrações

As amostras foram preparadas por hidrólise ácida total. Uma amostra de 30 mg do filme seco foi suspensa em 1 mL de H₂SO₄ 12 M mantido a 37 °C por 1 h em banho térmico, seguida de diluição para 1 %. A concentração de prata presente na solução foi determinada por ICP-OES.

3.14. LIBERAÇÃO DE PRATA DOS FILMES DE NANOCELULOSE

Amostras com área de 7 x 7 cm de filmes de nanocelulose com nanopartículas de prata nas duas concentrações sintetizadas foram mantidas em 50 mL de água num período de 24, 48 e 72 h.

A quantificação da prata liberada em água a partir dos filmes de nanocelulose foi determinada por espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES) com parâmetros mencionados em 3.13.

3.15. APLICAÇÃO DO FILME DE NANOCELULOSE COMO CURATIVO EM DORSO DE RATOS

A análise da aplicação como curativo dos filmes de nanocelulose foi realizada na Pontifícia Universidade Católica do Paraná, na Escola de Ciências da Vida sob a orientação do Prof. Dr. José Ademar Villanova Junior.

O experimento foi realizado após aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, seguindo as normas e princípios éticos do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (Protocolo n. 01028/2016 - 2ª versão).

Foram estudados 33 ratos Wistar, distribuídos aleatoriamente em três grupos (n = 11):

Grupo 1 (Grupo Controle Negativo) – Retirada de segmento da pele e do tecido subcutâneo com dimensão de 2x2 cm e cicatrização espontânea.

Grupo 2 (Grupo Controle Positivo) – Retirada de segmento da pele e do tecido subcutâneo com dimensão de 2x2 cm. Aplicação de membrana de celulose bacteriana (Membracel®) cobrindo toda a extensão da ferida.

Grupo 3 (Grupo Membrana de Celulose Vegetal) – Retirada de segmento da pele e do tecido com dimensão 2x2 cm. Aplicação de membrana de celulose

vegetal obtida da desfibrilação da polpa bruta com gramatura de 20 g/m², cobrindo toda a extensão da ferida.

Os animais foram transferidos para gaiolas isoladas e identificadas, e a recuperação da ferida foi acompanhada diariamente. Decorrido o período de 30 dias, os animais foram submetidos à eutanásia com o uso de superdosagem anestésica.

3.16. TESTE ANTIBACTERIANO DOS FILMES DE NANOFIBRILAS DE CELULOSE

As análises microbiológicas foram realizadas no Laboratório de Microbiologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

As atividades antibacterianas dos filmes de nanocelulose impregnados com nanopartículas de prata e óleo essencial de calêndula foram investigadas contra duas bactérias, *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), como bactéria Gram-positiva e *Escherichia coli* (ATCC 25922), como bactéria Gram-negativa. Os testes foram realizados por dois métodos, disco-difusão e microdiluição em caldo seguindo o protocolo de WIEGAND; HILPERT; HANCOCK, 2008.

Primeiramente nos dois métodos foi realizada a ativação das bactérias (*S. aureus* e *E.coli*). Com o auxílio de uma alça bacteriológica foram transferidas aproximadamente 2 colônias das bactérias para placas com ágar nutriente, sendo incubadas à (37 ± 2) °C por 18 h. Após cada método seguiu os procedimentos em 3.16.1 e 3.16.2. Todos os procedimentos foram realizados com material esterilizado em autoclave 121 °C por 20 min e em ambiente asséptico (fluxo laminar ou próximo ao fogo).

3.16.1.Método de disco-difusão

Após o período de incubação de 18 h, algumas colônias de cada bactéria foram suspensas em solução salina NaCl 0,85% em água destilada, de modo a obter densidade equivalente ao padrão de turbidez 0,5 da escala McFarland, que corresponde a aproximadamente a $1,5 \times 10^8$ UFC/mL.

Em seguida foi realizada a inoculação das placas de Petri contendo ágar Mueller-Hinton. Com o auxílio de um swab de algodão estéril, os microrganismos foram transferidos da solução salina padronizada para as placas com meio sólido, espalhando uniformemente o inóculo bacteriano sobre a superfície do meio de cultivo, semeando-o em três direções diferentes.

As amostras dos filmes de nanocelulose foram cortadas em formato de disco com diâmetro de 7 mm e aplicadas sobre as placas inoculadas. Foram testadas as amostras dos filmes da polpa bruta, filmes impregnados com nanopartículas de prata nas concentrações de 10 e 35 ppm de Ag₂O e filmes de nanocelulose com 5 e 10 % de óleo essencial de calêndula em triplicata.

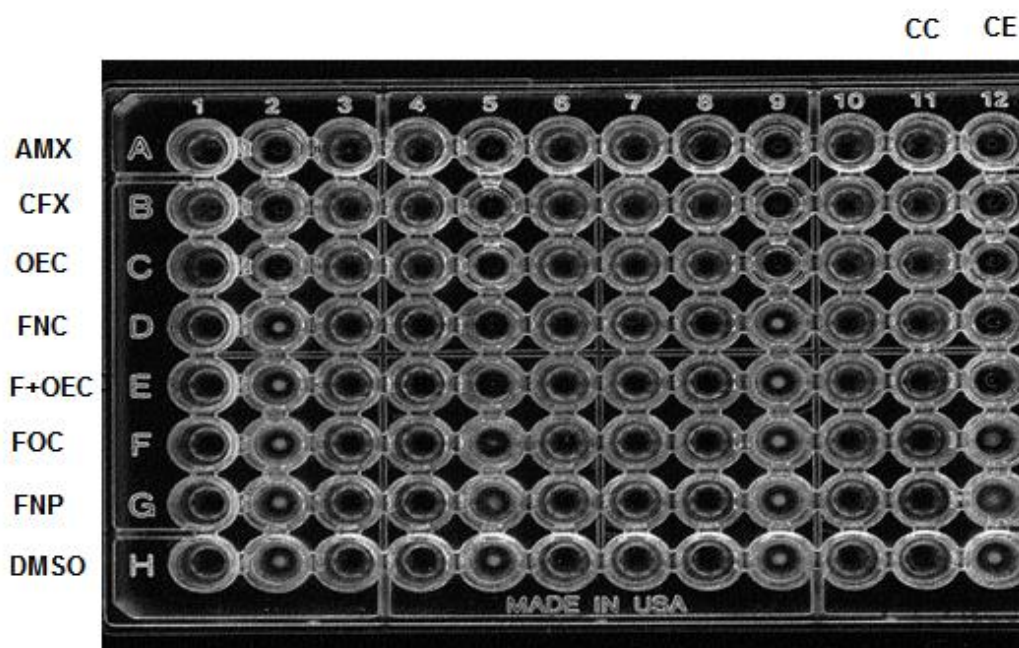
Como controle foram utilizados discos de antibióticos de cefalotina (CFL) 30 µg e amoxicilina (AMX) + ácido clavulânico 30 µg em triplicata nas placas inoculadas com *S. aureus* e *E.coli*.

As placas foram incubadas a (37 ± 2) °C por 18 h, e o diâmetro do halo de inibição em mm determinado.

3.16.2.Microdiluição em caldo

A microdiluição em caldo utiliza placas de Elisa estéreis com 96 poços (FIGURA 20). Inicialmente todos os poços foram preenchidos com 50 µL de caldo Mueller-Hinton.

FIGURA 20 - MICROPLACA PARA ANÁLISE MICROBIOLÓGICA



FONTE: O AUTOR 2017

Após preencher todos os poços com caldo, na fileira A poço 1 foram pipetados 50 μ L do antibiótico amoxicilina (256 mg/L), após homogeneização foi realizada a diluição seriada (V/V) a partir do poço 1 até o poço 10 atingindo concentração de 0,25 mg/L. O mesmo foi realizado na fileira B para o antibiótico cefalexina (CFX) 256 mg/L. Na fileira C foram pipetados 50 μ L do óleo essencial de calêndula (OEC) 50% diluído em dimetilsulfóxido (DMSO), com diluição seriada obtendo concentrações entre 128 mL/L à 0,25 mL/L de óleo essencial. Na fileira D foram testados filmes de nanocelulose obtidos da polpa bruta (FNC), sendo adicionados aos poços discos de diâmetros de 7 mm. Na fileira E foram testados discos de 7 mm de filmes de nanocelulose com adições de 5 μ L de óleo essencial de calêndula (F+OEC) (50% em DMSO) obtendo concentrações de 128 mL/L a 0,25 mL/L adicionados a cada filme, após a secagem do óleo os discos foram adicionados aos poços. Na fileira F foram testados 5 discos de 7 mm de filme de nanocelulose com 5 % de óleo de calêndula e 5 discos de filme de nanocelulose com 10 % de óleo essencial de calêndula (FOE). Na fileira G foram testados 5 discos de 7 mm de diâmetro de filmes de nanocelulose impregnados com 32 mg/kg de nanopartículas de prata e 5 discos de filmes com 83 mg/kg de nanopartículas de prata (FNP). Na fileira H como controle foi testado

o DMSO com concentração inicial de 250 mL/L seguindo uma diluição seriada (V/V) até 0,49 mL/L.

Após o período de incubação de 18 h citado em 3.16, algumas colônias de cada bactéria foram suspensas em solução salina NaCl 0,85% em água destilada, de modo a obter densidade equivalente ao padrão de turbidez 0,5 da escala McFarland, que corresponde a aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC/mL. Em seguida 200 μ L da solução salina padronizada foi adicionada a 19,8 mL/L de caldo Mueller-Hinton e homogeneizada. Foram pipetados 50 μ L da suspensão do inóculo em todos os poços até a coluna 11, sendo esta o controle de crescimento (CC). A coluna 12 recebeu apenas caldo Mueller-Hinton sendo o controle de esterilidade (CE) (FIGURA 20). Após a adição dos 50 μ L do inóculo a concentração do composto em cada poço caiu pela metade e todos os poços possuíam um volume final de 100 μ L.

As microplacas foram incubadas em estufa a (37 ± 2) °C por 18 h, sendo realizadas em duplicatas para as bactérias *S.aureus* e *E.coli*. Após 18 h foram pipetados 10 μ L de cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC) revelador de microplacas, que na presença do crescimento de bactérias apresenta coloração rosa, sendo determinado visualmente a concentração inibitória mínima (MIC).

4.RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1.CARACTERIZAÇÃO DA POLPA CELULÓSICA BRANQUEADA

A polpa celulósica branqueada de pinus utilizada no processo de obtenção de nanofibrilas apresentava umidade média de 9,2%, e teor médio de 0,7% de lignina e 0,3% de cinzas ambos em base seca.

A partir do teor médio de açúcares é possível quantificar as frações de celulose e hemicelulose presentes na polpa celulósica branqueada, pois após o processo de preparo das amostras em hidrólise ácida total a celulose é hidrolisada a celobiose e glicose, enquanto a hemicelulose é hidrolisada a arabinose, xilose, manose e galactose quantificadas por cromatografia de troca iônica (CARVALHO et al., 2009).

O teor médio de açúcares da polpa é apresentado na TABELA 3.

TABELA 3 - TEOR MÉDIO DE AÇÚCARES DA POLPA CELULÓSICA BRANQUEADA

	Arabinose (mg/g)	Xilose (mg/g)	Manose (mg/g)	Glicose (mg/g)	Galactose (mg/g)	Celobiose (mg/g)
Polpa celulósica	7 ± 0,6	78 ± 4	53 ± 2	(74 ± 3).10	0	11 ± 0,5

Por se tratar de uma polpa celulósica proveniente de uma conífera as glucomananas e as galactoglucomananas (constituídas por unidades de manose e glicose), as quais são formadas pela polimerização de formas anidro de hexoses, foram as frações típicas de hemiceluloses encontradas (BALLONI, 2009). A polpa celulósica não apresentou concentração de galactose detectável.

4.2. CARACTERIZAÇÃO DA SUSPENSÃO DE NANOFIBRILAS

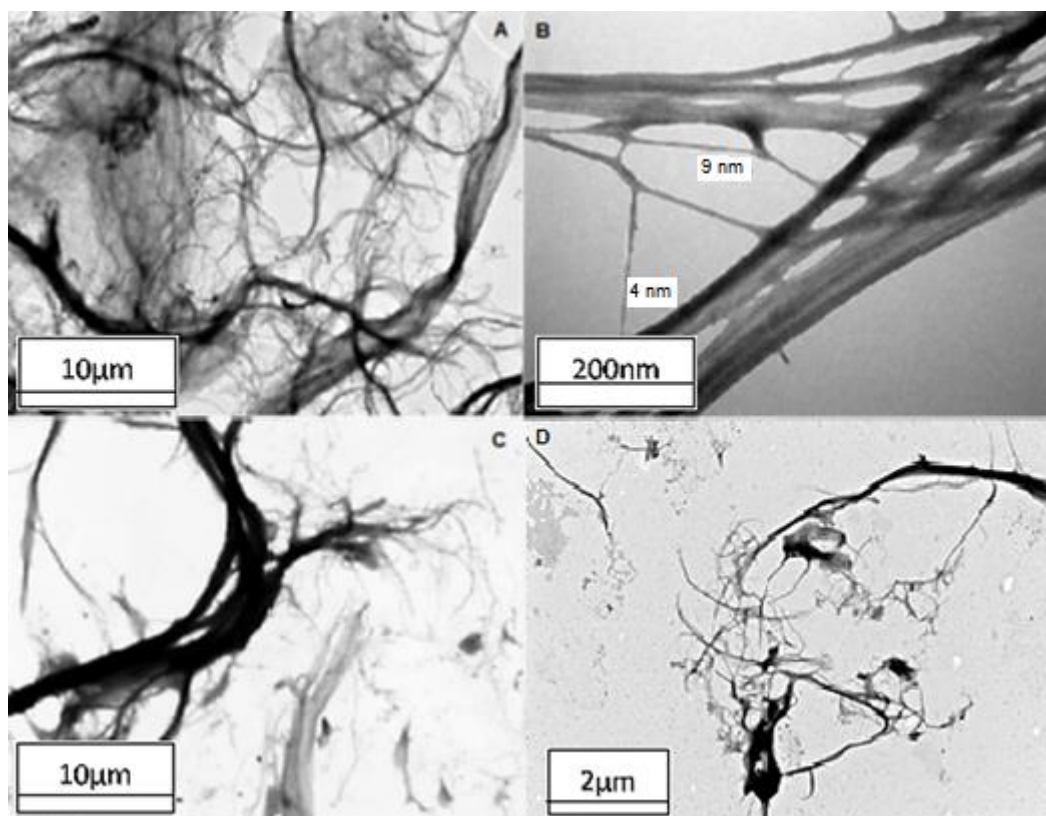
4.2.1. Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

As suspensões de nanofibrilas foram submetidas à Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) para observar as dimensões e as estruturas das nanofibrilas obtidas pelo processo de desfibrilação mecânica.

A FIGURA 21 apresenta micrografias das suspensões da polpa bruta (PB) e da polpa tratada (PT). Na magnificação de 800x (FIGURA 21 A) é possível observar que o processo de desfibrilação mecânica resultou na fibrilação da parede celular das fibrilas da polpa bruta de holocelulose (PB) obtendo nanofibrilas dispersas e de diâmetros variados (FIGURA 21 B).

É possível observar (FIGURA 21 C) que a suspensão da polpa tratada apresenta nanofibrilas agregadas em relação à suspensão da polpa bruta. Como citado por IWAMOTO; ABE; YANO, 2008 a hemicelulose atua como inibidora da coalescência das microfibrilas, ou seja, preenchendo o espaço entre as microfibrilas e atuando como uma barreira física inibindo a agregação das mesmas e facilitando a nanofibrilação. A suspensão da PT passou pelo processo de extração da hemicelulose e a ausência da estrutura das polioses permitiu com que as fibrilas de celulose agregassem. Apesar da coalescência das microfibrilas o processo de desfibrilação mecânica foi eficiente, expondo as microfibrilas da parede celular vegetal (FIGURA 21 D).

FIGURA 21 - MICROGRAFIAS DAS SUSPENSÕES DE PB. A) MAGNIFICAÇÃO 800X B) MAGNIFICAÇÃO 25 kX E DA PT C) MAGNIFICAÇÃO 800X D) MAGNIFICAÇÃO 3 kX



4.2.2. Teor de açúcares

Curativos comerciais são compostos por celulose bacteriana a qual ocorre pura, enquanto a celulose vegetal é encontrada juntamente com hemicelulose e lignina. O processo de branqueamento da polpa remove grande parte da lignina, porém restando em torno de 15 % de hemicelulose. Para assemelhar-se ao curativo comercial foi realizado o procedimento de extração da hemicelulose da polpa celulósica. A quantificação da hemicelulose extraída da polpa foi realizada pelo teste de teor de açúcares por cromatografia de troca iônica, pois a hemicelulose trata-se de um grupo distinto de polissacarídeos (açúcares) constituídos por pentoses (xilose e arabinose) e hexoses (manose e galactose) (CARVALHO et al., 2009).

Após o processo de desfibrilação mecânica foram determinados os teores de açúcares das amostras da suspensão da PB e da PT, conforme (TABELA 4), sendo as amostras estatisticamente distintas representadas por a e b.

TABELA 4 - TEOR DE AÇÚCARES DAS SUSPENSÕES DE NANOFIBRILAS

Suspensão	Arabinose (mg/g)	Xilose (mg/g)	Manose (mg/g)	Glicose (mg/g)	Galactose (mg/g)	Celobiose (mg/g)
PB	0	74,5 ± 1,2 a	45 ± 1 a	(79 ± 1).10 a	5,2 ± 0,2 a	0
PT	0	15,0 ± 0,8 b	26,8 ± 0,8 b	(89 ± 6).10 b	3,1 ± 0,3 b	0

A suspensão da PB apresenta 86 % de celulose (glicose e celobiose) e 14 % de hemicelulose (arabinose, xilose, manose e galactose) dos açúcares totais em base seca. O processo de extração da hemicelulose da polpa celulósica reduz aproximadamente 80% da xilose, 40 % da manose e 40% da galactose obtendo uma suspensão de nanofibrilas com 95 % de celulose e apenas 5 % de hemicelulose em relação aos açúcares totais. Portanto o processo da extração da hemicelulose em meio básico reduz significativamente o teor de polioses da polpa celulósica.

O processo de desfibrilação mecânica hidrolisa alguns açúcares em seus monômeros. A suspensão da PB comparada ao teor de açúcares da polpa celulósica bruta (TABELA 3), houve uma redução no teor de manose, arabinose, e celobiose, estes açúcares são hidrolisados em seus monômeros sendo comum entre eles a glicose, o que justifica o aumento no teor de glicose na suspensão de PB em relação à polpa.

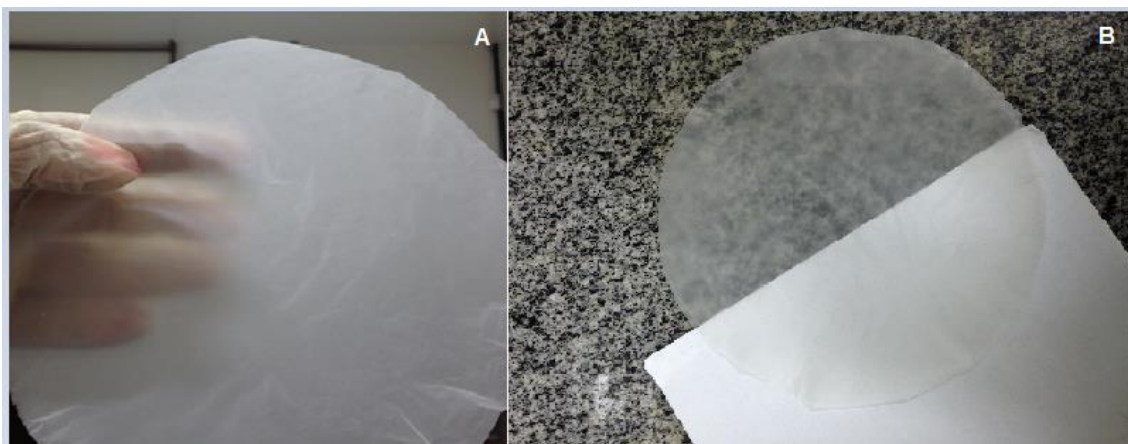
Na polpa celulósica não apresentou galactose detectável, mas nas amostras das soluções polpa bruta e polpa tratada esta foi detectada nas seguintes concentrações 5,2 e 3,1 mg/g respectivamente. Portanto a polpa celulósica apresenta concentração de galactose, porém não detectada.

4.3.FILMES DE NANOFIBRILAS DE CELULOSE

4.3.1.Filmes de nanofibrilas de celulose da polpa bruta

A FIGURA 22 apresenta um filme nanocelulósico com gramatura próxima de 20 g/m². O filme obtido é homogêneo e translúcido, como citado por outros autores (IWAMOTO; NAKAGAITO; YANO, 2007; WANG; LI; ZHANG, 2013).

FIGURA 22 – A) FILMES DE NANOCELULOSE DA PB B) FILME DE NANOCELULOSE E PAPEL BRANCO



FONTE: O AUTOR 2017

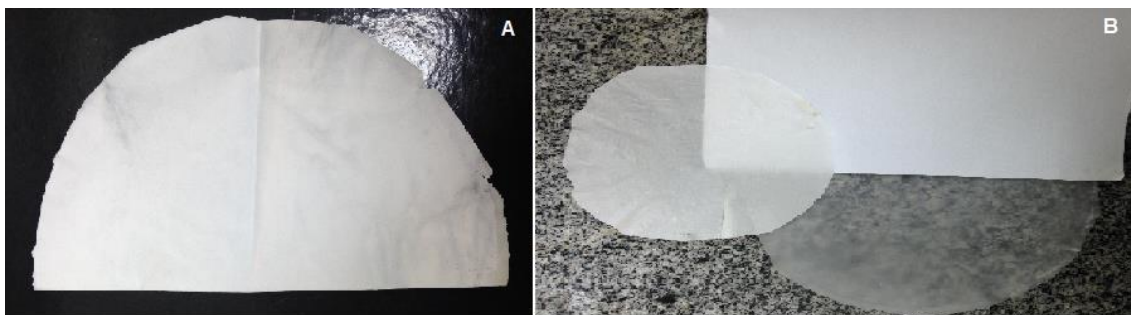
A diferença com o papel comum está na largura das fibras formadoras e no tamanho das cavidades intersticiais. Se as nanofibrilas de celulose estão densamente próximas e os interstícios entre as fibras são suficientemente pequenos evitando o espalhamento da luz, o material celulósico torna-se translúcido (NOGI et al., 2009).

A translucidez apresentada pelo material é uma qualidade para o uso como curativo em feridas corpóreas, permitindo a avaliação da cicatrização sem a necessidade da retirada e troca do curativo (MOSER; PEREIMA; PEREIMA, 2013).

4.3.2. Filmes de nanofibrilas de celulose da polpa tratada

Após o tratamento da polpa celulósica para a extração da hemicelulose em meio básico, foram obtidos filmes de nanofibrilas de celulose (FIGURA 23). Os filmes obtidos eram visivelmente não uniformes, e menos resistentes comparados aos filmes obtidos da polpa bruta.

FIGURA 23 – A) FILME DE NANOCELULOSE DA PT B) FILME DA PT PAPEL BRANCO E FILME DA PB



FONTE: O AUTOR 2017

CHAKER et al., 2013 e IWAMOTO; ABE; YANO, 2008 afirmam que a hemicelulose atua como inibidora da coalescência das microfibrilas, proporcionando aderência e aumento das propriedades mecânicas. Portanto a extração da hemicelulose da polpa celulósica ocasionou a obtenção de filmes não uniformes devido à coalescência das nanofibrilas, confirmada pela MET da suspensão de nanofibrilas (FIGURA 21).

Os espaços criados pela coalescência das nanofibrilas de celulose após a extração das polioses resultam no espalhamento da luz e conseqüentemente na opacidade do filme (NOGI et al., 2009).

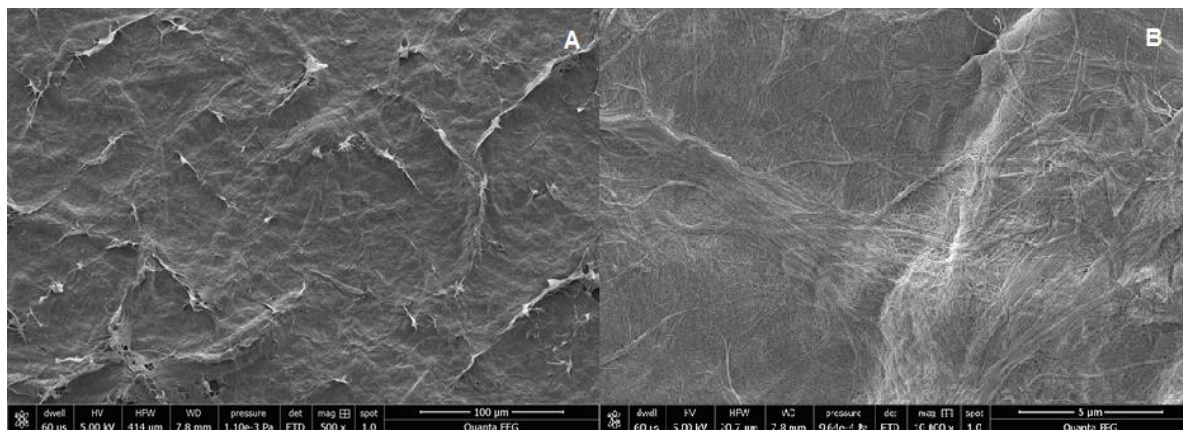
4.4. CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES DE NANOFIBRILAS A PARTIR DA POLPA BRUTA E DA POLPA TRATADA

4.4.1. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Os filmes de nanocelulose obtidos da suspensão da PB e PT foram submetidos à Microscopia Eletrônica de Varredura para análise da morfologia das nanofibrilas.

A FIGURA 24 exibe as micrografias dos filmes de nanocelulose da PB. A superfície do filme (FIGURA 24 A) mostrou-se uniforme, não porosa e compacta. As nanofibrilas apresentaram-se tão densamente compactadas (FIGURA 24 B) que quase não é possível observar as fibras individuais, o que implica na ausência de cavidades entre as fibrilas, dando a característica de translucidez ao material (NOGI et al., 2009; ZHU et al., 2014).

FIGURA 24 – MICROGRAFIAS DO FILME DE NANOCELULOSE DA PB. A) MAGNIFICAÇÃO 500X B) MAGNIFICAÇÃO 10 KX

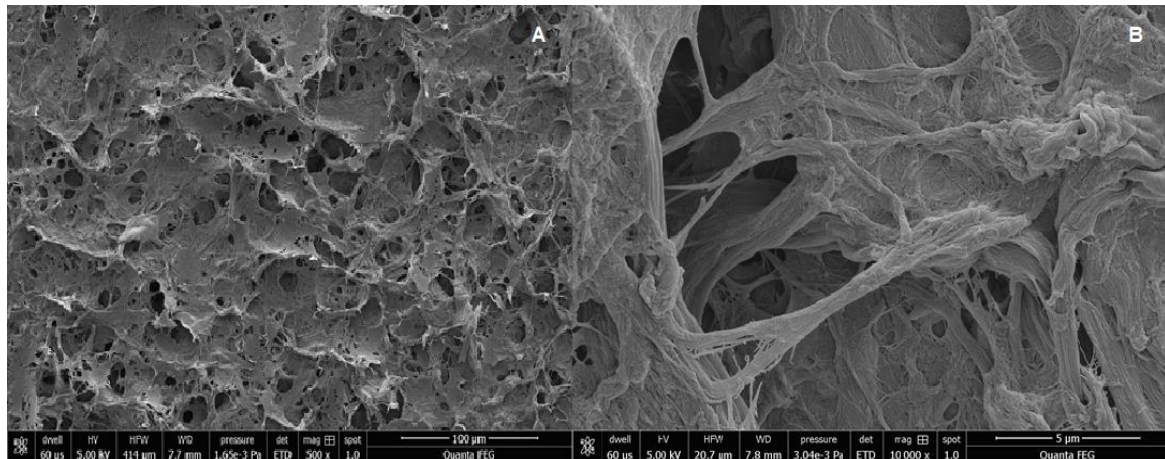


A FIGURA 25 exibe a micrografia do filme da suspensão da PT. A superfície do filme (FIGURA 25 A) mostrou-se não uniforme e muito porosa.

CHAKER et al., 2013; IWAMOTO; ABE; YANO, 2008 citaram que a ausência da hemicelulose permite a coalescência das nanofibrilas de celulose, o que gera cavidades no filme (FIGURA 25 B). Os espaços criados pela

coalescência após a extração das polioses resultam no espalhamento da luz e na opacidade do filme (NOGI et al., 2009).

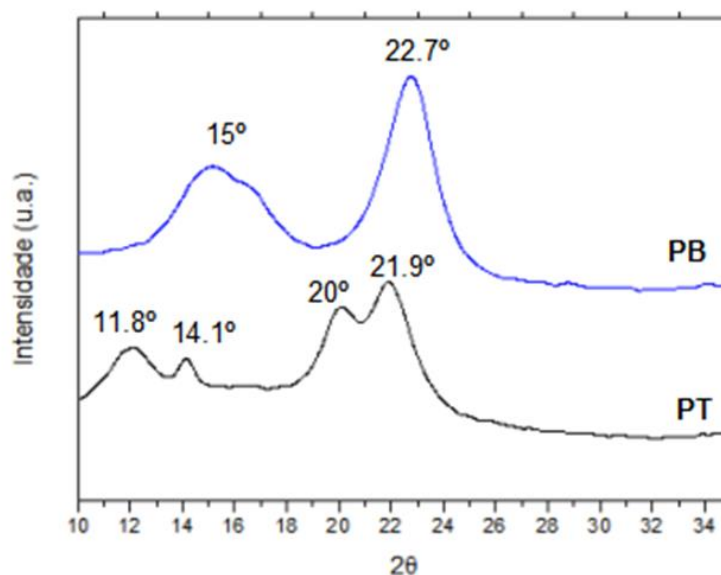
FIGURA 25 - MICROGRAFIAS DO FILME DE NANOCELULOSE DA PT. A) MAGNIFICAÇÃO 500X B) MAGNIFICAÇÃO 10 kX



4.4.2. Difração de raios x

A FIGURA 26 apresenta os picos cristalinos dos filmes da PB e da PT. É possível observar que o processo de extração da hemicelulose converteu a celulose I em celulose II. A celulose I apresenta picos cristalinos em aproximadamente 15° e $22,7^\circ$ enquanto a celulose II apresenta picos híbridos entre $11,8^\circ$ e $14,1^\circ$ e $20,0^\circ$ e $21,9^\circ$. O tratamento alcalino faz com que o reagente penetre na estrutura da celulose quebrando as ligações de hidrogênio intermoleculares, ocorrendo um rearranjo na estrutura interna para a celulose II (LENGOWSKI et al., 2013; WANG et al., 2014).

FIGURA 26 - DIFRATOGRAMA DE RAIOS X DA CELULOSE DOS FILMES DE NANOCELULOSE DA PB (A) E DA PT (B)



A partir do método de cálculo desenvolvido por SEGAL et al., 1959 no qual o percentual de celulose cristalina é determinado pela diferença entre a intensidade do pico cristalino (de maior intensidade referente ao plano 002) e a intensidade mínima entre os dois picos cristalinos, foi determinado o índice de cristalinidade médio das PB e da PT (TABELA 5). Além da conversão da celulose I para celulose II ocorreu uma redução na cristalinidade dos filmes de 77% da PB para 59% da PT. O tratamento alcalino causou a degradação as regiões cristalinas da celulose. As amostras que apresentaram resultados estatisticamente distintos são representadas por a e b.

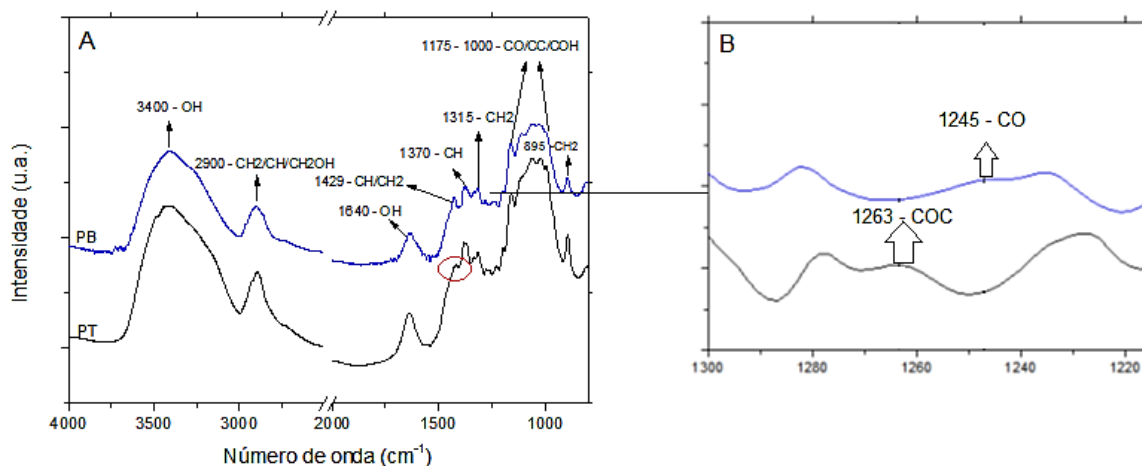
TABELA 5 - ÍNDICE DE CRISTALINIDADE DA CELULOSE DOS FILMES DA PB E DA PT

Filme	Intensidade 002	2θ	Intensidade amorfo	2θ	IC %
PB	681,7	22,7	155,7	19,1	77 a
PT	396,5	21,9	161,0	15,5	59 b

4.4.3. Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

Os filmes obtidos das suspensões da polpa bruta e da polpa tratada foram submetidos à análise de FTIR para conferir a presença dos grupos funcionais e suas respectivas ligações. A FIGURA 27 apresenta o espectro de infravermelho dos filmes.

FIGURA 27 – ESPECTRO DE FTIR DOS FILMES DA PB E DA PT. B) APROXIMAÇÃO DA BANDA EM 1245 cm^{-1} .



O espectro de infravermelho (FIGURA 27A) das amostras dos filmes da PB e da PT apresentaram bandas características da celulose. A banda larga localizada em 3400 cm^{-1} refere-se ao modo vibracional do grupo hidroxila. A banda situada em 2900 cm^{-1} relaciona-se às vibrações simétricas e assimétricas do grupo CH_2 , assimétrica do grupo CH_2OH e a deformação axial assimétrica da ligação C-H dos grupos metílicos. Entre 2600 cm^{-1} e 1700 cm^{-1} os compostos de celulose e hemicelulose não apresentam bandas significativas. A banda em 1640 cm^{-1} refere-se à água adsorvida e a ligação O-H do grupo carbonil. Em aproximadamente 1370 cm^{-1} e 1315 cm^{-1} as bandas referem-se às deformações nas ligações CH e CH_2 respectivamente. Bandas entre 1175 e 1000 cm^{-1} são referentes à deformação das ligações C-O, C-C, C-OH e C-O-C. Em 895 cm^{-1} a

banda refere-se à vibração da ligação CH₂ (BURANOV; MAZZA, 2010; CHAKER et al., 2013; MAGATON; PILO-VELOSO; COLODETTE, 2008; QUA et al., 2011).

No número de onda em torno 1429 cm⁻¹ uma banda é formada no espectro do filme de nanocelulose da PB correspondente à deformação em ligações CH presentes em carboidratos e da ligação CH₂, não sendo observada no espectro do filme da PT. Na imagem ampliada (FIGURA 27B) foi possível observar a ausência da banda em 1245 cm⁻¹ no espectro do filme da PT, referente à ligação C-O típica das xilanas, e o surgimento da banda em 1263 cm⁻¹ referente ao estiramento do grupo C-O-C. A ausência de algumas ligações típicas de hemiceluloses reafirma a redução da concentração das polioses no filme (BURANOV; MAZZA, 2010; CHAKER et al., 2013; MAGATON; PILO-VELOSO; COLODETTE, 2008; QUA et al., 2011).

4.4.4. Análise térmica por termogravimetria (TGA) e análise termogravimétrica derivada (DTG)

Para o uso das membranas como curativo em queimaduras é necessário o processo de esterilização do material antes do contato com a ferida, evitando a propagação de micro-organismos que afetam a cicatrização e geram infecções. O processo de esterilização é comumente realizado pelo método de vapor saturado em autoclaves a 121 °C. As análises térmicas permitem avaliar se em elevadas temperaturas, como no caso do processo de esterilização, ocorre degradação do material.

As curvas termogravimétricas (TGA) representam a massa residual, em função da temperatura, enquanto as curvas DTG correspondem à derivada primeira das curvas TGA e apresentam a variação da massa em relação ao tempo, registradas em função da temperatura.

O filme da suspensão da polpa bruta apresentou o perfil de termograma conforme FIGURA 28, o primeiro evento térmico é atribuído à evaporação da água adsorvida no filme na faixa de 100 °C. A degradação térmica da

holocelulose ocorreu entre 284 e 382 °C, com taxa máxima de perda em 351 °C. Após 600° C apresentou resíduo sólido de 10 %.

A degradação térmica da celulose ocorre em temperaturas compreendidas entre 315 e 400 °C. As hemiceluloses por serem polímeros amorfos, de baixo peso molecular apresentam temperatura de degradação inferiores à da celulose, na faixa de 190 e 360 °C (PEREIRA et al., 2013; ZHU et al., 2014). O filme da polpa bruta é composto por celulose e hemicelulose, o que indica uma degradação térmica na faixa de temperatura combinada entre os dois compostos.

FIGURA 28 - TGA E DTG DO FILME DA PB

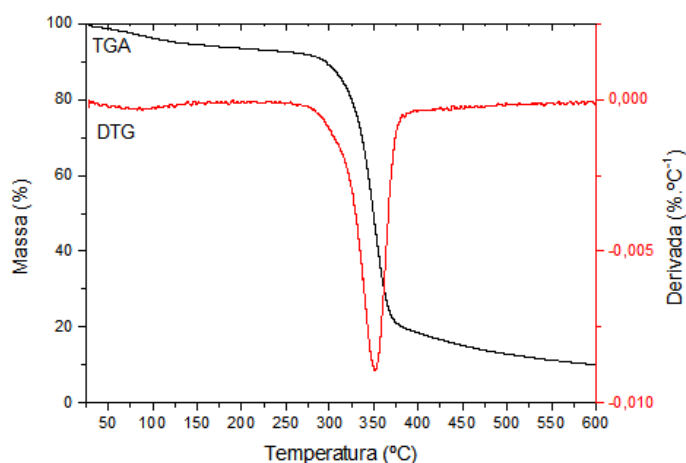
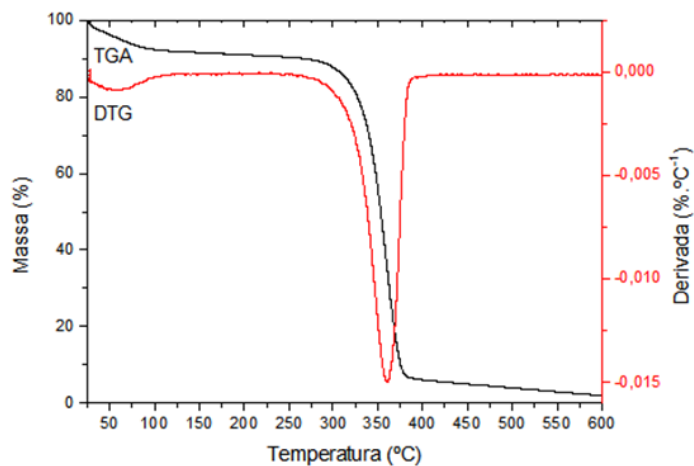


FIGURA 29 - TGA E DTG DO FILME DA PT



O filme obtido da polpa tratada após a extração da hemicelulose em meio básico também apresentou evento térmico em aproximadamente 100 °C atribuído a evaporação da água adsorvida no filme. Apresentou maior estabilidade térmica em relação ao filme de holocelulose, com pico de DTG em 360 °C degradação térmica entre 285 e 387 °C (FIGURA 29). Após 600 °C apresentou resíduo de 1,9 % de massa.

A hemicelulose possui estrutura amorfa e ramificada, constituída por diversos sacarídeos que são facilmente removidos da estrutura, sofrem degradação em temperaturas inferiores à da celulose, sendo o primeiro composto a se degradar (QUA et al., 2011). A remoção parcial da hemicelulose que inicia o processo de degradação a temperaturas mais baixas que a celulose, resultaram no aumento da temperatura do pico da degradação térmica.

Ambos os filmes de nanocelulose não apresentam degradação térmica na temperatura do processo de esterilização pelo método de vapor saturado em autoclaves a 121 °C, portanto podem futuramente serem esterilizados por este método para a aplicação como curativo sem sofrer degradação durante o processo.

4.4.5. ENSAIOS FÍSICOS

4.4.5.1. Espessura, gramatura e umidade

Os resultados da espessura, gramatura e umidade dos filmes da polpa bruta e da polpa tratada são apresentados na TABELA 6.

TABELA 6 - ESPESSURA, GRAMATURA E UMIDADE DOS FILMES DA PB E DA PT

Amostra	Espessura (µm)	Gramatura (g.m ⁻²)	Umidade (%)
FPB40	45 ± 3 a	40 ± 2 a	1,3 a
FPB50	45 ± 6 a	44 ± 3 a	1,4 a
FPT40	(8 ± 1).10 b	41 ± 3 a	1,0 b
FPT50	(9 ± 2).10 c	50 ± 4 b	1,4 a

A espessura dos filmes formados pelas nanofibrilas da polpa bruta foi consideravelmente menor que dos filmes da polpa tratada. A presença da hemicelulose no processo de desfibrilação mecânica permitiu uma maior ligação e melhor rearranjo das nanofibrilas, formando uma estrutura mais uniforme e compacta, reduzindo a espessura do filme. Nos filmes da polpa tratada a coalescência das nanofibrilas faz com que a superfície do filme não seja uniforme e compacta apresentando maior espessura.

No processo de obtenção dos filmes da polpa bruta ocorreu uma maior perda das nanofibrilas, os filmes com gramatura esperada de 50 g/m² apresentaram gramatura real de 44 g/m². O processo de obtenção dos filmes da polpa tratada apresentou uma perda de nanofibrilas menor, filmes com gramatura esperada de 50 g/m² apresentaram gramatura real de 50 g/m², porém apresentaram um desvio padrão maior que dos filmes da polpa bruta. Até a gramatura esperada de 40 g/m² não ocorreu perda de nanofibrilas, atingindo a gramatura esperada.

As amostras de filme da polpa bruta apresentaram umidade média de 1,3% para gramatura de 40 g/m² e 1,4% para gramatura de 50 g/m². Os filmes da polpa tratada apresentaram umidade média de 1,0% para gramatura de 40 g/m² e 1,4% para gramatura de 50 g/m².

4.4.5.2. Densidade aparente, Cobb e Gurley

A TABELA 7 apresenta os valores médios e desvio padrão da densidade aparente, absorção de água (Cobb) e permeância ao ar (Gurley) dos filmes obtidos da suspensão de nanofibrilas da polpa bruta e da polpa tratada.

TABELA 7 - DENSIDADE APARENTE, COBB E GURLEY DOS FILMES DA PB E DA PT

Amostra	Densidade Aparente (g.cm ³)	Cobb (g.m ⁻²)	Gurley (s.100cm ³)
FPB40	0,90 ± 0,04 a	63 ± 9 a	0
FPB50	0,9 ± 0,1 a	34 ± 5 b	0
FPT40	0,6 ± 0,1 b	(13 ± 2).10 c	(20 ± 9).10 a
FPT50	0,8 ± 0,1 b	(13 ± 2).10 c	(4 ± 1).100 b

Os filmes obtidos da suspensão da polpa bruta apresentaram maior densidade aparente, que está relacionada com a menor porosidade apresentada. Quanto mais compactadas as nanofibrilas maior o número de ligações de hidrogênio e mais denso o filme.

Os valores de densidade aparente encontrados para os filmes da suspensão da polpa bruta são semelhantes a relatados por outros autores. VIANA, 2013 produziu filmes com densidade aparente de 1,13 g/cm³. SPENCE, K.; VENDITTI, R.; HABIBI, Y.; ROJAS, O.; PAWLAK, 2010 encontraram densidade de 0,83 g/cm³ e STELTE, W.; SANADI, 2009 encontraram densidade de 1 g/cm³.

Os menores valores de densidade aparente encontrados para os filmes obtidos da suspensão da polpa tratada estão relacionados à grande porosidade apresentada na morfologia dos filmes. A estrutura menos compacta diminui a interação entre as fibras o que leva a uma menor densidade e conseqüentemente menor rigidez ao filme.

A absorção de água determinadas pelo método Cobb dos filmes obtidos da suspensão da polpa bruta estatisticamente apresentaram valores diferentes para as gramaturas de 40 g/m² e 50 g/m². A estrutura compacta e pouco porosa reduz a capacidade de penetração da água (DUFRESNE, 2012). Um maior número de fibrilas devido a maior gramatura, 50 g/m², gera filmes mais compactos, com menor porosidade devido à maior área de contato das fibrilas e maior interação entre elas, o que leva a uma menor capacidade de penetração da água e menor absorção de água em relação ao filme de menor gramatura de 40 g/m².

Os filmes obtidos da suspensão da polpa tratada possuem grande porosidade o que permite maior penetração e retenção da água e conseqüentemente maior absorção de água determinada pelo método Cobb.

Os filmes obtidos da suspensão da polpa bruta ultrapassaram o tempo máximo determinado pela Norma T460-om02 para a permeabilidade ao ar, portanto foram considerados como não permeáveis a passagem do ar (TECHNICAL ASSOCIATION OF THE PULP AND PAPER INDUSTRY, 2002b). A morfologia compacta, muito densa e pouca porosa cria uma resistência à passagem do ar, entretanto a ausência da hemicelulose gera grandes cavidades na morfologia dos filmes da PT que permitem a passagem do ar após determinado tempo.

Filmes de nanofibrilas de celulose são conhecidos pelas suas grandes propriedades de barreira, atuando como excelente barreira para o oxigênio gasoso (NECHYPORCHUK; BELGACEM; BRAS, 2015). VIANA, 2013 encontrou dados similares para filmes obtidos de polpa não-deslignificadas e polpa deslignificadas.

4.4.6. Resistência à tração e resistência ao arrebentamento

A TABELA 8 apresenta os valores médios e os respectivos erros padrões das propriedades de resistência à tração e ao arrebentamento dos filmes obtidos da suspensão de nanofibrilas da polpa bruta e da polpa tratada.

TABELA 8 - RESISTÊNCIA À TRAÇÃO E RESISTÊNCIA AO ARREBENTAMENTO DOS FILMES DA PB E DA PT

Amostra	Resistência à Tração (MPa)	Resistência ao arrebentamento (KPa)
FPB40	47 ± 6 a	(40 ± 2).10 a
FPB50	63 ± 2 b	(58 ± 3).10 b
FPT40	11 ± 1 c	(8 ± 1).10 c
FPT50	10,4 ± 0,7 c	117 ± 8 d

Os filmes obtidos da desfibrilação mecânica da polpa bruta apresentaram resistência à tração estatisticamente maiores que da polpa tratada, além do aumento na gramatura gerar maior resistência à tração nestes filmes. Os filmes obtidos da suspensão da polpa tratada com gramaturas de 40 e 50 g/m² estatisticamente apresentaram similar resistência à tração.

O índice de cristalinidade e o perfil cristalográfico influenciam as propriedades mecânicas. O FPB é formado apenas por celulose I enquanto o FPT é um híbrido de celulose I e II, sendo que a celulose II possui resistência à tração menor que a celulose cristalina I (LENGOWSKI et al., 2013; ZHU et al., 2014).

O mesmo ocorre para a resistência ao arrebentamento, a presença da hemicelulose nos FPB resulta em uma maior resistência ao arrebentamento em comparação aos FPT. As propriedades mecânicas dependem das ligações interfibras, sendo que os filmes porosos possuem um número menor de ligações interfibras e índices de resistências mecânicas menores.

MOLIN; TEDER, 2002 relataram a importância da presença da hemicelulose na resistência do papel proveniente da polpa celulósica. Folhas com maior teor de hemicelulose apresentaram maior rigidez e resistência a tração.

A polioses na superfície das fibras da polpa aderem às fibras no filme, inibindo a deformação. Portanto, as hemiceluloses contribuem para a adesão entre as nanofibrilas no estado seco, levando a uma melhora na rigidez e resistência (IWAMOTO; ABE; YANO, 2008).

Filmes de nanocelulose fibrilada formados por fibras de largura entre 10 - 100 nm apresentam resistência à tração entre 30 – 155 MPa, enquanto filmes de nanocelulose composto por fibras de largura entre 4 - 20 nm apresentam resistência entre 96 – 240 MPa (MOON et al., 2011).

Nanopapel com diferentes porosidades apresentam diferentes propriedades mecânicas. O maior número de poros gera uma menor resistência à tração (ZHU et al., 2014).

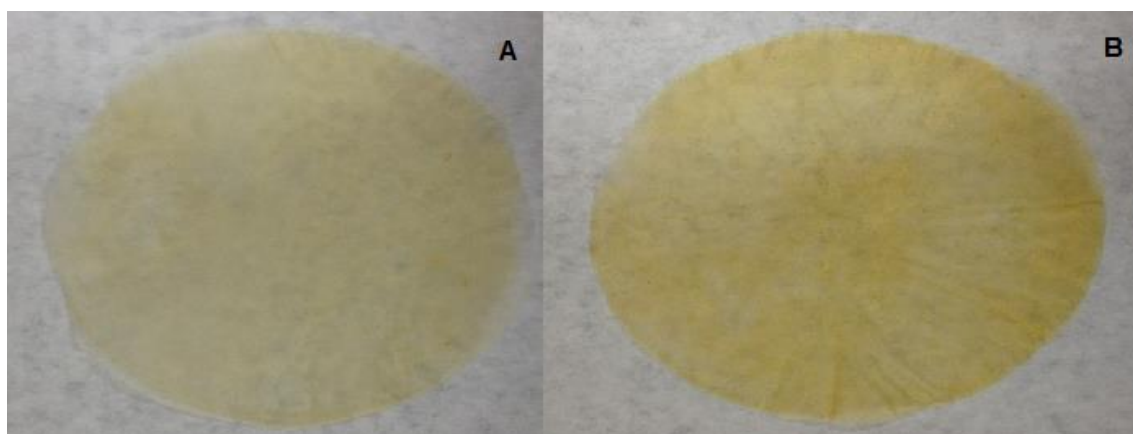
Os filmes de nanocelulose obtidos a partir da polpa bruta apresentaram resultados de resistência à tração de 47 – 62 MPa semelhantes aos citados por RANI; UDAYASANKAR; APPAIAH, 2011 para a celulose bacteriana com resistência à tração de 41 MPa.

Os filmes obtidos da suspensão da polpa tratada apresentaram valores de resistência a tração inferiores ao da polpa bruta, dificultando os testes de impregnação e deposição de agente cicatrizante e bacteriostático, e os testes de aplicação *in vivo*. Portanto os resultados apresentados em sequência são referentes apenas aos filmes obtidos da suspensão da polpa bruta.

4.5. OBTENÇÃO DOS FILMES DE NANOCELULOSE COM ÓLEO ESSENCIAL DE CALÊNDULA

Foram obtidos filmes de nanocelulose com 5 e 10 % (m:m) de óleo essencial de calêndula. Os filmes apresentaram aspecto homogêneo (FIGURA 30) e coloração amarela devido à presença de carotenoides no óleo essencial. Os carotenoides são um grupo de pigmentos presentes na natureza, responsáveis pelas cores do amarelo ao vermelho em flores, frutas e vegetais, além de apresentarem ação antioxidante, antifúngica e antimicrobiana (UENOJO; MARÓSTICA; PASTORE, 2007).

FIGURA 30 - FILMES IMPREGNADOS COM ÓLEO ESSENCIAL DE CALÊNDULA. A) 5% ÓLEO ESSENCIAL DE CALÊNDULA, B) 10% ÓLEO ESSENCIAL DE CALÊNDULA



FONTE: O AUTOR 2017

4.6. CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES DE NANOCELULOSE COM ÓLEO ESSENCIAL DE CALÊNDULA

4.6.1. Quantificação do óleo essencial de calêndula depositado ao filme

A quantificação da concentração do óleo essencial de calêndula real depositado ao filme de nanocelulose foi calculada pela extração do óleo do filme pelo método de extração contínua com solvente.

Os filmes de nanocelulose com 5 % (m) de óleo essencial de calêndula apresentaram uma concentração real média de $(2,4 \pm 0,3)$ %, portanto uma perda de 52,8 % do óleo durante o procedimento de obtenção dos filmes.

Os filmes com concentrações esperadas de 10 % (m) de óleo essencial de calêndula em relação à massa de celulose apresentaram concentração real média de $(5,3 \pm 0,3)$ %, ou seja, uma perda de 47,5 % do óleo durante o procedimento de obtenção dos filmes.

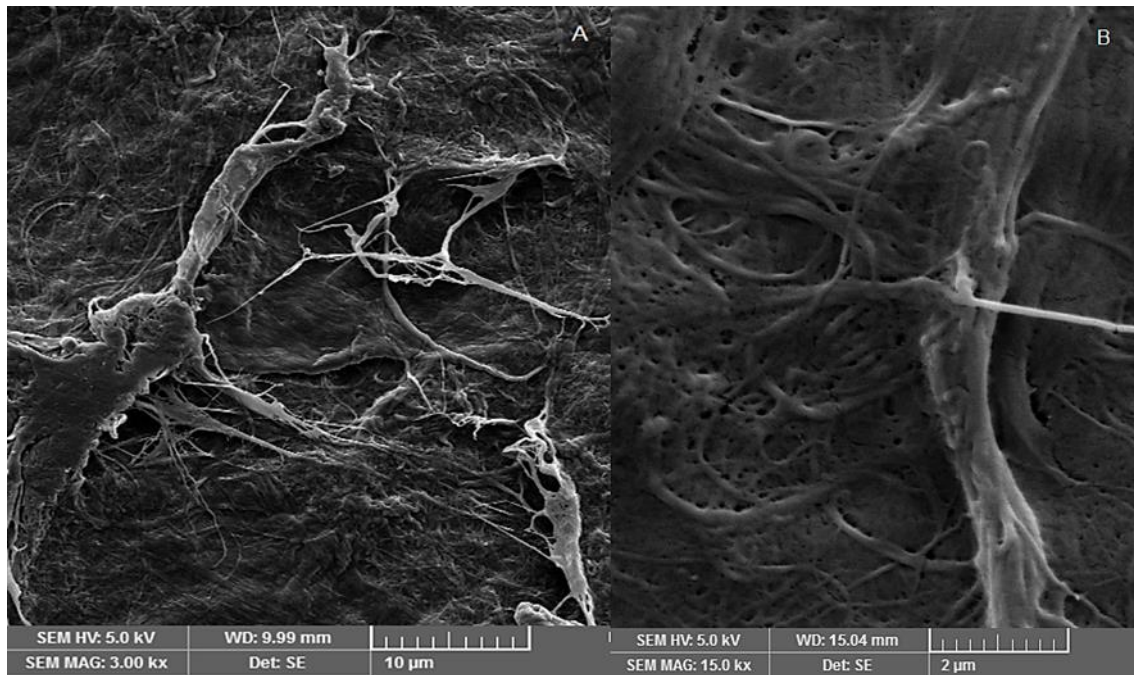
O óleo essencial de calêndula é um composto apolar e o meio de obtenção dos filmes foi água. Compostos apolares forçam as moléculas de água a assumirem conformações energeticamente desfavoráveis na interface soluto-solvente, sendo energeticamente desfavorável: compostos apolares não interagem com a água. A ausência de interações moleculares entre água e óleo evitou a perda do óleo durante o processo de filtração. Entretanto durante a etapa de homogeneização a presença de um grande volume de água, ou seja, de um grande número de moléculas de água hidratando a superfície da fibrila de celulose dificultou a interação das moléculas do óleo com as fibrilas de celulose, que conseqüentemente causou a perda de massa do óleo que não estava impregnado nas fibrilas de celulose.

4.6.2. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Os filmes de nanocelulose impregnados com óleo essencial de calêndula foram submetidos à Microscopia Eletrônica de Varredura para análise da morfologia das nanofibrilas na presença do óleo.

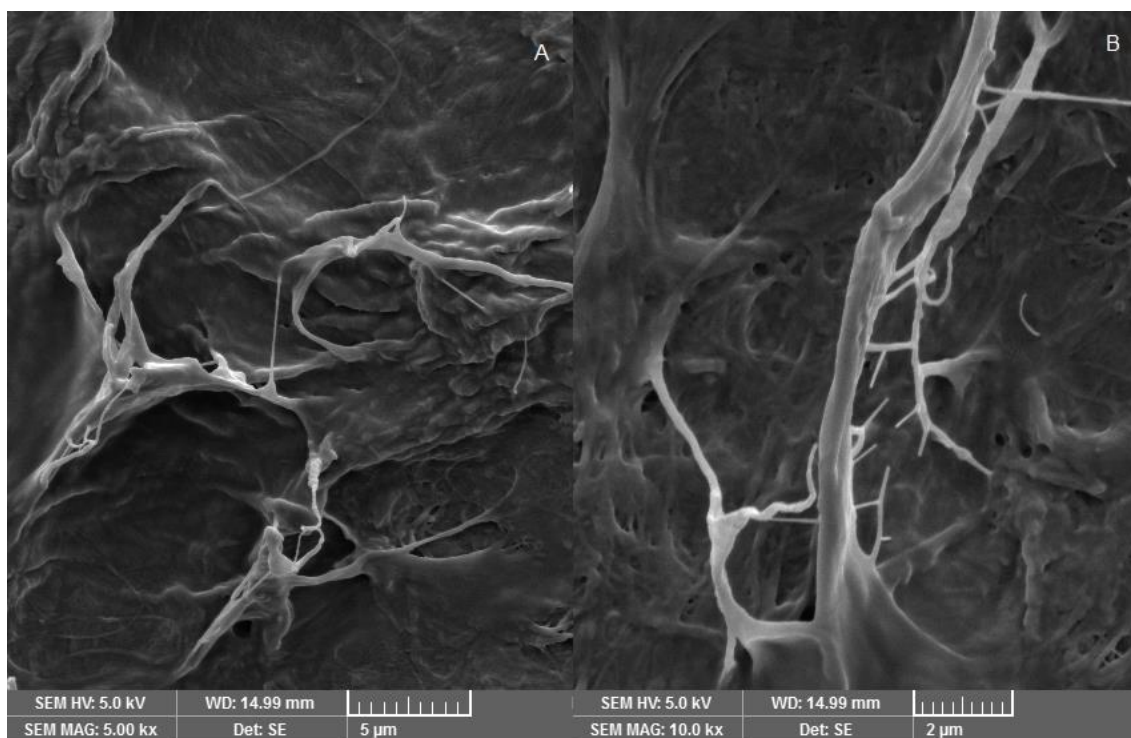
A FIGURA 31 apresenta a micrografia do filme de nanocelulose impregnado com 5% de óleo essencial de calêndula com magnificações de 3 kX e 15 kX respectivamente.

FIGURA 31 - MICROGRAFIA DO FILME DE NANOCELULOSE IMPREGNADO COM 5% DE ÓLEO DE CALÊNDULA A) MAGNIFICAÇÃO 3 kX B) MAGNIFICAÇÃO 15 kX



A FIGURA 32 mostra as micrografias do filme de nanocelulose impregnado com 10 % de óleo de calêndula nas magnificações de 5 kX e 10 kX respectivamente.

FIGURA 32 - MICROGRAFIA FILME DE NANOCELULOSE IMPREGANADO COM 10 % DE ÓLEO DE CALÊNDULA A) MAGNIFICAÇÃO 5 kX B) MAGNIFICAÇÃO 10 kX

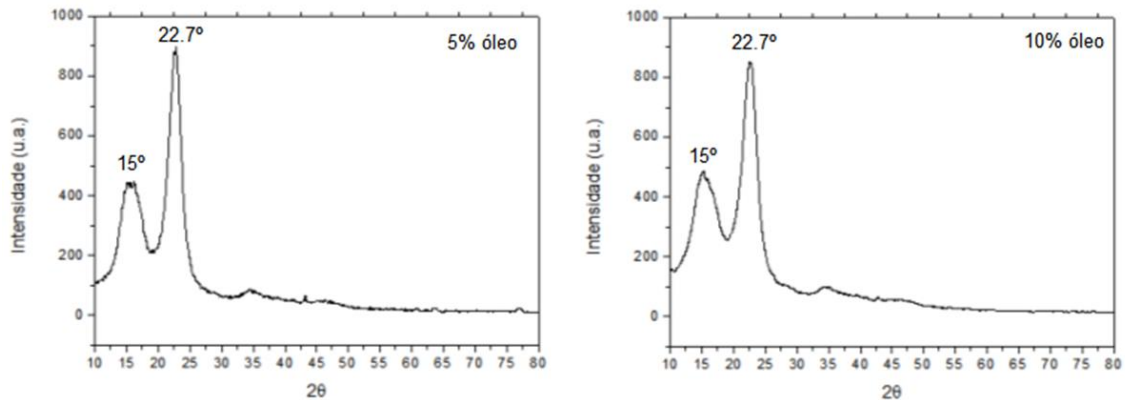


As micrografias de ambos os filmes de nanocelulose com adição de óleo de calêndula não apresentaram alteração nas nanofibrilas de celulose em relação ao filme puro. Após a adição do óleo o filme ainda apresenta as características de um filme denso e não poroso.

4.6.3. Difração de raios X

Os filmes de nanocelulose com óleo essencial de calêndula foram submetidos à análise de difração de raios-x para verificar se a presença do óleo essencial causaria alteração na estrutura cristalina da celulose. A FIGURA 33 apresenta os difratogramas dos filmes impregnados com 5 e 10 % de óleo essencial.

FIGURA 33 - DIFRATOGRAMA DE RAIOS X DOS FILMES COM 5% DE ÓLEO ESSENCIAL DE CALÊNDULA. B) 10 % DE ÓLEO ESSENCIAL DE CALÊNDULA



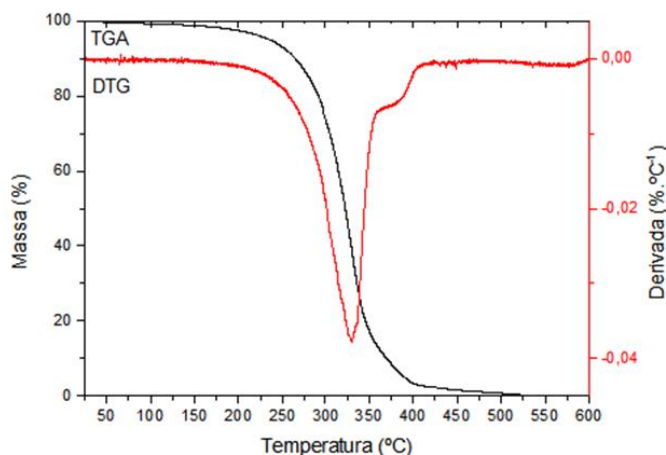
Foi possível observar que o óleo essencial de calêndula não gerou alterações na estrutura cristalina da celulose, os picos presentes no difratograma em aproximadamente 15 e 22 ° são referentes à celulose nativa I, como discutido na seção 4.4.2.

O óleo essencial é um composto amorfo, ou seja, não possui estrutura cristalina, portanto não produz um padrão de difração (SLAVOV et al., 2016).

4.6.4. Análise térmica por termogravimetria (TGA) e análise termogravimétrica derivada (DTG)

O perfil térmico observado para o óleo de calêndula (FIGURA 34) apresentou degradação térmica entre 206 e 410 °C com pico de DTG em 330 °C, não restando resíduo de massa após 600 °C.

FIGURA 34 - TGA e DTG ÓLEO ESSENCIAL DE CALÊNDULA



Segundo NUNES, 2008 o extrato liofilizado de calêndula apresenta degradação térmica entre 116 a 600 °C respectivo aos processos de decomposição da matéria orgânica (carboidratos, flavonóides entre outros), até formação do material carbonáceo. ZHANG, L.M.; ZHAO, X.; JI, J.J.; DAI, 2008 estudaram a decomposição da rutina do extrato de calêndula, que apresenta decomposição térmica entre 304 a 600 °C, ocorrendo perda de massa correspondente à eliminação dos complexos. SLAVOV et al., 2016 estudaram a pectina do extrato de calêndula e afirmam que o composto possui estabilidade térmica até 220 °C.

Os filmes impregnados com óleo de calêndula 5% apresentaram evento de degradação térmica entre 267 e 390 °C com pico de DTG em 353 °C (FIGURA 35). A menor estabilidade térmica do óleo de calêndula (FIGURA 34), em relação a holocelulose, afeta a estabilidade térmica do filme o que causa a redução no pico de DTG. Após 600 °C apresenta resíduo de massa de 12 %.

FIGURA 35 - TGA E DTG FILME IMPREGNADO COM 5% DE ÓLEO

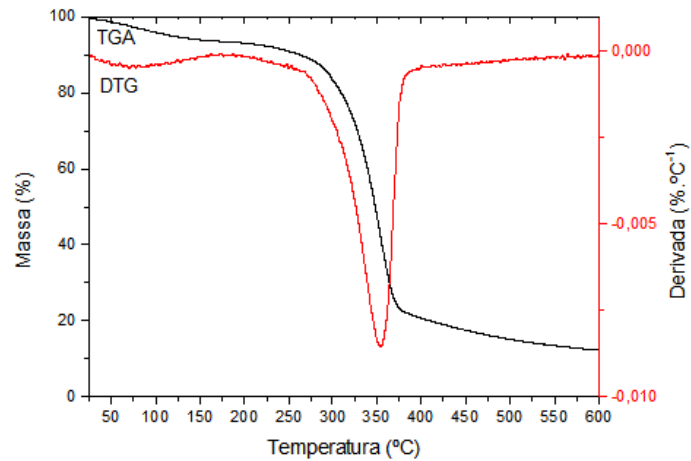
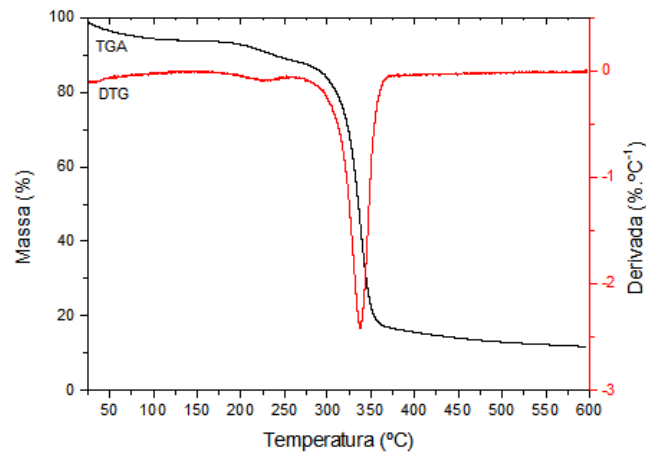


FIGURA 36 - TGA E DTG FILME IMPREGNADO COM 10 % DE ÓLEO



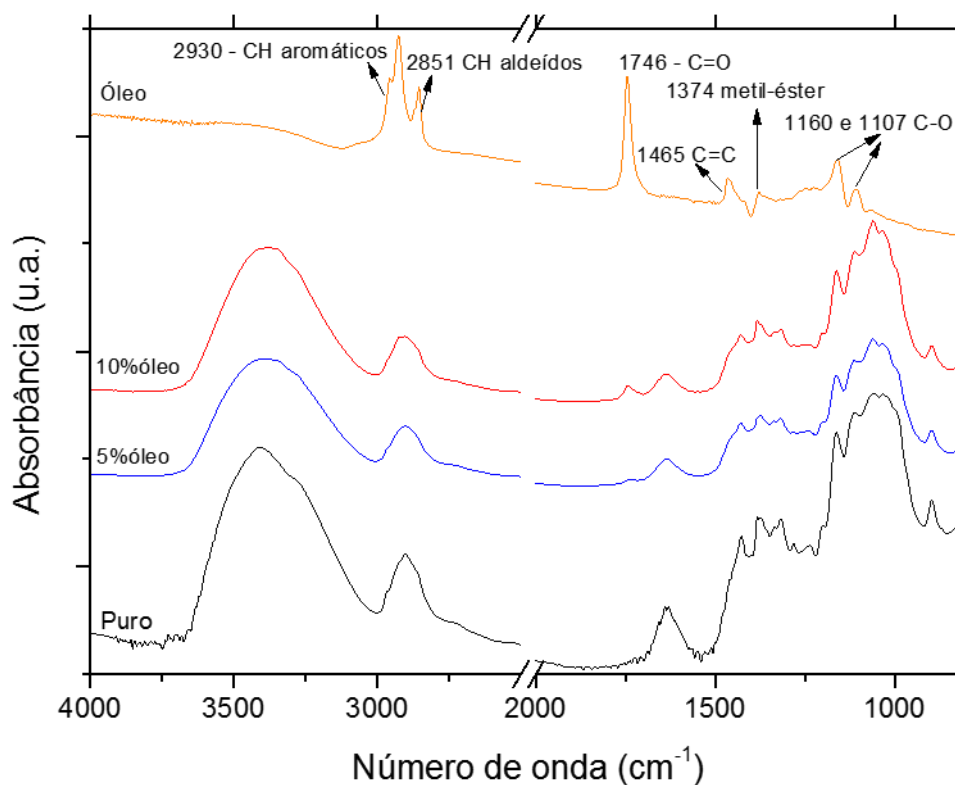
O mesmo ocorreu para o filme impregnado com 10 % de óleo de calêndula, uma maior redução na estabilidade térmica do filme devido à maior concentração do óleo que possui menor temperatura de degradação térmica. A degradação térmica do filme ocorreu entre 280 e 368 °C com pico de DTG em 337 °C e um resíduo de massa de 11,7 % após 600 °C (FIGURA 36).

4.6.5. Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier

A técnica de espectroscopia na região do infravermelho tem por objetivo determinar e identificar grupos funcionais característicos de compostos orgânicos, neste caso a celulose e o óleo essencial de calêndula.

O óleo essencial de calêndula (FIGURA 37 ESPECTRO A) apresentou bandas em 2930 cm^{-1} e 2851 cm^{-1} referentes a ligações CH de aromáticos e deformação axial assimétrica de CH alifáticos típicos de aldeídos respectivamente. Apresentou banda característica do óleo em 1746 cm^{-1} referente a banda de vibração de valência da ligação C=O. A banda em 1465 cm^{-1} é referente ao estiramento da ligação C=C do anel fenil e em 1374 cm^{-1} a deformação da ligação do grupo metil-éster. As bandas em 1160 e 1107 cm^{-1} são referentes às ligações C-O de ésteres (NUNES, 2008; SLAVOV et al., 2016).

FIGURA 37 - ESPECTRO DE FTIR A) ÓLEO ESSENCIAL DE CALÊNDULA, B) FILME COM 10 % DE ÓLEO, C) FILME COM 5 % DE ÓLEO, D) FILME DE NANOCELULOSE PURO



Os filmes de nanocelulose com 10 % e 5 % óleo de calêndula respectivamente (FIGURA 37) apresentaram bandas típicas do filme de nanocelulose (FIGURA 37) como a banda em 3400 cm^{-1} referente ao modo vibracional do grupo hidroxila. A banda situada em 2900 cm^{-1} relacionada às vibrações simétricas e assimétricas do grupo CH_2 e à deformação axial assimétrica da ligação C-H dos grupos metílicos. A banda em 1640 cm^{-1} referente à água adsorvida. Em aproximadamente 1370 cm^{-1} e 1315 cm^{-1} as bandas referentes às deformações nas ligações CH e CH_2 respectivamente. Bandas entre 1175 e 1000 cm^{-1} são referentes à deformação das ligações C-O, C-C, C-OH e C-O-C. Em 895 cm^{-1} a banda refere-se à vibração da ligação CH_2 (BURANOV; MAZZA, 2010; CHAKER et al., 2013; MAGATON; PILO-VELOSO; COLODETTE, 2008; QUA et al., 2011). As bandas 2930 cm^{-1} e 2851 cm^{-1} encontradas no espectro do óleo essencial, foram sobrepostas a banda 2900 cm^{-1} da celulose nos filmes de nanofibrila. O aumento da concentração do óleo no filme tornou a banda 1746 cm^{-1} , referente a banda de vibração de valência da ligação C=O, mais evidente afirmando não só a presença do óleo no filme, mas também o aumento da concentração do mesmo.

4.7. CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES DE NANOCELULOSE IMPREGNADOS COM NANOPARTÍCULAS DE PRATA

4.7.1. Quantificação de nanopartículas de prata sintetizadas no filme de nanocelulose

A concentração de prata compreendida na síntese das nanopartículas de prata nos filmes de nanocelulose foi determinada por espectrometria de emissão atômica com plasma.

Os filmes de nanocelulose impregnados com nanopartículas de prata sintetizadas a partir de 10 ppm de Ag_2O apresentaram uma concentração média de (32 ± 16) mg de prata por kg de nanocelulose. As NPs sintetizadas a partir de 35 ppm de Ag_2O apresentaram concentração média de (89 ± 3) mg por kg de celulose.

WU et al., 2014 sintetizaram NPs de prata pelo método do reagente Tollens em membranas de celulose bacteriana, para aplicação como curativo antibacteriano, e encontraram concentrações de 2,62% em massa de prata em relação à celulose bacteriana, determinado por espectrometria de emissão atômica.

A partir da gramatura conhecida de 20 g/m^2 dos filmes obtidos determinou-se a concentração de prata em 100 cm^2 dos mesmos apresentando concentração de $0,0064 \text{ mg/100 cm}^2$ e $0,0178 \text{ mg/100 cm}^2$ para comparação com os valores da TABELA 9 que lista os principais curativos à base de prata disponíveis no mercado e o conteúdo de prata de cada marca

TABELA 9 - CONTEÚDO DE PRATA EM CURATIVOS DISPONÍVEIS COMERCIALMENTE

Curativo Comercial	Conteúdo de Ag (mg/100cm ²)
Silverlon	546
Calgitrol Ag	141
Acticoat	105
Contreet Foam	85
Contreet Hydrocolloid	32
Aquacel Ag	8,3
SilvaSorb	5,3
Actisorb Silver 220	2,7
Arglaes powder	6,87 mg/g

FONTE: ADAPTADO DE THOMAS, 2004

Os filmes obtidos apresentam concentrações de prata muito inferiores aos curativos disponíveis comercialmente, sendo necessário o estudo da atividade antibacteriana dos filmes nestas concentrações.

Em escala micrométrica a prata causa efeito negativo para o ser humano conhecida como *Argyria*, um irreversível escurecimento da pele causado por contínuo e prolongado tratamento com prata. As nanopartículas encontram-se dispersas e em baixas concentrações que podem circular pelas membranas celulares sem ocasionar danos a organismos superiores, a concentração tóxica a seres humanos é de 14 µg/kg/dia (ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY-USA, 1987; NETO; RIBEIRO; ZUCOLOTTI, 2008). Para ser tóxica a prata precisa ser absorvida pelo corpo em quantidades suficientes para causar alterações num órgão principal (LANSDOWN; WILLIAMS, 2004). As concentrações de nanopartículas de prata obtidas nos filmes de nanocelulose não apresentam potenciais riscos ao organismo humano.

4.7.2. Liberação de nanopartículas de prata em água

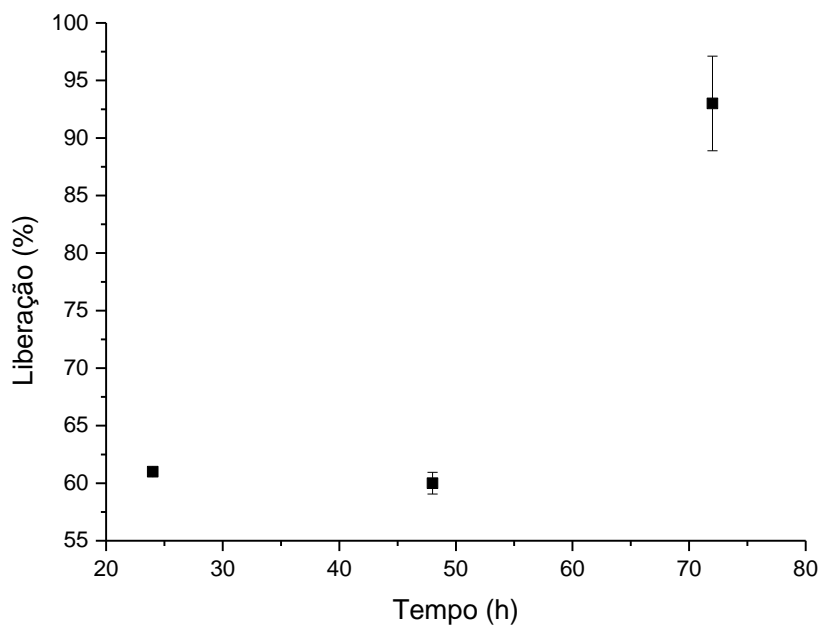
Para o uso do filme de nanocelulose impregnado com nanopartículas de prata como curativo em feridas é necessário umedecer a membrana para melhor

aderência ao ferimento. O ferimento libera exsudato, líquido com alto teor de proteínas séricas e leucócitos, produzido como reação a danos nos tecidos e vasos sanguíneos, mantendo o local úmido. A eficácia da ação da nanopartícula de prata está relacionada à liberação da prata no ferimento (LEITE, 2011).

As nanopartículas de prata foram sintetizadas diretamente na superfície das nanofibrilas de celulose, tornando-se necessário a investigação do comportamento das NPs em meio úmido em caso de aplicação em feridas, garantindo a eficácia do agente antibacteriano.

A FIGURA 38 apresenta o gráfico da concentração de prata liberada em água em relação ao tempo para 0,05 m² do filme de nanocelulose com concentração de (32 ± 16) mg/kg.

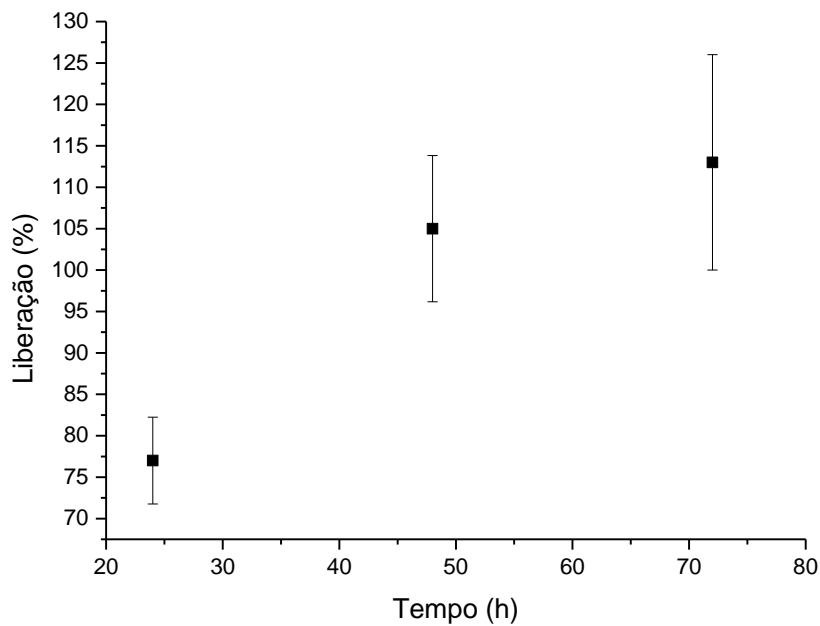
FIGURA 38 - LIBERAÇÃO DE PRATA DE 0,05 m² DA MEMBRANA 32 mg/kg NA ÁGUA EM FUNÇÃO DO TEMPO



Após 24 h o filme liberou 61% de prata em meio úmido, o que indica que se a ação bactericida depende da liberação do elemento, o filme apresenta potencial antibacteriano desde as primeiras horas de uso.

A FIGURA 39 apresenta o gráfico da concentração de prata liberada em água em relação ao tempo para 0,05 m² do filme de nanocelulose com concentração de (89 ± 3) mg /kg.

FIGURA 39 - LIBERAÇÃO DE PRATA DE 0,05 m² DA MEMBRANA 89 mg/Kg NA ÁGUA EM FUNÇÃO DO TEMPO



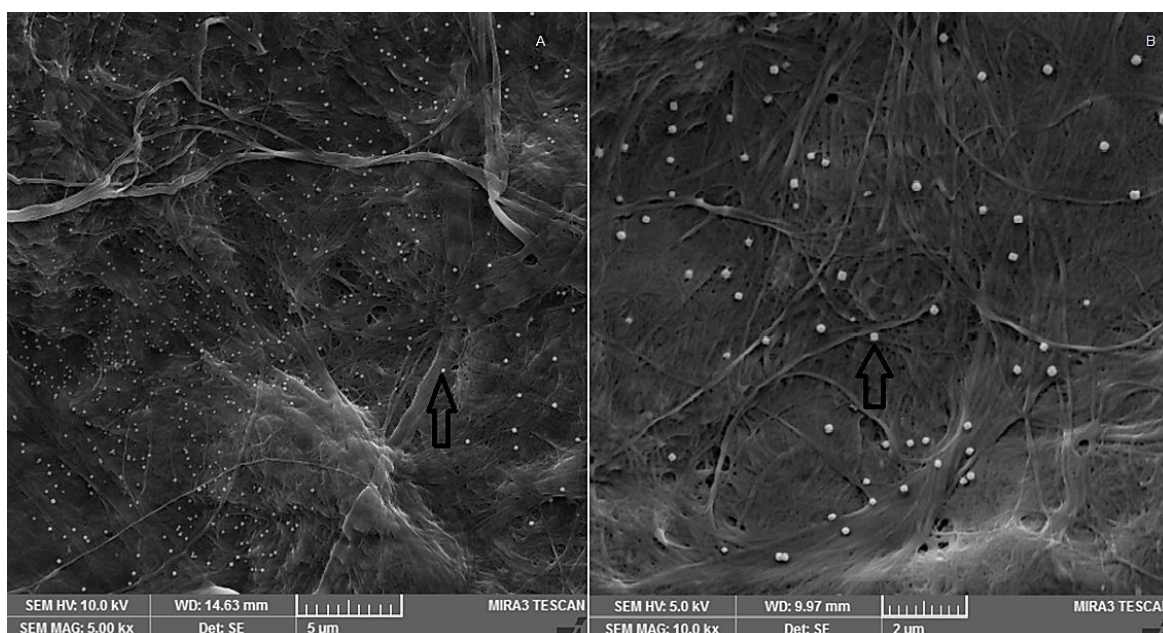
O filme de nanocelulose com maior concentração de prata libera 77% de prata nas primeiras 24 h, atingindo a liberação total da prata próximo a 48 h, portanto apresentando potencial antibacteriano desde as primeiras horas de uso.

É importante ressaltar que mesmo com a liberação da prata no ferimento o curativo não deve liberar toda a concentração de prata durante seu uso evitando a ausência de nanopartículas entre ferida e curativo que permitiria o crescimento de bactérias até a próxima troca.

4.7.3. Microscopia eletrônica de Varredura (MEV)

Através das micrografias (FIGURA 40) da microscopia eletrônica de varredura foi possível confirmar a deposição das nanopartículas de prata na superfície dos filmes de nanocelulose.

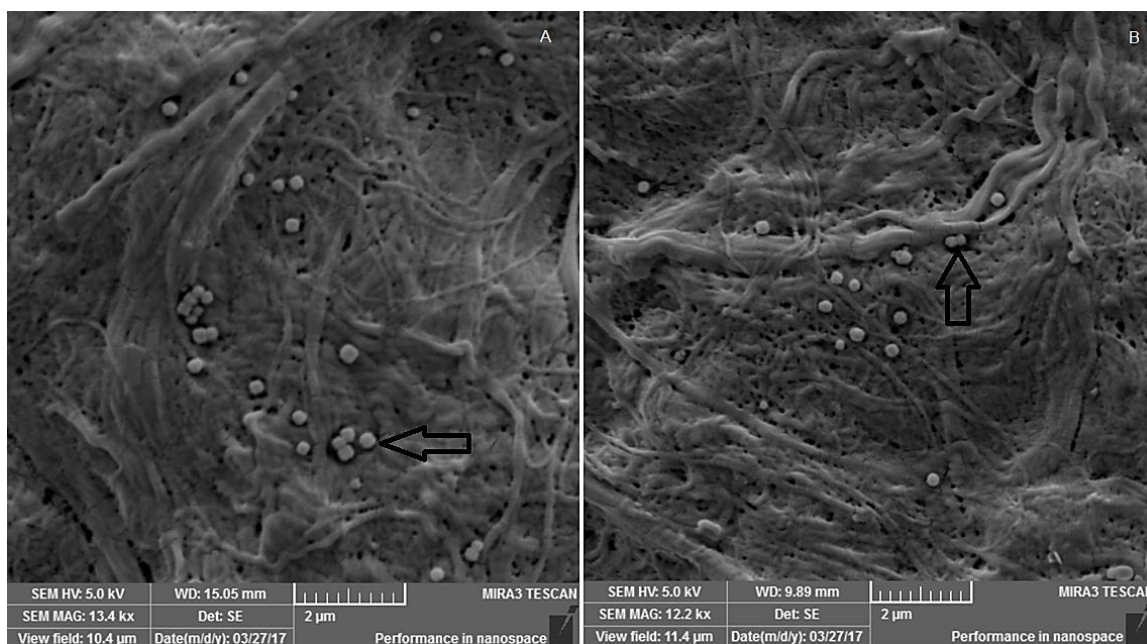
FIGURA 40 - MICROGRAFIA DOS FILMES DE NANOCELULOSE IMPREGNADOS COM 32 mg/kg DE PRATA A) MAGNIFICAÇÃO 5 kX B) MAGNIFICAÇÃO 10 kX



As nanopartículas de prata sintetizadas a partir de 10 ppm de Ag_2O apresentaram diâmetro variando entre 109 – 151 nm e forma cúbica, formato diferente do convencional esférico (MONTAZER et al., 2012a). A formação de nanopartículas cúbicas está relacionada à alta concentração de Ag_2O , onde ocorre uma rápida nucleação e conseqüentemente o rápido crescimento das partículas (CABALA, 2013).

As nanopartículas não permaneceram uniformemente dispersas por todo o filme, apesar de não ocorrerem nanopartículas aglomeradas entre si. A FIGURA 40 focaliza nas regiões concentradas, porém ocorreram regiões com menores concentrações de nanopartículas.

FIGURA 41 - MICROGRAFIA DOS FILMES DE NANOCELULOSE IMPREGNADOS COM 89 mg/kg DE PRATA A) MAGNIFICAÇÃO 13,4 kX B) MAGNIFICAÇÃO 12,2 kX



As nanopartículas de prata sintetizadas a partir de 35 ppm de Ag_2O apresentaram diâmetro variando entre 152 – 189 nm e majoritariamente em formato cúbico, devido à rápida nucleação. É possível observar na FIGURA 41 A e B que algumas NPs ficaram ligadas umas às outras, o que indica que a redução da prata ocorreu pelo mecanismo de autocatálise (MONTAZER et al., 2012a; NERSISYAN et al., 2003). Foi possível concluir que ao oposto do filme de 10 ppm, nesta concentração formaram-se NPs uniformemente distribuídas por toda superfície do filme. Nota-se que a maioria das NPs se formaram ancoradas em cavidades entre as fibrilas de celulose.

O processo de síntese das nanopartículas, apesar de ocorrer em meio básico, não danificou as fibrilas de celulose, permanecendo um filme denso e não poroso.

AS FIGURAS 42 e 43 apresentam os espectros pontuais de EDS das amostras dos filmes de nanocelulose impregnados com nanopartículas de prata a partir de 10 ppm e 35 ppm de Ag_2O respectivamente.

FIGURA 42 - ESPECTRO DE EDS DO FILME DE NANOCELULOSE IMPREGNADO COM 32 mg/kg DE PRATA

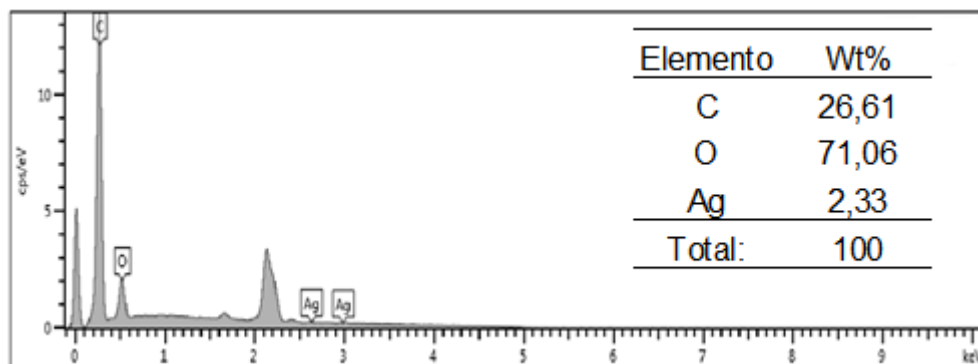
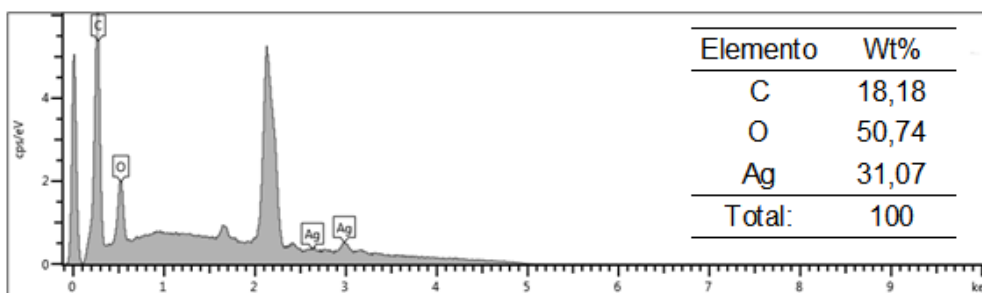


FIGURA 43 - ESPECTRO DE EDS DO FILME DE NANOCELULOSE IMPREGNADO COM 89 mg/kg DE PRATA



Os espectros confirmam a presença do elemento prata na superfície dos filmes de nanocelulose. O aumento da concentração da prata no meio de reação, resultou em partículas maiores e conseqüentemente num maior percentual mássico de prata.

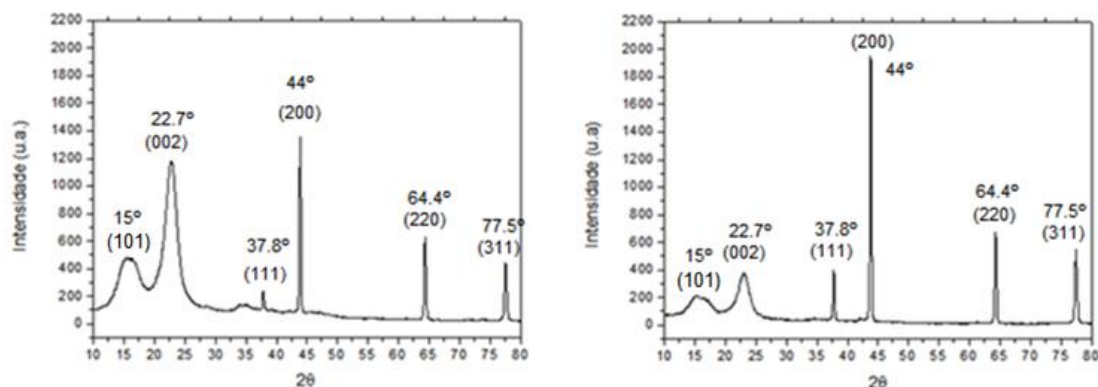
A presença do pico do elemento ouro no espectro é devido ao preparo de amostra necessário para a MEV, sendo sua massa desconsiderada no cálculo do percentual de massa dos elementos.

4.7.4. Difração de raios X

A FIGURA 44 A e B apresenta os difratogramas dos filmes de nanocelulose com deposição de nanopartículas de prata, sintetizados de 10 ppm e 35 ppm Ag_2O respectivamente. A análise de difração de raios X foi utilizada

para confirmar a formação das nanopartículas de prata e a sua estrutura cristalina.

FIGURA 44 - DIFRATOGRAMA DE RAIOS X DOS FILMES IMPREGNADOS COM NANOPARTÍCULAS DE PRATA A) 32 mg/kg B) 89 mg/kg



As duas amostras apresentaram os quatro picos característicos da prata metálica em $2\theta = 37,8^\circ$, $44,0^\circ$, $64,4^\circ$ e $75,5^\circ$ correspondentes aos planos cristalinos (111), (200), (220) e (311) da estrutura cúbica de face centrada (fcc), indicando a redução do reagente de Tollen para prata metálica. Resultados semelhantes foram encontrados por MONTAZER et al., 2012a na síntese de nanopartículas de prata em algodão e por MANEERUNG; TOKURA; RUJIRAVANIT, 2008 na impregnação de nanopartículas em celulose bacteriana.

À medida que a concentração de prata aumenta nos filmes de nanocelulose de 32 mg/kg para 89 mg/kg (FIGURA 44 A e B) os picos característicos da prata metálica se tornam mais intensos afirmando a presença de mais planos cristalinos (RODRIGUES, 2011).

Não apresentaram picos característicos do óxido de prata em $2\theta = 32,3^\circ$ e entre 50° e 60° , portanto o óxido de prata foi consumido na reação de formação das nanopartículas de prata, não restando resíduos detectáveis por esta técnica no filme de nanocelulose (BARUD et al., 2011; RODRIGUES, 2011).

A partir da técnica de difração de raios-X combinada com a Equação (2) de Scherrer é possível determinar o tamanho do cristalito de amostras

policristalinas, neste caso as nanopartículas de prata. (MUNIZ et al., 2016; UWE; NEIL, 2011)

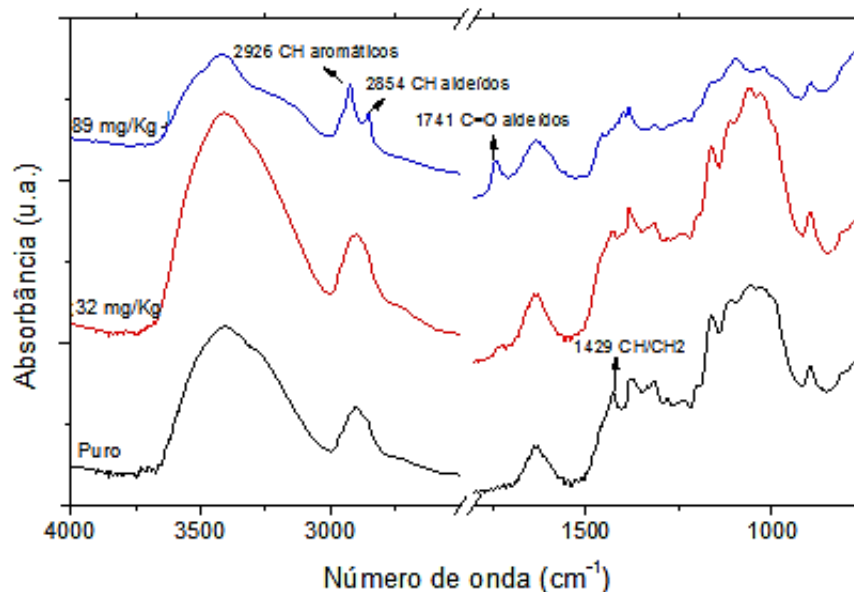
$$D = \frac{k \times \lambda}{B \times \cos\theta} \quad (2)$$

Onde k é um fator numérico referido como fator de forma do cristalito, sendo aproximadamente 0,9. O comprimento de onda do raio-X, λ em ângstrom. B é a largura na meia altura do pico de difração de raios-X em radianos, θ é o ângulo de Bragg e D é o tamanho do cristalito (MUNIZ et al., 2016; UWE; NEIL, 2011). A partir da equação de Scherrer, sendo $\lambda = 1,54 \text{ \AA}$, os cristalitos das nanopartículas de prata apresentaram tamanho médio de 30 nm para ambas as amostras de 32 e 89 mg/kg. Como observado nas micrografias as nanopartículas apresentam dimensão a partir de 100 nm, sendo assim cada nanopartícula de prata é formada por diversos cristalitos de 30 nm.

4.7.5. Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier

A FIGURA 45 apresenta o espectro de infravermelho das amostras de nanocelulose impregnadas com nanopartículas de prata e nanocelulose pura.

FIGURA 45 - ESPECTRO DE INFRAVERMELHO DOS FILMES IMPREGNADOS COM NANOPARTÍCULAS DE PRATA A) 89 mg/kg B) 32 mg/kg C) FILME DE NANOCELULOSE PURO



Os filmes de nanocelulose impregnados com nanopartículas de prata (FIGURA 45) apresentaram bandas características do filme de nanocelulose puro discutidos na seção 4.4.3.

A amostra de filme de nanocelulose impregnada com (89 ± 3) mg/kg de nanopartículas de prata apresentou bandas distintas em relação a outras duas amostras. Bandas em 2926 e 2854 cm^{-1} referentes a ligações CH de aromáticos e deformação axial assimétrica de CH alifáticos típicos de aldeídos respectivamente; uma banda definida em 1741 cm^{-1} referente à ligação C=O de grupamentos aldeídos; redução da banda em 1429 cm^{-1} devido à deformação em ligações CH e da ligação CH₂. Durante o processo de síntese das nanopartículas de prata deve ocorrer a oxidação da celulose pelo reagente de Tollen para posterior redução do elemento prata. A maior concentração do reagente de Tollen gera um maior número de oxidação das cadeias de celulose formando um maior número de grupamentos aldeídos no C6 devido à oxidação do grupo alcoólico primário resultando nas NPs Ag (MONTAZER et al., 2012a). Consequentemente, o maior número de grupamento aldeídos gera bandas em 2926 cm^{-1} , 2854 cm^{-1} e 1741 cm^{-1} referentes às ligações CO e CH de aldeídos.

4.7.6. Análise térmica por termogravimetria (TGA) e análise termogravimétrica derivada

Os filmes de nanofibrilas de celulose e 32 mg/Kg de nanopartículas de prata apresentaram degradação térmica entre 283 e 373 °C com pico de DTG em 342 °C (FIGURA 46). Portanto, menor estabilidade térmica em relação ao filme puro de nanofibrilas de celulose (FIGURA 48). Essa redução na estabilidade provavelmente está relacionada ao processo de síntese das nanopartículas, onde o meio básico reduz a interação entre as fibrilas, ou seja, dificultando as ligações de hidrogênio e diminuindo a estabilidade térmica. Após 600 °C apresentou resíduo de massa de 5%.

FIGURA 46 - TGA E DTG FILME DE NANOCELULOSE IMPREGNADO COM NANOPARTÍCULAS DE PRATA 32 mg/kg

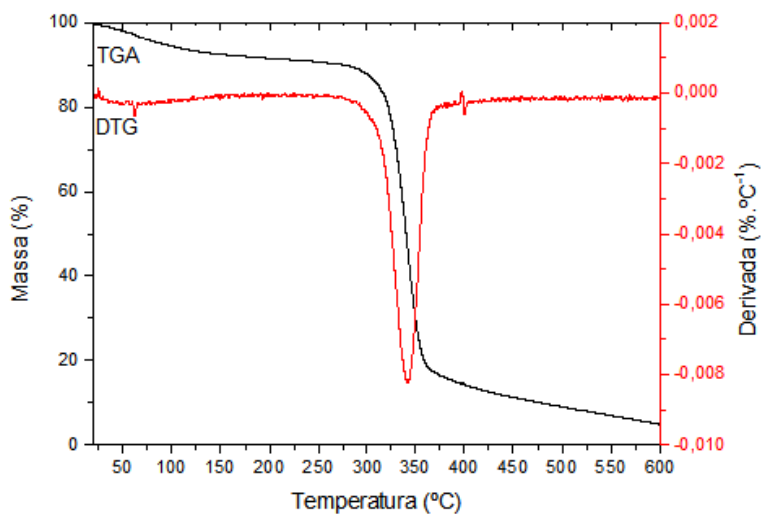


FIGURA 47 - TGA E DTG FILME DE NANOCELULOSE IMPREGNADO COM NANOPARTÍCULAS DE PRATA 89 mg/kg

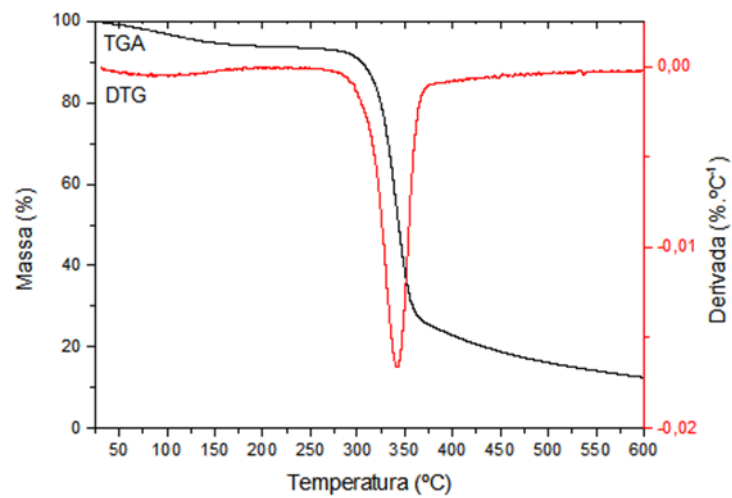
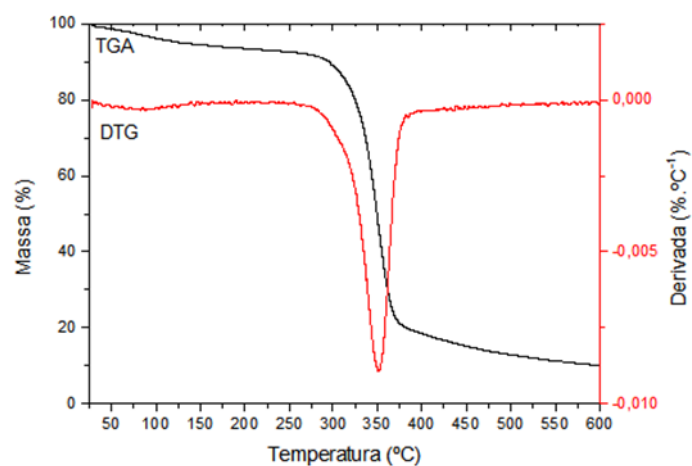


FIGURA 48 - TGA E DTA FILME DE NANOCELULOSE PURO



Os filmes com 89 mg/Kg de nanopartículas de apresentaram degradação térmica entre 287 e 371 °C com pico de DTG em 342 °C, e após 600 °C apresentaram resíduo de massa média de 12 % (FIGURA 47). O maior resíduo de massa está relacionado à presença do elemento inorgânico prata que não gera material carbonizado.

4.8.APLICAÇÃO COMO CURATIVO DO FILME DE NANOCELULOSE EM DORSO DE RATOS

Ao analisar as medidas de cicatrização das bordas crânio-caudal obtidas durante 30 dias de cada grupo, (TABELA 10) notou-se que o grupo da nanocelulose vegetal, apresentou medidas estatisticamente semelhantes ao grupo curativo comercial Membracel, sendo que os dois grupos apresentam melhor cicatrização quando comparados ao grupo sem curativo nos primeiros 14 dias, portanto acelerando a cicatrização nos dias iniciais. As diferenças estatísticas são representadas por a e b.

TABELA 10 - VALORES DE MÉDIA E DESVIO PADRÃO DAS MEDIDAS DE CICATRIZAÇÃO CRÂNIO-CAUDAL

	Crânio-Caudal			
	7 dias	14 dias	21 dias	30 dias
Sem curativo (mm)	19 ± 2 a	13 ± 3 a	8 ± 6 a	2 ± 4 a
Membracel (mm)	16 ± 2 b	9 ± 3 b	6 ± 5 a	2 ± 3 a
Nanocelulose vegetal (mm)	16 ± 1 b	10 ± 2 b	9 ± 2 a	5 ± 5 a

O sentido crânio-caudal apresenta maior tensão de pele, dificultando a cicatrização, quando comparado ao sentido látero-lateral.

Ao analisar as medidas de cicatrização das bordas látero-lateral obtidas (TABELA 11), o grupo da nanocelulose vegetal é estatisticamente semelhante ao curativo comercial apenas nos primeiros 7 dias, entretanto não apresenta diferença estatística com o grupo sem curativo nos 30 dias totais.

TABELA 11 - VALORES DE MÉDIA E DESVIO PADRÃO DAS MEDIDAS DE CICATRIZAÇÃO LÁTERO-LATERAL

	Látero-Lateral			
	7 dias	14 dias	21 dias	30 dias
Sem curativo (mm)	13 ± 4 a	7 ± 3 a	4 ± 3 a	2 ± 2 a
Membracel (mm)	10 ± 2 b	4 ± 1 b	2 ± 2 a	0,7 ± 0,9 a
Nanocelulose vegetal (mm)	12 ± 3 ab	7 ± 3 a	4 ± 2 a	2 ± 2 a

Quando comparado em conjunto todos os 30 dias dos três grupos, os grupos (1,2 e 3) não apresentam diferença estatística nas medidas de cicatrização tanto das bordas crânio-caudal quanto das bordas látero-lateral.

Ao analisar a dimensão média do ferimento (TABELA 12), média entre as medidas crânio-caudal e látero-lateral, o grupo da nanocelulose vegetal é estatisticamente semelhante ao grupo membracel e também ao grupo sem curativo.

TABELA 12 - VALORES DE MÉDIA E DESVIO PADRÃO DAS MEDIDAS DE CICATRIZAÇÃO DA DIMENSÃO MÉDIA DA FERIDA

	Dimensão média			
	7 dias	14 dias	21 dias	30 dias
Sem curativo (mm)	16 ± 3 a	10 ± 2 a	6 ± 5 a	2 ± 3 ^a
Membracel (mm)	13 ± 2 b	7 ± 2 b	4 ± 4 a	1 ± 2 a
Nanocelulose vegetal (mm)	14 ± 2 ab	9 ± 2 ab	7 ± 2 a	5 ± 3 a

Analisando as medidas de cicatrização a membrana de nanocelulose apresenta melhor eficiência nos primeiros 14 dias no sentido crânio-caudal assemelhando-se ao curativo comercial, podendo ser mais indicada no início do tratamento de feridas em locais com maior tensão de pele. A partir das medidas obtidas no 21^o dia os três grupos não apresentam diferença estatística tanto nas direções crânio-caudal, látero-lateral quanto na dimensão média da ferida.

FIGURA 49 - ÁREA DE CICATRIZAÇÃO DAS LESÕES AOS 7 DIAS A) SEM CURATIVO B) MEMBRACEL C) CELULOSE VEGETAL



Verificou-se que a membrana de celulose vegetal é de fácil aplicação e manuseio e apresenta durabilidade e boa aderência ao leito cruento. Não apresentou sinais de rejeição apesar do filme ser composto inclusive por hemiceluloses, sendo que a membrana comercial é composta apenas por celulose bacteriana, portanto não sendo necessário o processo de extração das polioses.

Os filmes obtidos da polpa tratada não foram testados *in vivo* por não apresentarem resistência mecânica adequada, não formando filmes na gramatura de 20 g/m².

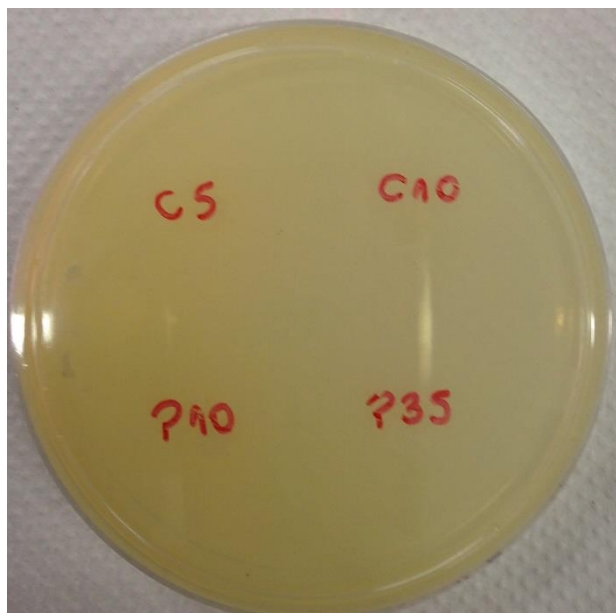
4.9. TESTE ANTIBACTERIANO DOS FILMES DE NANOFIBRILAS DE CELULOSE

Foram realizados testes microbiológicos com as bactérias *S.aureus* e *E.coli* para verificar a ação antibacteriana das nanopartículas de prata e do óleo essencial de calêndula adicionados aos filmes de nanocelulose.

4.9.1. Método de disco-difusão

As atividades antibacteriana dos filmes de nanocelulose puro, com 32 mg/kg (P10) e 89 mg/kg de nanopartículas de prata (P35) e com 5 (C5) e 10 % de óleo essencial de calêndula (C10) foram avaliadas pelo método de disco-difusão, entretanto nenhuma das amostras apresentou halo de inibição para as bactérias *S. aureus* e *E. coli* (FIGURA 50).

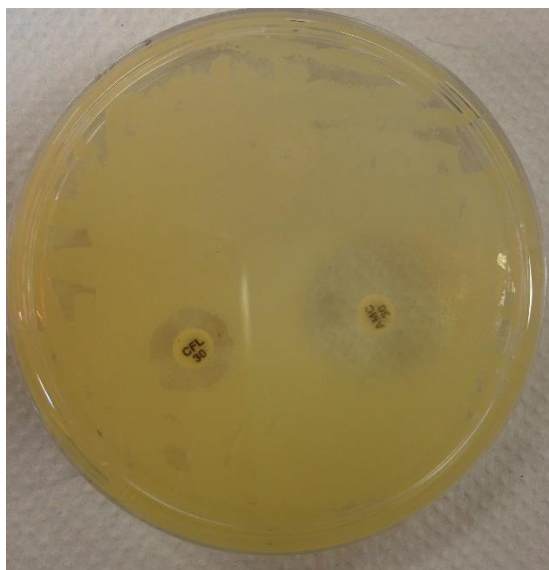
FIGURA 50 - PLACA DE DISCO-DIFUSÃO PARA *E.coli*



FONTE: O AUTOR 2017

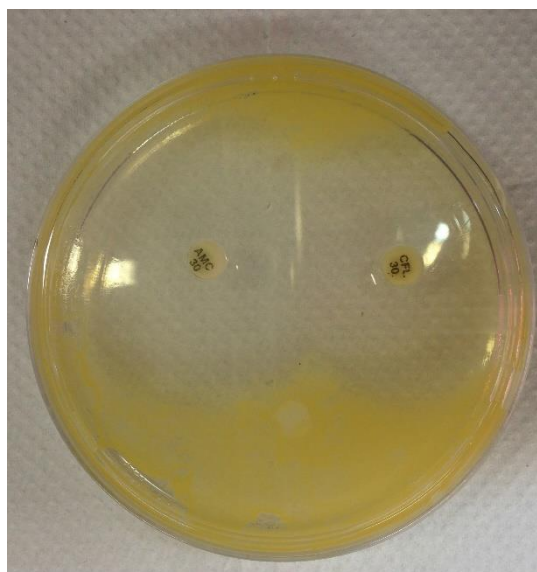
Os antibióticos utilizados como controle apresentaram halo de inibição para ambas as bactérias. A amoxicilina com ácido clavulânico apresentou diâmetro de 23 mm de inibição para *E.coli*, enquanto a cefalotina apresentou diâmetro de 14 mm (FIGURA 51), valores dentro do esperado para halos inibitórios para controle de qualidade conforme citado em LABORCLIN, 2011.

FIGURA 51 - PLACA DE DISCO-DIFUSÃO DE ANTIBIÓTICOS PARA *E.coli*



FONTE: O AUTOR 2017

Nas placas de disco-difusão da bactéria *S.aureus* os antibióticos apresentaram halo de inibição, porém entraram em região de conflito não sendo possível determinar o diâmetro de inibição específico de cada antibiótico para essa bactéria (FIGURA 52). Apesar de não ser determinado o halo de inibição de cada antibiótico, o controle apresentou inibição, enquanto as amostras não apresentaram inibição, portanto validando o procedimento.

FIGURA 52 - PLACA DE DISCO-DIFUSÃO PARA ANTIBIÓTICOS EM *S.aureus*

FONTE: O AUTOR 2017

MANEERUNG; TOKURA; RUJIRAVANIT, 2008 encontraram diâmetro de inibição de *E. coli* e *S.aureus* de 19 e 22 mm respectivamente para nanopartículas de prata com diâmetro entre 5 - 11 nm impregnadas em discos de 1,5 cm de celulose bacteriana. As nanopartículas de prata sintetizadas nos filmes de celulose vegetal apresentaram diâmetro entre 100 e 190 nm, portanto as dimensões das nanopartículas de prata podem estar afetando a ação antimicrobiana.

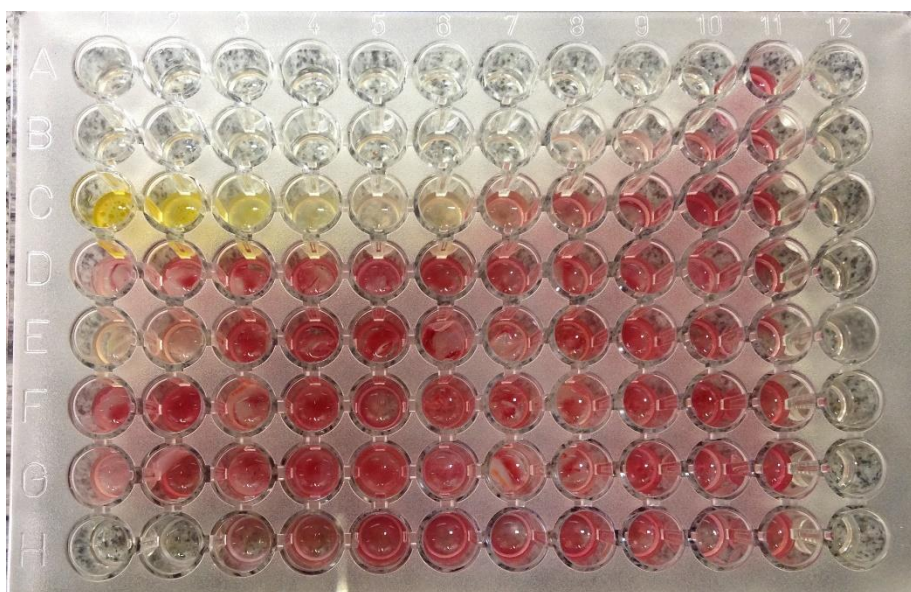
Para resultados complementares foi realizado o teste de microdiluição em caldo com as amostras dos filmes de nanocelulose, com nanopartículas de prata e óleo essencial de calêndula.

4.9.2. Microdiluição em caldo

Foram realizados testes de microdiluição em caldo para complementar os resultados dos testes de disco-difusão e determinar a concentração inibitória mínima (MIC), ou seja, a menor concentração do antimicrobiano capaz de inibir o desenvolvimento do microrganismo.

Para as microplacas inoculadas com *S.aureus* o antibiótico AMX apresentou MIC de 0,125 mg/L e o CFX de 0,5 mg/L. O controle do solvente DMSO apresentou MIC de 62,5 mL/L. O óleo essencial de calêndula diluído em DMSO apresentou MIC de 3,75 mL/L. A presença do solvente DMSO na diluição do óleo não afeta o resultado pois a concentração do solvente no ponto de determinação do MIC do óleo é inferior ao MIC do mesmo, ou seja, o DMSO não apresenta ação inibitória na concentração de determinação do MIC do óleo. Os filmes de nanocelulose pipetados com óleo essencial de calêndula diluído em DMSO apresentaram MIC de 12 mL/L (de óleo). Os filmes de nanocelulose pura, com nanopartículas de prata 32 e 89 mg/kg e óleo de calêndula 5 e 10% não apresentaram atividade antibacteriana (FIGURA 53).

FIGURA 53 - MICRODILUIÇÃO EM CALDO PARA *S.aureus*



FONTE: O AUTOR 2017

Para a microdiluição em caldo do inóculo *E.coli* o antibiótico AMX apresentou concentração inibitória mínima de 16 mg/L, enquanto o CFX apresentou MIC de 32 mg/L. O óleo essencial de calêndula diluído em DMSO apresentou MIC de 30 mL/L de óleo, sendo que o DMSO apresentou MIC de 62,5 mL/L. Os filmes de nanocelulose pura, com nanopartículas de prata e óleo de calêndula nas duas concentrações testadas, e os filmes pipetados com óleo essencial de calêndula não apresentaram atividade antibacteriana.

Bactérias gram positivas (*S.aureus*) apresentam parede celular simples, sendo mais permeáveis que as estruturas das bactérias gram negativas (*E.coli*) que apresentam parede celular mais complexa e resistente, portanto as paredes celulares de bactérias gram positivas permitem maior passagem de compostos ao seu interior (ABCMED, 2014). A estrutura mais permeável da *S.aureus* permitiu que maiores concentrações de óleo de calêndula penetrassem no interior das células, possibilitando maior eficiência da ação antibacteriana e apresentando um menor valor de MIC (3,75 mL/L), enquanto a estrutura complexa da *E. coli* apresentou maior resistência ao óleo essencial de calêndula e conseqüentemente um maior valor de MIC (30 mL/L). VOLPATO, 2005 encontrou dados semelhantes para extratos brutos de *C. officinalis*, enquanto *E.coli* apresentou resistência aos extratos, *S.aureus* apresentou halo de inibição de até 13 mm pelo método de difusão radial em ágar-cavidade.

Os filmes de nanocelulose com concentrações de 5 e 10% de óleo essencial de calêndula não apresentaram ação antibacteriana contra nenhuma das bactérias testadas enquanto o óleo puro apresentou inibição para as duas bactérias testadas. A adição do óleo de calêndula sobre o filme de nanocelulose apresentou inibição para a bactéria *S.aureus*, portanto o processo de obtenção dos filmes pode estar inativando o óleo de calêndula, tornando necessário análises para verificação do processo de obtenção e/ou maiores concentrações do óleo nos filmes para a eficácia da ação antibacteriana. A alta densidade e ausência de porosidade no filme de nanocelulose da polpa bruta pode evitar que o óleo percole pelo filme e seja liberado no meio assim não apresentando ação antibacteriana. Uma alternativa neste caso seria o teste da impregnação do óleo essencial de calêndula no filme de nanocelulose da polpa tratada, o qual apresenta grande porosidade, o que facilitaria a percolação do óleo, favorecendo a liberação do óleo no meio e a ação antibacteriana.

Os filmes de nanocelulose impregnados com nanopartículas de prata nas concentrações de 32 e 89 mg/kg não apresentaram inibição contra as bactérias testadas. Sendo uma alternativa a síntese da nanopartículas com uma nucleação mais lenta resultando em nanopartículas com menores dimensões e maior eficiência na ação antibacteriana, além da síntese com maiores

concentrações de nanopartículas de prata, assemelhando-se aos curativos disponíveis comercialmente.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os filmes de nanofibrilas de celulose vegetal obtidos da polpa tratada, para extração das hemiceluloses, apresentaram maior porosidade e menor resistência mecânica comparados aos filmes obtidos da polpa bruta. O processo de extração das hemiceluloses em meio básico resulta na conversão da celulose nativa a celulose II, além de reduzir o índice de cristalinidade. A menor resistência mecânica do material não o tornaram adequado para os testes de impregnação de agente bactericida e aplicação em feridas corpóreas.

Filmes de nanocelulose obtidos da polpa bruta branqueada não apresentaram porosidade, o que os tornam adequados para aplicações como barreira. A característica de translucidez favorece o acompanhamento da cicatrização sem a necessidade de retirada do curativo para avaliação da ferida. As propriedades físicas e mecânicas obtidas são semelhantes a encontradas por outros autores.

A aplicação *in vivo* das membranas de nanocelulose vegetal mostrou o potencial do material no uso como curativo, sendo que apresentou resultados de cicatrização semelhantes ao curativo disponível comercialmente. Não houve sinais de rejeição do material, apesar do material ser composto também por polioses, as quais não estão presentes na membrana bacteriana comercial.

Os processos de impregnação tanto do óleo essencial de calêndula quanto das nanopartículas de prata nos filmes de nanocelulose da polpa bruta mostraram-se eficientes. Os filmes impregnados apresentam propriedades térmicas e químicas adequadas para potencial uso em feridas corpóreas, porém nas concentrações testadas não apresentaram ação bactericida contra *S.aureus* e *E.coli* nos testes *in vitro*, sendo necessário testes com maiores concentrações dos prováveis antibacterianos.

REFERÊNCIAS

- ABCMED. **Bactérias Gram-positivas e Gram-negativas: o que são? Como é a técnica de Gram? Quais as vantagens de diferenciar as bactérias Gram-negativas e Gram-positivas?** Disponível em: <<http://www.abc.med.br/p/587007/bacterias+gram+positivas+e+gram+negativas+o+que+sao+como+e+a+técnica+de+gram+quais+as+vantagens+de+diferenciar+as+bacterias+gram+negativas+e+gram+positivas.htm>>. Acesso em: 30 ago. 2017.
- ABDUL KHALIL, H. P. S. et al. Production and modification of nanofibrillated cellulose using various mechanical processes: A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 99, p. 649–665, 2014.
- ABDULLABEKOVA, V. et al. Essential oil of calendula officinalis. **European Medical, Health and Pharmaceeutical Journal**, v. 7, n. 2, p. 34–37, 2014.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR NM ISO 2471:2001. 2001.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR NM-ISO 1924-3:2006**. [s.l: s.n.].
- BACKDAHLA, H. et al. Mechanical properties of bacterial cellulose and interactions with smooth muscle cells. **Biomaterials**, v. 27, p. 2141–2149, 2006.
- BALLONI, C. J. V. **CARACTERIZAÇÃO FÍSICA E QUÍMICA DA MADEIRA DE Pinus elliottii**. [s.l.] UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”, 2009.
- BARUD, H. S. et al. Antimicrobial bacterial cellulose-silver nanoparticles composite membranes. **Journal of Nanomaterials**, v. 2011, 2011.
- BAUA, B. Nanotechnology: Health and environmental risks of nanomaterials. **Umwelt Bunds Amt: Fur Mensch und Umwelt**, p. 65, 2007.
- BERGAMASCHINE, A.; BRAGA, L.; SOUSA, M. Degradabilidade ruminal “in situ” da sapota (*Quararibea cordata*), do maracujá (*Passiflora* spp.) e da pupunha (*Bactris gasipaes*). **Rev Ciências Agro-Ambientais**, v. 3, p. 76–83, 2005.
- BODIN, A. et al. Influence of Cultivation Conditions on Mechanical and Morphological Properties of Bacterial Cellulose Tubes. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 97, n. 2, p. 425–434, 2007.
- BORELLA, J. C.; CARVALHO, D.M.A. TEIXEIRA, J. C. L.; RIBEIRO, N. . Influência do processo extrativo nas propriedades físico-químicas dos extratos de *Calendula officinalis* L. (Asteraceae). **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. IX, n. 2, p. 25–36, 2012.
- BURANOV, A. U.; MAZZA, G. Extraction and characterization of hemicelluloses from flax shives by different methods. **Carbohydrate Polymers**, v. 79, n. 1, p.

17–25, 2010.

CABALA, G. . **Desenvolvimento de filtros cerâmicos impregnados com nanopartículas de prata para desinfecção de água para consumo humano contaminada com bactéria fecal.** [s.l.] Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2013.

CARVALHO, W. et al. Uma visão sobre a estrutura, composição e biodegradação da madeira. **Quim. Nova**, v. 32, n. 8, p. 2191–2195, 2009.

CHAKER, A. et al. Key role of the hemicellulose content and the cell morphology on the nanofibrillation effectiveness of cellulose pulps. **Cellulose**, v. 20, p. 2863–2875, 2013.

CHOPRA, I. The increasing use of silver-based products as antimicrobial agents: a useful development or a cause for concern. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 59, p. 587–590., 2007.

CITADINI-ZANETTE, V.; NEGRELLE, R. R. B.; BORBA, E. . Calendula officinalis L. (ASTERACEAE): ASPECTOS BOTÂNICOS, ECOLÓGICOS E USOS. **Visão Acadêmica Curitiba**, v. 13, n. 1, 2012.

CORREA, A. C. **Preparação de nano fibras de celulose a partir de fibras de Curauá para desenvolvimento de nanocompósitos poliméricos com eva.** [s.l.] Universidade Federal de São Carlos, 2010.

DE JESUS SILVA, D.; D'ALMEIDA, M. L. O. Nanocristais de celulose. **O Papel (Brazil)**, v. 70, n. 7, p. 34–52, 2009.

DUFRESNE, A. **Nanocellulose: From Nature to High Performance Tailored Materials.** [s.l.] Berlin: Walter De Gruyter Incorporated, 2012.

EMBRAPA FLORESTAS/LABORATÓRIO TECNOLOGIA DA MADEIRA. **POP - 04 Determinação da lignina insolúvel em ácido.** [s.l: s.n.].

EMBRAPA FLORESTAS/LABORATÓRIO TECNOLOGIA DA MADEIRA. **POP - 09 Determinação do resíduo após incineração a 525 °C.** [s.l: s.n.].

EMBRAPA FLORESTAS/LABORATÓRIO TECNOLOGIA DA MADEIRA. **POP - 05 Hidrólise ácida total.** [s.l: s.n.].

ENVIROMENTAL PROTECTION AGENCY-USA. **Integrated Risk Information System.** Disponível em: <https://cfpub.epa.gov/ncea/iris/iris_documents/documents/subst/0099_summary.pdf#nameddest=rfd>.

FERRER, A.; PAL, L.; HUBBE, M. Nanocellulose in packaging: Advances in barrier layer technologies. **Industrial Crops and Products**, v. 95, p. 574–582, 2017.

FIUME, M. Cosmetic ingredient review expert pannel. Final report on the safety assessment of Calendula officinalis extract and Calendula officinalis. **Int J Toxicol**, v. 20, p. 13–21, 2001.

GAZIM, Z. et al. Identificação dos constituintes químicos da fração volátil da Calendula officinalis produzida no Paraná. **Horticultura Brasileira**, v. 25, p. 118–121, 2007.

GAZIM, Z. C. et al. Antifungal activity of the essential oil from *Calendula officinalis* L. (asteraceae) growing in Brazil. **Brazilian journal of microbiology : [publication of the Brazilian Society for Microbiology]**, v. 39, n. 1, p. 61–3, 2008.

GRAÇA, J. **Composição Química da Madeira de Eucalipto (*Eucalyptus globulus* L .)**. [s.l.] Universidade Técnica de Lisboa, 2009.

GRACZA, L. Oxygen-containing terpene derivatives from *Calendula officinalis*. **Planta med.**, v. 53, n. 2, p. 227, 1987.

HASANJANZADEH, H. et al. Effects of hemicellulose pre-extraction and cellulose nanofiber on the properties of rice straw pulp. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 68, p. 198–204, 2014.

HAYASHI, T.; MARSDEN, M. P. .; DELMER, D. . Pea xyloglucan and cellulose. V. Xyloglucan-cellulose interactions in vitro and vivo. **Plant Physiology**, v. 83, p. 384–389, 1987.

HOENICH, N. A. Cellulose for Medical Applications: Past, Present, and Future. **BioResources**, v. 1, n. 2, p. 270–280, 2006.

IGUCHI, M.; YAMANAKA, S.; BUDHIONO, A. Bacterial cellulose—a masterpiece of nature's arts. **J Mater Sci**, v. 35, p. 261–270., 2000.

IOELOVICH, M. Cellulose as a nanostructured polymer: a short review. **BioResources**, v. 3, n. 4, p. 1403–1418, 2008.

IWAMOTO, S.; ABE, K.; YANO, H. The Effect of Hemicelluloses on Wood Pulp Nanofibrillation and Nanofiber Network Characteristics. **Biomacromolecules**, v. 9, n. 3, p. 1022–1026, 2008.

IWAMOTO, S.; NAKAGAITO, A. N.; YANO, H. Nano-fibrillation of pulp fibers for the processing of transparent nanocomposites. **Applied Physics A: Materials Science and Processing**, v. 89, n. 2, p. 461–466, 2007.

JANA, N. R.; GEARHEART, L.; MURPHY, C. J. Wet chemical synthesis of silver nanorods and nanowires of controllable aspect ratio. **Chemical Communications**, n. 7, p. 617–618, 2001.

JANARDHANAN, R. et al. Synthesis and surface chemistry of nano silver particles. **Polyhedron**, v. 28, n. 12, p. 2522–2530, 2009.

JIAN, Z.; YONGCHANG, W.; YIMIN, L. Fluorescence spectra character of silver-coated gold colloidal nanoshells. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 232, p. 155–161, 2004.

KAMEL, S. Nanotechnology and its applications in lignocellulosic composites: A Mini Review. **Polymer Letters**, v. 1, n. 9, p. 546–575, 2007.

KLEMM, D. et al. Cellulose: Fascinating biopolymer and sustainable raw material. **Angewandte Chemie International**, v. 44, p. 3358–3393, 2005.

KLEMM, D.; SCHMAUDER, H. P.; HEINZE, T. H. Cellulose, in *Biopolymers: Biology, Chemistry, Biotechnology, Applications, Polysaccharide*. **Wiley-VCH, Weinheim**, v. 6, p. 275, 2002.

KUCIŃSKA-LIPKA, J.; GUBANSKA, I.; JANIK, H. Bacterial cellulose in the field of wound healing and regenerative medicine of skin: recent trends and future prospectives. **Polymer Bulletin**, v. 72, n. 9, p. 2399–2419, 2015.

LABORCLIN. Manual para antibiograma difusão em disco (Kirby e Bauer). p. 1–29, 2011.

LANSDOWN, A. B. G.; WILLIAMS, A. How safe is silver in wound care? **Journal of wound care**, v. 13, n. 4, p. 131–136, 2004.

LEITE, F. A. E. Curativos de prata: projeto de otimização do uso. **Rev. Bras. Cir. Plást.**, v. 26, p. 10, 2011.

LENGOWSKI, E. C. et al. Avaliação de métodos de obtenção de celulose com diferentes graus de cristalinidade. **Scientia Forestalis/Forest Sciences**, v. 41, n. 98, p. 185–194, 2013.

LEVIN, S. C. et al. Magnetic plasmonic core-shell nanoparticles. **American Chemical Society - ACS Nano**, v. 3, p. 379–1388, 2009.

LIN, N.; DUFRESNE, A. Nanocellulose in biomedicine: Current status and future prospect. **European Polymer Journal**, v. 59, p. 302–325, 2014.

LIU, C.; WYMAN, C. E. The effect of flow rate of compressed hot water on xylan, lignin, and total mass removal from corn stover. **Industrial Engineering and Chemical Research**, v. 42, p. 5409–5416, 2003.

MAGATON, A. DA S.; PILO-VELOSO, D.; COLODETTE, J. L. Characterization of O-acetil-(4-O-methylglucurono)xylans from *Eucalyptus urograndis*. **Quimica Nova**, v. 31, n. 5, p. 1085–1088, 2008.

MAITI, S. et al. Preparation and characterization of nano-cellulose with new shape from different precursor. **Carbohydrate Polymers**, v. 98, n. 1, p. 562–567, 2013.

MANEERUNG, T.; TOKURA, S.; RUJIRAVANIT, R. Impregnation of silver nanoparticles into bacterial cellulose for antimicrobial wound dressing. **Carbohydrate Polymers**, v. 72, n. 1, p. 43–51, 2008.

MARCZAL, G. et al. Data on the essential oil content and composition of *Calendula officinalis*. **Herba hung.**, v. 26, n. 2–3, p. 179–189, 1987.

MINISTÉRIO DA SAÚDE E ANVISA. **MONOGRAFIA DA ESPÉCIE *Calendula officinalis* L. (CALÊNDULA)**. [s.l.: s.n.].

MISHRA, A.; CHATTOPADHYAY, P.; MISHRA, A. Assessment of In vitro sun protection factor of *Calendula officinalis* L. (asteraceae) essential oil formulation. **Journal of Young Pharmacists**, v. 4, n. 1, p. 17, 2012.

MISHRA, A. K. et al. Effects of *Calendula* essential oil-based cream on biochemical parameters of skin of albino rats against ultraviolet B radiation. **Scientia Pharmaceutica**, v. 80, n. 3, p. 669–683, 2012.

MOLIN, U.; TEDER, A. Importance of cellulose/hemicellulose-ratio for pulp strength. **Pulp Pap Res J Nord**, v. 17, p. 14–28, 2002.

MONTAZER, M. et al. In situ synthesis of nano silver on cotton using Tollens'

- reagent. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, n. 2, p. 1706–1712, 2012a.
- MONTAZER, M. et al. Durable antibacterial and cross-linking cotton with colloidal silver nanoparticles and butane tetracarboxylic acid without yellowing. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 89, n. 1, p. 196–202, 2012b.
- MOON, R. J. et al. **Cellulose nanomaterials review: structure, properties and nanocomposites**. [s.l.: s.n.]. v. 40
- MORONES, J. R.; ELECHIGUERRA, J.L. CAMACHO, A.; RAMIREZ, J. T. The bacterial effect of silver nanoparticles. **Nanotechnology**, v. 16, p. 2346–2353, 2005.
- MOSER, H.; PEREIRA, R. R.; PEREIRA, M. J. L. Evolução dos curativos de prata no tratamento de queimaduras de espessura parcial. **Revista Brasileira Queimaduras**, v. 12, p. 60–67, 2013.
- MUNIZ, F. T. L. et al. The Scherrer equation and the dynamical theory of X-ray diffraction research papers. **Acta Cryst**, v. A72, p. 385–390, 2016.
- NECHYPORCHUK, O.; BELGACEM, M. N.; BRAS, J. Production of cellulose nanofibrils: A review of recent advances. **Industrial Crops and Products**, v. 93, p. 2–25, 2015.
- NERSISYAN, H. H. et al. A new and effective chemical reduction method for preparation of nanosized silver powder and colloid dispersion. **Materials Research Bulletin**, v. 38, n. 6, p. 949–956, 2003.
- NETO, E. A. B.; RIBEIRO, C.; ZUCOLOTTO, V. **Síntese de Nanopartículas de Prata para Aplicação na Sanitização de Embalagens**. São Carlos: [s.n.].
- NISHIYAMA, Y. et al. Crystal Structure and Hydrogen Bonding System in Cellulose I α from Synchrotron X-ray and Neutron Fiber Diffraction. **J Am Chem Soc**, v. 125, p. 14300–14306, 2003.
- NISHIYAMA, Y.; LANGAN, P.; CHANZY, H. Crystal Structure and Hydrogen-Bonding System in Cellulose I β from Synchrotron X-ray and Neutron Fiber Diffraction. **J. AM. CHEM. SOC**, v. 124, p. 9074–9082, 2002.
- NISHIYAMA, Y.; KUGA, S.; OKANO, T. Mechanism of mercerization revealed by X-ray diffraction. **Journal of Wood Science**, v. 46, p. 452–457, 2000.
- NOGI, M. et al. Optically Transparent Nanofiber Paper. **Advanced Materials**, v. 21, n. 16, p. 1595–1598, 2009.
- NUNES, K. M. **CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E FÍSICO-QUÍMICA E ESTUDOS PRELIMINARES DE PLANEJAMENTO DA FORMULAÇÃO FITOTERÁPICA SEMI-SÓLIDA CONTENDO TINTURA DE Calendula officinalis L.** [s.l.] Universidade Federal do Pará, 2008.
- PEREIRA, B. L. C. et al. ESTUDO DA DEGRADAÇÃO TÉRMICA DA MADEIRA DE Eucalyptus STUDY OF THERMAL DEGRADATION OF Eucalyptus WOOD BY THERMOGRAVIMETRY AND CALORIMETRY. **Revista Árvore**, v. 37, n. 3, p. 567–576, 2013.
- PEREZ-CARREON, J. et al. Genotoxic and anti-genotoxic properties of Calendula officinalis extracts in rat liver cell cultures treated with

- diethylnitrosamine. **Toxicol in Vitro**, v. 16, n. 3, p. 253–258, 2002.
- PETICA, A. et al. Colloidal silver solutions with antimicrobial properties. **Materials Science and Engineering B**, v. 152, p. 22–27, 2008.
- PITANGUY, I.; SALGADO, F.; MARACAJÁ, P. F. DE. Utilização de película de celulose (Biofill®) como curativo biológico. **Revista Brasileira de Cirurgia**, v. 78, n. 5, p. 317–326, 1988.
- QUA, E. H. et al. Preparation and characterisation of cellulose nanofibres. **J Mater Sci**, v. 46, p. 6029–6045, 2011.
- RAJWADE, J. M.; PAKNIKAR, K. M.; KUMBHAR, J. V. Applications of bacterial cellulose and its composites in biomedicine. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, n. 6, p. 2491–2511, 2015.
- RAMOS, A. et al. Genotoxicity of an extract of *Calendula officinalis* L. **J Ethnopharmacol**, v. 61, n. 1, p. 49–55, 1998.
- RANI, M. U.; UDAYASANKAR, K.; APPAIAH, K. A. A. Properties of Bacterial Cellulose Produced in Grape Medium by Native Isolate *Gluconacetobacter* Sp. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 120, p. 2835–2841, 2011.
- RAZERA, I. A. T. **Fibras lignocelulósicas como agente de reforço de compósitos de matriz fenólica e lignofeólica**. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2006.
- RODRIGUES, E. C. D. S. **SÍNTESE DE MAGNETITA E AÇÃO ANTIBACTERIANA DO Ag₂O EM MATRIZ DE ALGINATO MAGNÉTICO**. [s.l.] UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO GRANDE DO NORTE, 2011.
- ROWELL, R. M. **The Chemistry of Solid Wood, Advances in Chemistry Series**. American C ed. Washington: [s.n.].
- SACUI, I. A. et al. 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 and Interfaces**, v. 6, n. 9, p. 6127–6138, 2014.
- SEGAL, L. et al. An empirical method for estimating the degree of crystallinity of native cellulose using the X-ray diffractometer. **Textile Research Journal**, v. 29, n. 10, p. 786–794, 1959.
- SERAFIM, R. A. . **Desenvolvimento de aditivo têxtil com nanopartículas de prata e sua aplicação industrial**. [s.l.] UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA, 2010.
- SHARMA, V. K.; YNGARD, R. A.; LIN, Y. Silver nanoparticles: Green synthesis and their antimicrobial activities. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 145, n. 1–2, p. 83–96, 2009.
- SLAVOV, A. et al. Physico-chemical characterization of water-soluble pectic extracts from *Rosa damascena*, *Calendula officinalis* and *Matricaria chamomilla* wastes. **Food Hydrocolloids**, v. 61, p. 469–476, 2016.
- SONAI, G. G. **Preparação e caracterização de nanopartículas de Prata em meio aquoso e orgânico, com impregnação em borrachas de silicone**

contendo RuCl₂(vpy)₄ para fim antimicrobiano. [s.l.] Universidade Federal de Santa Catarina, 2008.

SPENCE, K.; VENDITTI, R.; HABIBI, Y.; ROJAS, O.; PAWLAK, J. The effect of chemical composition on microfibrillar cellulose films from wood pulps: mechanical processing and physical properties. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 5961–5968, 2010.

STELTE, W.; SANADI, A. R. Preparation and Characterization of Cellulose Nanofibers from Two Commercial Hardwood and Softwood Pulps. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 48, p. 11211–11219, 2009.

SUN, J. X. et al. Fractional extraction and structural characterization of sugarcane bagasse hemicelluloses. **Carbohydrate Polymers**, v. 56, p. 195–204, 2014.

TECHNICAL ASSOCIATION OF THE PULP AND PAPER INDUSTRY. **T 411 om-97, Thickness (caliper) of paper, paperboard, and combined board.**, 1997.

TECHNICAL ASSOCIATION OF THE PULP AND PAPER INDUSTRY. T 441 om-98, Water absorptiveness of sized (non-bibulous) paper, paperboard, and corrugated fiberboard (Cobb test). 1998.

TECHNICAL ASSOCIATION OF THE PULP AND PAPER INDUSTRY. T 220-om01, Physical testing of pulp handsheets. 2001.

TECHNICAL ASSOCIATION OF THE PULP AND PAPER INDUSTRY. T410-om02, Grammage of paper and paperboard (weight per unit area). 2002a.

TECHNICAL ASSOCIATION OF THE PULP AND PAPER INDUSTRY. T 460 0m-02, Air resistance of paper (Gurley method). 2002b.

TECHNICAL ASSOCIATION OF THE PULP AND PAPER INDUSTRY. **T 412 om02, Moisture in pulp, paper and paperboard.** [s.l: s.n.].

TESKE, M.; TRENTINE, A. M. Compêndio de fitoterapia. **Curitiba Ingra**, p. 66–68, 1995.

THOMAS, S. (Methicillin-resistant Staphylococcus Aureus) and The Use of Silver Dressings: Overcoming Bacterial Resistance. **world wide wounds**, v. 1.1, 2004.

UENOJO, M.; MARÓSTICA, M. R.; PASTORE, G. M. Carotenoides: Propriedades, aplicações e biotransformações para formação de compostos de aroma. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 616–622, 2007.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO. **Apostila: Química da madeira, Disciplina de Química Industrial.** [s.l: s.n.].

UWE, H.; NEIL, G. The Scherrer equation versus the “ Debye – Scherrer equation ”. **NATURE NANOTECHNOLOGY**, v. 6, n. SEPTEMBER, p. 534, 2011.

VIANA, L. C. **DESENVOLVIMENTO DE FILMES CELULÓSICOS NANOESTRUTURADOS A PARTIR DA POLPA KRAFT DE Pinus sp. CURITIBA 2013.** [s.l.] UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ, 2013.

VIERA, D. C. . **Produção de biofilme (membrana de biocelulose) por Glucanacetobacter xylinus em meio de resíduos de frutas e folhas de chá verde.** [s.l.] Universidade de São Paulo, 2013.

VOLPATO, A. M. D. M. **AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIBACTERIANO DE Calendula officinalis (ASTERACEAE) PARA SEU EMPREGO COMO FITOTERÁPICO.** [s.l.] UFPR, 2005.

WANG, H. et al. Preparation of tough cellulose II nanofibers with high thermal stability from wood. **Cellulose**, v. 21, n. 3, p. 1505–1515, 2014.

WANG, H.; LI, D.; ZHANG, R. Preparation of Ultralong Cellulose Nanofibers and Optically Transparent Nanopapers Derived from Waste Corrugated Paper Pulp. **Bioresources**, v. 8, n. 1, p. 1374–1384, 2013.

WIEGAND, I.; HILPERT, K.; HANCOCK, R. E. W. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. **Nature Publishing Group**, v. 3, n. 2, p. 163–175, 2008.

WU, J. et al. Silver nanoparticle/bacterial cellulose gel membranes for antibacterial wound dressing: investigation in vitro and in vivo. **Biomedical materials (Bristol, England)**, v. 9, n. 3, p. 35005, 2014.

YAMANAKA, S. et al. The structure and mechanical properties of sheets prepared from bacterial cellulose. **JOURNAL OF MATERIALS SCIENCE**, v. 24, p. 3141–3145, 1989.

YIN, H. et al. Large-scale and size-controlled synthesis of silver nanoparticles under microwave irradiation. **Materials Chemistry and Physics**, v. 83, p. 66–70, 2004.

ZHANG, L.M.; ZHAO, X.; JI, J.J.; DAI, Y. J. TG-DTG as an effective method for the characterization of rutin extracted from the buds of *Sophora japonica* L. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, p. 1–6, 2008.

ZHU, H. et al. Transparent paper: fabrications, properties, and device applications. **Energy Environ. Sci.**, v. 7, n. 1, p. 269–287, 2014.

ZITTERL-EGLSEER, K. et al. Anti-oedematous activities of the main triterpendiol esters of marigold (*Calendula officinalis* L.). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 57, n. 2, p. 139–144, 1997.