Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais



Dissertação de Mestrado

Tiago Augusto Bueno Cotta

Produção e caracterização de nanofibras de acetato de celulose contendo extrato de Bixa orellana para potencial aplicação na Engenharia de Tecidos da carne cultivada

Belo Horizonte

Fevereiro de 2022

Tiago Augusto Bueno Cotta

Produção e caracterização de nanofibras de acetato de celulose contendo extrato de Bixa orellana para potencial aplicação na Engenharia de Tecidos da carne cultivada

Dissertação apresentada à banca examinadora do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Materiais do CEFET-MG, na área de concentração de Ciência e Desenvolvimento de Materiais, na Linha de Pesquisa em Biomateriais, como parte integrante dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Engenharia de Materiais.

Orientador: Prof. Dr. Roberta Viana Ferreira

Coorientador: Prof. Dr. Erika Cristina Jorge

Belo Horizonte

Fevereiro de 2022

Cotta, Tiago Augusto Bueno.
C846p Produção e caracterização de nanofibras de acetato de celulose contendo extrato de Bixa orellana para potencial aplicação na Engenharia de Tecidos da carne cultivada / Tiago Augusto Bueno Cotta. – 2022.
94 f. : il.
Orientadora: Roberta Viana Ferreira.
Coorientadora: Erika Cristina Jorge.

Dissertação (mestrado) – Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Materiais, Belo Horizonte, 2022.
Bibliografia.

1. Carne cultivada. 2. Urucum. 3. Acetato de celulose. 4. Eletrofiação. I. Ferreira, Roberta Viana. II. Jorge, Erika Cristina. III. Título.

CDD: 620.1923

Ficha elaborada pela Biblioteca - *campus* Nova Suíça - CEFET-MG
Bibliotecária: Rosiane Maria Oliveira Gonçalves - CRB6-2660

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
CENTRO FEDERAL DE EDUCAÇÃO TECNOLÓGICA DE MINAS GERAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE MATERIAIS - NS

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO Nº 5/2022 - POSMAT (11.52.07)

Nº do Protocolo: 23062.008842/2022-02

Belo Horizonte-MG, 23 de fevereiro de 2022.

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

"PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOFIBRAS DE ACETATO DE CELULOSE CONTENDO EXTRATO DE BIXA ORELLANA PARA POTENCIAL APLICAÇÃO NA ENGENHARIA DE TECIDOS DA CARNE CULTIVADA"

Autor: Tiago Augusto Bueno Cotta

Orientadora: Prof.ª Dr.ª Roberta Viana Ferreira

A Banca Examinadora composta pelos membros abaixo aprovou em 24 de fevereiro de 2022 esta Dissertação:

Prof.ª Dr.ª Roberta Viana Ferreira (ORIENTADORA)
Seara B.V.

Prof.ª Dr.ª Erika Cristina Jorge (COORIENTADORA)
Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Prof. Dr. Sidney Nicodemos da Silva (EXAMINADOR INTERNO)
Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais - CEFET-MG

Prof.ª Dr.ª Erika Gabriele Alves Alcântara (EXAMINADORA EXTERNA)
UNI-KL

(Assinado digitalmente em 23/03/2022 07:00)
SIDNEY NICODEMOS DA SILVA
PROFESSOR ENS BASICO TECN TECNOLOGICO
DF (11.56.10)
Matrícula: 2519987

(Assinado digitalmente em 18/03/2022 12:08)
ERIKA CRISTINA JORGE
ASSINANTE EXTERNO
CPF: 261.370.228-11

(Assinado digitalmente em 25/02/2022 07:30)
ERIKA GABRIELE ALVES ALCÂNTARA
ASSINANTE EXTERNO
CPF: 081.865.126-16

(Assinado digitalmente em 24/02/2022 21:42)
ROBERTA VIANA FERREIRA
ASSINANTE EXTERNO
CPF: 059.399.4

Para verificar a autenticidade deste documento entre em https://sig.cefetmg.br/public/documentos/index.jspinformando seu número: **5**, ano: **2022**, tipo: **ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO**, data de emissão: **23/02/2022** e o código de verificação: **570447a12d**

“Escaparemos do absurdo de criar uma galinha inteira para comer o peito ou a asa, criando essas partes separadamente em um meio adequado.”

Winston Churchil, 1932

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Freurizart e Angela, pela educação e ensinamentos que me passaram, pelo incentivo e acima de tudo, por sempre estarem presentes.

Ao meu irmão Felipe, que sempre esteve ao meu lado durante minha vida.

Meus sinceros agradecimentos à minha orientadora Roberta Viana, pelo suporte, acompanhamento e conselhos fornecidos durante este trabalho.

À Erika Cristina, por sua coorientação durante este projeto e por me acolher e me acompanhar em seu laboratório durante os ensaios biológicos.

Ao professor Sidney Nicodemos, que desde a graduação me ensina e me guia em minha jornada acadêmica.

À Erika Gabriele e Claudia Fleck, por suas contribuições e apoio durante o decorrer do projeto.

À Ana Elisa, Júlia Meireles e Juliana Camargos, por todo o auxílio e suporte prestado durante a execução dos ensaios realizados.

Ao professor João Paulo, por seu auxílio e suporte na etapa de discussão dos resultados.

Aos meus amigos, que me deram força e motivação para nunca desistir, seguindo em frente apesar das adversidades.

Ao CEFET-MG, que por mais de 10 anos está presente em minha vida acadêmica e me guiou durante esta jornada.

À agência de fomento CAPES pela bolsa de estudos. "O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

A todos aqueles que, de forma direta ou indireta, colaboraram no decorrer deste projeto e que merecem meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

Nos últimos 50 anos a população mundial mais que duplicou e por consequência a produção de carne para consumo mais que quadriplicou vista a nova necessidade. Cerca de 88 bilhões de animais são abatidos anualmente para suprir a demanda do ramo alimentício para consumo humano. A terra, água, alimento e emissão de gases de efeito estufa envolvidos nesta produção estão chegando a valores alarmantes. A produção de carne em laboratório (carne cultivada), uma ciência que surgiu na última década, apresenta-se como uma possível solução para os problemas envolvidos na criação de animais para a obtenção de proteína para consumo. Neste trabalho foram produzidas nanofibras de acetato de celulose carregadas com extrato de *Bixa orellana* 1%*wt* para avaliação de aplicação como *scaffold* no ramo da carne cultivada. Acetato de celulose e extrato de *Bixa orellana* foram solubilizados e utilizados para produzir o *scaffold* de nanofibras via eletrofiação. Análise térmica e química das nanofibras produzidas mostraram que a adição do extrato não proporcionou uma mudança significativa da estabilidade do polímero. Foi averiguado que o extrato atuou como plastificante na estrutura polimérica do acetato de celulose via análise de nano-DMA. A molhabilidade do *scaffold* sofreu um aumento com a adição do extrato. Análise de MEV confirmou que os *scaffolds* produzidos apresentaram estrutura porosa e sem alinhamento específico, possibilitando migração celular e formação de múltiplas camadas de tecido muscular. Testes *in vitro* indicaram que os *scaffolds* produzidos são biocampatíveis e possibilitam a adesão e proliferação das células, indicando potencial aplicação deste material no ramo da carne cultivada. Ainda jovem, este ramo da ciência ainda necessita de grande quantidade de estudo e ajuste de parâmetros para torna-se uma indústria com capacidade produtiva em um âmbito global.

Palavras chaves: Carne cultivada, *Bixa orellana,* Acetato de celulose, eletrofiação.

Production and characterization of celullose acetate nanofibers loaded with *Bixa orellana* extract for potential application in Tissue Engineering of cultured meat

ABSTRACT

In the last 50 years the world population has more than doubled, consequently the production of meat for consumption has more than quadrupled in view of the new need. About 88 billion animals are slaughtered annually to meet the demand of the food industry for human consumption. The land, water, food and greenhouse gas emissions involved in this production are reaching alarming values. The production of meat in the laboratory (cultured meat), a science that emerged in the last decade, presents itself as a possible solution to the problems involved in raising animals to obtain protein for consumption. In this work, cellulose acetate nanofibers loaded with *Bixa orellana* 1%*wt* extract were produced for evaluation of application as scaffold in the field of cultivated meat. Cellulose acetate and *Bixa orellana* extract were solubilized and used to produce the nanofiber scaffold via electrospinning. Thermal and chemical analysis of the produced nanofibers showed that the addition of the extract did not significantly change the stability of the polymer. It was found that the extract acted as a plasticizer in the polymeric structure of cellulose acetate via nano-DMA analysis. The wettability of the scaffold increased with the addition of the extract. SEM analysis confirmed that the scaffolds produced presented a porous structure and no specific alignment, enabling cell migration and formation of multiple layers of muscle tissue. In vitro tests indicated that the scaffolds produced are biocompactible and enable cell adhesion and proliferation, indicating potential application of this material in the field of cultivated meat. Still young, this branch of science still needs a great amount of study and adjustment of parameters to become an industry with productive capacity in a global scope.

Key words: Cultured meat, *Bixa orellana*, Cellulose acetate, electrospinning

ÍNDICE DE ASSUNTOS

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA 15

2 OBJETIVOS 17

2.1 OBJETIVO GERAL 17

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 17

3 FUNDAMENTOS TEÓRICOS E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 18

3.1 CARNE CULTIVADA 18

3.1.1 CONTEXTO HISTÓRICO E MOTIVAÇÃO 18

3.1.2 PRODUÇÃO DE CARNE POR CULTURA CELULAR 21

3.1.3 BIOMATERIAIS E *SCAFFOLDS* 23

3.2 NANOFIBRAS POLIMÉRICAS 24

3.2.1 ACETATO DE CELULOSE 25

3.3 EXTRATO DE *BIXA ORELLANA* 28

3.4 ELETROFIAÇÃO 30

3.4.1 CONTEXTO HISTÓRICO E PRINCIPIO DE FUNCIONAMENTO 30

3.4.2 COLETOR 32

3.4.3 TENSÃO APLICADA 32

3.4.4 DISTÂNCIA ENTRE BOCAL E COLETOR 34

3.4.5 TAXA DE VAZÃO DA SOLUÇÃO 34

3.4.6 CONDUTIVIDADE DA SOLUÇÃO 35

3.4.7 CONCENTRAÇÃO E VISCOSIDADE DA SOLUÇÃO POLIMÉRICA 35

3.4.8 TEMPERATURA E UMIDADE 36

3.5 FIAÇÃO POR JATO ROTATIVO (ROTARY JET SPINNING) 36

3.5.1 CONTEXTO HISTÓRICO E PRINCÍPIO DE FUNCIONAMENTO 36

3.5.2 COMPARAÇÃO COM OUTRAS TÉCNICAS 39

3.5.3 PARÂMETROS DO PROCESSO 40

3.5.4 FORÇA CENTRÍFUGA E TENSÃO SUPERFICIAL 40
3.5.5 VELOCIDADE DE ROTAÇÃO 40
3.5.6 CONCENTRAÇÃO DA SOLUÇÃO POLIMÉRICA 41
3.5.7 TAXA DE EVAPORAÇÃO DO SOLVENTE 42
4 MATERIAIS E MÉTODOS 44
4.1 MATERIAIS UTILIZADOS 44
4.1.2 PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS NANOFIBRAS 44
4.1.3 CONSTRUÇÃO DO EQUIPAMENTO RJS 44
4.1.4 FLUXOGRAMA GERAL DO PROJETO 45
4.2 ELETROFIAÇÃO 46
4.2.1 PREPARO DA SOLUÇÃO 46
4.2.2 PRODUÇÃO DAS NANOFIBRAS VIA ELETROFIAÇÃO 46
4.2.3 PARÂMETROS UTILIZADOS 47
4.3 FIAÇÃO POR JATO ROTATIVO (RJS) 48
4.4 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOFIBRAS 49
4.4.1 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) 49
4.4.2 ANGULO DE CONTATO 49
4.4.3 ENSAIO DE DEGRADAÇÃO 50
4.4.4 ESPECTROSCOPIA UV/VISÍVEL 50
4.4.5 ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO 50
4.4.6 CALORIMETRIA DIFERENCIAL DE VARREDURA (DSC) 50
4.4.7 ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA (TGA-DTA) 50
4.4.8 ANÁLISE MECÂNICA DINÂMICA NANOMÉTRICA 50
4.5 TESTES DE BIOCOMPATIBILIDADE *IN VITRO* 51
4.5.1 CULTURA CELULAR 51
4.5.2 VIABILIDADE CELLULAR (MTT) 51
4.5.3 CONTAGEM DE CÉLULAS 52

4.5.4 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE QUANTITATIVA (q-PCR) . 52
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO 54
5.1 ELETROFIAÇÃO 54
5.2 DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO 59
5.3 ESPECTROSCOPIA UV-VISÍVEL 61
5.4 ENSAIO DE DEGRADAÇÃO 63
5.5 CALORIMETRIA DIFERENCIAL DE VARREDURA (DSC) 64
5.6 ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA (TGA-DTA) 65
5.7 ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR) 67
5.8 ÂNGULO DE CONTATO 70
5.9 ANÁLISE MECÂNICA DINÂMICA NANOMÉTRICA 71
5.10 VIABILIDADE CELULAR – MTT 72
5.11 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA – CULTURA CELULAR 73
5.12 CONTAGEM DE CÉLULAS – 24 HORAS 77
5.13 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE QUANTITATIVA (q-PCR) . 78
6 CONCLUSÃO 82
7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS 84
8 REFERÊNCIAS 85
9 ANEXO 1 - EQUIPAMENTO DE FIAÇÃO POR JATO ROTATIVO (ROTARY JET SPINNING) 92

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Lista de países com a maior quantidade de patentes relacionadas a equipamentos capazes de produzir fibras a partir de dispositivos rotativos de 2000 até 2016.....37

Tabela 2 - Parâmetros de eletrofiação testados.....47

Tabela 3 - Temperaturas obtidas do ensaio de DSC.....64

Tabela 4 - Bandas de absorção identificadas pelo ensaio de FTIR para o extrato de *Bixa orellana*.....69

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Comparação de impacto de setores da produção de carne bovina.. 18
Figura 2 - Startups de destaque com pesquisa no ramo da carne cultivada.... 20
Figura 3 - Engenharia de tecido aplicada na cultura de carne cultivada. 22
Figura 4 - Molécula de acetato de celulose. 26
Figura 5 - Molécula de bixina. 28
Figura 6 - Molécula de norbixina. 29
Figura 7 - Representação esquemática da técnica de eletrofiação e do fenômeno elétrico do cone de Taylor 31
Figura 8 - Diferença entre os coletores utilizados na eletrofiação. 32
Figura 9 - Efeito da tensão sobre a formação do cone de Taylor 33
Figura 10 - Efeito do aumento da viscosidade sobre a morfologia da fibra. 36
Figura 11 - Representação esquemática da técnica de fiação por jato rotativo 38
Figura 12 - Variação do diâmetro de fibras de PLA em função da velocidade de rotação em RJS..... 41
Figura 13 - Variação do diâmetro de fibras de PLA em função da concentração da solução em RJS. 42
Figura 14 - Influência da taxa evaporação do solvente sobre o diâmetro das fibras produzidas por RJS 43
Figura 15 - Fluxograma geral da metodologia do trabalho..... 45
Figura 16 - Equipamento EN1 Nanobond modificado 46
Figura 17 - Representação geral do processo de eletrofiação. 47
Figura 18 - Representação esquemática do equipamento de fiação por jato rotativo de barril fechado. 48

Figura 19 - Microscopia eletrônica de varredura das amostras de nanofibras deacetato de celulose obtidas em diferentes condições 54
Figura 20 - Microscopia eletrônica de varredura das amostras de nanofibras de AC variando-se a tensão. 56
Figura 21 - Imagem termográfica do equipamento de eletrofiação. 58
Figura 22 - Aspecto das mantas de nanofibras produzidas. 59
Figura 23 - Distribuição de tamanho das nanofibras de AC. 60
Figura 24 - Distribuição de tamanho das nanofibras de AC@U. 60
Figura 25 - Espectro da região do UV-visível para o extrato de *Bixa orellana*. 61
Figura 26 - Espectro da região do UV-visível para as amostras AC e AC@U. 62
Figura 27 - Ensaio de degradação realizado no período de 21 dias. 63
Figura 28 - Curvas de calorimetria diferencial de varredura das amostras AC e AC@U. 64
Figura 29 - Análise termogravimétrica (DTA-TGA) da amostra de AC. 65
Figura 30 - Análise termogavimétrica (DTA-TGA) da amostra de AC@U.....66
Figura 31 - Análise termogravimétrica (TGA) das amostras de AC e AC@U....67
Figura 32 - Espectroscopia da amostra de extrato de *Bixa orellana*. 68
Figura 33 - Espectroscopia das amostras AC, AC@U e U. 69
Figura 34 - Ensaio de ângulo de contato das amostras de nanofibras de AC e AC@U. 70
Figura 35 - Módulo de armazenamento E’(ω) das amostras AC e AC@U.....71
Figura 36 - Módulo de perda E"(ω) das amostras AC e AC@U.....72
Figura 37 - Proliferação celular de mioblastos C2C12 para as amostras de nanofibras de AC, AC@U e controle. 73
Figura 38 - Imagens de MEV das células C2C12 após dois dias de cultura. ... 74

Figura 39 - Imagens de MEV das células C2C12 após sete dias de cultura. ... 76
Figura 40 - Contagem de células não aderentes para scaffolds de AC e AC@U. 77
Figura 41 - Ensaio de PCR para as amostras de AC seguindo a condição 1. . 78
Figura 42 - Ensaio de PCR para as amostras de AC seguindo a condição 2. . 79
Figura 43 - Ensaio de PCR para as amostras de AC@U seguindo a condição 1. 80
Figura 44 - Ensaio de PCR para as amostras de AC@U seguindo a condição 2. 81
Figura 45 - Vista superior do equipamento de JRS. 92
Figura 46 - Falha identificada após condução de teste experimental. 93

LISTA DE ABREVIAÇÕES

- °C – Graus Célcius
- µm – Micrômetro
- µL – Unidade de volume microlitro
- AC – Acetato de celulose
- AC@U – Acetato de celulose contendo extrato de *Bixa orellana*
- CDTN – Centro de Desenvolvimento de Tecnologia Nuclear
- CEFET-MG – Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais
- DRX – Difração de raios-X
- DSC – Calorimetria diferencial de varredura
- DMEM – Dulbecco's Modified Eagle's Medium
- FTIR - Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier
- g – Unidade de medida grama
- kV – Unidade de tensão quilovolt
- MEV – Microscopia eletrônica de varredura
- nm – Nanometro
- Nano-DMA – Nano-Dynamic Mechanical Analysis
- RJS – Rotary Jet Spinning
- RPM – Rotações por minuto
- UV-vis – Espectroscopia ultravioleta/visível
- W – Unidade de potência Watts
- wt% – Porcetagem em peso

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A engenharia de tecidos é uma plataforma promissora para a criação de carne em um ambiente controlado e livre da necessidade de criação de animais para abate. É uma área muito recente, sendo necessário muito estudo e pesquisa para otimização dos parâmetros de produção, com maior ênfase em biomateriais baratos, expansão eficiente de células de animais de fazenda e engenharia de tecidos da vascularização de *scaffolds*. A implementação de ferramentas e conhecimentos das áreas de engenharia de alimentos e tecidos irão ser essenciais para o desenvolvimento de novas rotas de produções sustentáveis e economicamente viáveis. Os *scaffolds* de carne cultivada devem ser gerados a partir de biomateriais comestíveis e projetados para imitar os tecidos que compõe a carne animal. (Ben-Arye & Levenberg, 2019)

Algumas alternativas interessantes que têm sido exploradas para *scaffolds* para aplicação no campo da carne cultivada consistem em *scaffolds* de nanofibras eletrofiadas (Dias et al., 2012) (Zhang et al., 2017). Dentre as técnicas disponíveis para produzir *scaffolds* para engenharia de tecidos, a eletrofiação apresenta vantagens distintas. A eletrofiação é um método versátil capaz de produzir estruturas de nanofibras eletrofiadas tridimensionais, que se mostraram particularmente úteis na imitação do ambiente extracelular devido à sua alta área de superfície, excelentes propriedades mecânicas, alta porosidade e distribuição de tamanho de poro (Eisenbarth, 2007) (Shuiping et al., 2010). Trabalhos anteriores mostraram que os *scaffolds* de nanofibras podem apoiar a adesão, propagação e proliferação de células em diferentes tipos de células *in vitro* (Hajiali et al., 2016) . A eletrofiação apresentou-se como uma técnica eficaz para formação de *scaffolds* devido ao processo notavelmente simples e versátil, controlável e reproduzível (Capella et al., 2016) (Vargas et al., 2010)

Todavia, quando o quisito em análise é a taxa de produção de nanofibras poliméricas, a eletrofiação apresenta valores baixos comparada a outras técnicas. A Fiação por jato rotativo por sua vez, uma técnica de fiação de nanofibras poliméricas baseada em altas rotações e no princípio físico de tensão superficial tem apresentado resultados de produção promissores. Apesar de recente no cenário da engenharia de tecidos, a técnica de RJS (Rotary Jet Spinning) vem ganhando espaço e possui alto potencial para a fabricação de

scaffolds porosos (Rogalski et al., 2017). Os materiais aplicáveis à produção de *scaffolds* devem ter propriedades que os tornem biocompatíveis em suas aplicações adequadas.

O acetato de celulose (AC) é um importante polímero biocompatível que tem sido utilizado em um amplo campo de aplicações. A aplicação biotecnológica desses polímeros está totalmente associada à sua biodegradabilidade, processabilidade, solubilidade e aplicabilidade. De acordo com o seu processamento, o AC pode ser utilizado para diversas aplicações, como fibras, filmes, membranas, entre outras aplicações (N. Bifari et al., 2016). Uma forma interessante de melhorar a funcionalidade dos *scaffolds* é a incorporação de substâncias bioativas naturais.

O urucum (*Bixa orellana L*.) é um corante natural nativo da América do Sul (Van Chuyen et al., 2012). As sementes de *Bixa orellana* contêm vários carotenóides, em que mais de 80% em peso é bixina (C25H30O4), um ácido carboxílico contendo uma cadeia de isopreno e um éster metílico, responsável pela intensa cor laranja-avermelhada das sementes de urucum e seu extrato (Lloyd, 1980). Pequenas quantidades de norbixina (C24H28O4), taninos, flavonóides, terpenóides, saponinas, esteroides, tocotrienóis (T3), um isômero menos proeminente da vitamina E, também são encontradas nas sementes de *Bixa orellana*.(dos Santos et al., 2021)

Diante deste cenário, este trabalho tem como objetivo geral o desenvolvimento de um *scaffold* composto por nanofibras de acetato de celulose puro e carregadas com extrato de *Bixa orellana,* avaliando seu potencial de aplicação no ramo da carne cultivada. Como objetivo secundário temos a fabricação de um equipamento inspirado na técnica de Fiação por jato rotativo (Rotary jet spinning), capaz de produzir nanofibras poliméricas em altas taxas de produção.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolvimento de nanofibras de acetato de celulose contendo extrato de *Bixa orellana* e avaliar a sua potencial aplicação na Engenharia de Tecidos da carne cultivada.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Produzir nanofibras de acetato de celulose através da técnica de eletrofiação com e sem a adição de 1%wt de extrato de *Bixa orellana;*
- Construir um equipamento para a produção de nanofibras utilizando o método de fiação por jato rotativo (Rotary jet spinning);
- Produzir nanofibras de acetato de celulose através da técnica de fiação por jato rotativo com e sem a adição de 1%wt de extrato de *Bixa orellana;*
- Caracterizar as propriedades físico químicas, morfológicas e mecânicas das nanofibras;
- Avaliar a biocompatilidade in vitro das nanofibras;
- Comparar as propriedades das nanofibras produzidas pelas duas técnicas de produção empregadas.

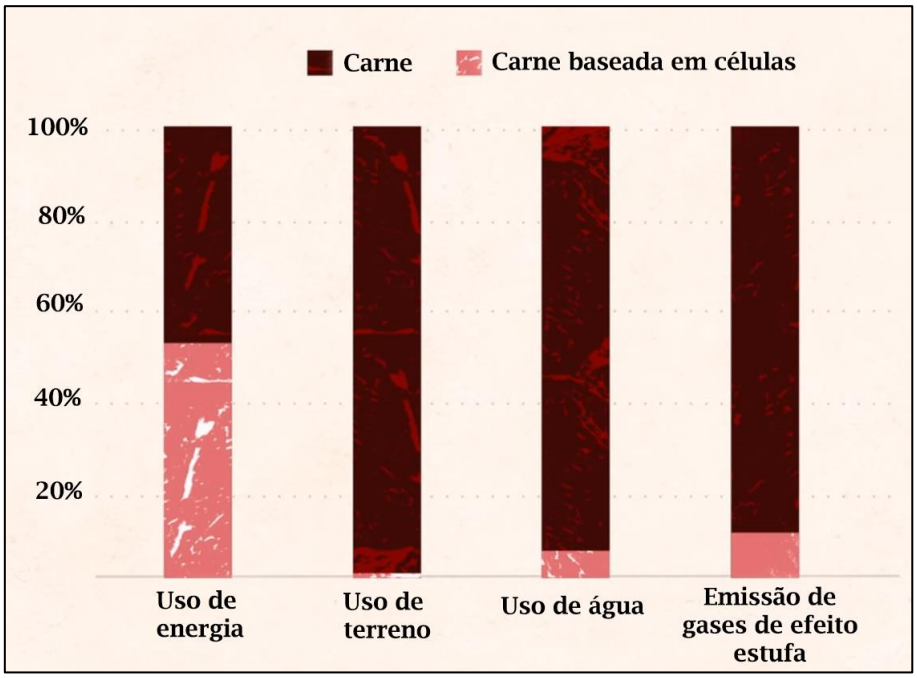
3 FUNDAMENTOS TEÓRICOS E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 CARNE CULTIVADA

3.1.1 CONTEXTO HISTÓRICO E MOTIVAÇÃO

Até 2050, o consumo mundial de carne aumentará 73%, de acordo com um relatório de 2011 da Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO). Esse aumento é impulsionado pela crescimento da população mundial e pelo aumento do consumo de carne dos países em desenvolvimento. O setor pecuário já consome cerca de 70% das terras agrícolas globais, divididas entre pastagem e alimentação animal. Assim, no atual sistema de produção animal, não haverá terra suficiente para satisfazer a crescente demanda por carne, e a carne se tornará um item de luxo escasso e caro.(McLeod & United, 2011) A Figura 1 apresenta a comparação de informações referentes a utilização de energia, terreno, água e a emissão de gases de efeito estufa relacionados a produção de carne através da pecuária e através de técnicas de produção de carne cultivada.

Figura 1 - Comparação de impacto de setores da produção de carne bovina.



Fonte: Adaptado de Environmental Science & Technology, 2011.

Nota-se que a utilização de energia é muito similar para ambos os campos de produção, todavia, para os demais quisitos, a produção de carne baseada em células apresenta valores muito inferiores quando comparado a pecuária tradicional, fato que impulsiona o investimento para a pesquisa do aprimoramento e desenvolvimento de insumos e materiais empregados no campo de produção de carne cultivada. (Environmental Science & Technology, 2011)

Os produtos alimentares de origem animal são considerados ineficientes, pois os animais consomem grandes quantidades de alimentos ao longo da vida, dos quais até 97% das calorias são perdidas em processos de manutenção do corpo e na produção de tecidos não comestíveis. Quando comparados a outras indústrias, os produtos de origem animal têm um cunho ambiental maior em comparação aos produtos de origem vegetal em termos de demanda de solo e água e emissão de gases de efeito estufa, tendo a indústria de carne bovina como aquela com maior impacto ambiental em escala planetária. (Ben-Arye & Levenberg, 2019)

Uma das soluções seria substituir a carne da dieta dos humanos por proteína a base de plantas e insetos. No entanto, a carne se tornou parte do consumo diário de alimentos da sociedade. Portanto, muitas pessoas desejam carne e acham difícil seguir dietas vegetarianas. Alimentos vegetarianos que imitam carne (por exemplo, hambúrgueres vegetarianos e almôndegas) foram introduzidos, mas até agora esses produtos não conseguiram replicar exatamente o sabor complexo e os perfis de textura que tornam da carne um alimento tão desejado. Embora muitos desafios ainda precisem ser superados, a carne cultivada pode ser uma solução para a iminente escassez mundial de proteínas que permite às pessoas manterem suas preferências alimentares. (Post & van der Weele, 2013)

A agricultura intensiva em fábricas e as más condições de bem-estar dos animais são causas comuns de doenças transmitidas por alimentos, como a gripe suína e aviária. Eles também contribuem para a disseminação de *E. coli* e Salmonela, que podem ser encontradas na carne. A produção de carne em um ambiente estéril e controlado pode evitar esses problemas e melhorar a segurança dos alimentos. Além disso, 70-80% dos antibióticos usados nos Estados Unidos são administrados a animais de criação. O que pode propriciar, por negligência

humana, o surgimento de bactérias resistentes de difícil controle sanitário. (Anomaly, 2015)

Até agora, as manifestações públicas de carne cultivada consistiram em carne moída, salsichas e pepitas. Carnes estruturadas, como bifes e peitos de frango, exigirão inovações em *scaffolds*, vascularização e outros aspectos da engenharia de tecidos. A carne cultivada provavelmente chegará ao mercado em fases, primeiramente no formato híbrido, de carne cultivada com carne à base de plantas, em seguida como produtos de carne moída, como pepitas e hambúrgueres e finalmente carnes estruturadas, como bifes e peitos de frango. (Specht & Lagally, 2017)

Muitas *startups* estão surgindo e crescendo nos últimos anos, muito devido ao fato do alto investimento que está acontecendo por parte de pessoas com alto poder de influência, como Bill Gates (fundador da Microsoft), de startups relacionadas com o desenvolvimento sustentável e universidade vinculadas ao assunto, investindo bilhões de dólares em um setor em ascensão. (Ben-Arye & Levenberg, 2019) A figura 2 identifica algumas destas startups que se destacaram nos últimos tempos.

Figura 2 - Startups de destaque com pesquisa no ramo da carne cultivada.



Fonte: Adaptado. Referência: The Good Food Institute (GFI) 2019.

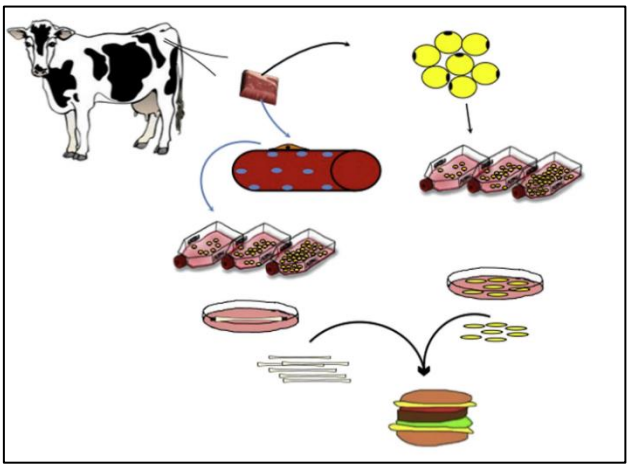
Com o avanço da pesquisa e aquecimento de mercado, diversas startups estão surgindo por todo o globo. O Brasil também está acompanhando este ritmo, onde já nota-se o aumento da quantitade de publicações científicas na área por parte das universidades e a ascensão de empresas e startups no mercado, que se preparam para tornar da carne cultivada um produto de consumo básico na sociedade moderna. (Ben-Arye & Levenberg, 2019)

3.1.2 PRODUÇÃO DE CARNE POR CULTURA CELULAR

A carne cultivada, produzida a partir de culturas celulares, é uma alternativa importante para a carne tradicional, derivada de animais vivos. Essa abordagem ganhou atenção crescente na opinião pública, da mídia popular, organizações de bem-estar animal, comunidade científica e entre investidores, particularmente após a produção do primeiro protótipo de carne cultivada. (Ben-Arye & Levenberg, 2019)

De uma biópsia de uma vaca, células musculares e adiposas são cultivadas separadamente em laboratório. *Scaffolds* são utilizados para adesão e promoção da manutenção da vida das células. A cultura é realizada em meio de crescimento e as células proliferam-se e se diferenciam. Ao fim do processo de cultura celular, os dois tipos celulares são misturados nas proporções corretas. A carne picada, um hambúrguer, por exemplo, será construído a partir de uma mistura de músculos e tecido adiposo. (Post & van der Weele, 2013) A figura 3 esquematiza o processo completo.

Figura 3 - Engenharia de tecido aplicada na cultura de carne cultivada.



Fonte: (Post & van der Weele, 2013)

A metodologia do cultivo celular por suspensão tem sido a mais explorada, por sua simplicidade e eficiência. Tudo começa a com a biópsia do animal do qual a proteína deseja-se cultivar, uma pequena quantidade é retirada, geralmente do tecido muscular esquelético. Este tecido contêm uma certa variedade de células, mas as mais empregadas são aquelas denominadas células satélites (CS), células-tronco adultas que se proliferam a uma taxa adequada para o método, estas CS possuem a capacidade de diferenciar-se apenas em células musculares esqueléticas. (Ferreira & Santos, 2019)

As CS são isoladas e conduzidas até um tanque de agitação, designado biorreator, este equipamento contém o meio de cultura, essencial para o cultivo das células, uma vez que contém os nutrientes necessários para a manutenção da vida das células, tais como sais e fatores de crescimento. Este ambiente é criado de forma a simular as condições fisiológicas do animal, um ambiente dinâmico, que permite a troca de nutrientes e de gases, mantendo a temperatura do ambiente controlada. (Ferreira & Santos, 2019)

Assim como as células dentro de um organismo, as células em cultura precisam de nutrientes para manutenção de vida. O meio de cultura celular é uma solução nutritiva contendo sais, tampões de pH e os blocos de construção de estruturas celulares, como proteínas e gorduras. Ele também contém moléculas chamadas fatores de crescimento, que são moléculas sinalizadoras que direcionam as células a se comportarem de determinadas maneiras. Por exemplo, fatores

específicos de diferenciação orientam as células a se tornarem células musculares, adiposas ou sanguíneas. Tradicionalmente, esses fatores eram obtidos do soro animal, mas o soro já foi largamente eliminado da terapêutica celular e da medicina regenerativa. Já existem centenas de formulações sem soro. No entanto, atualmente são muito caros para a produção de carne cultivada comercialmente viável. As formulações personalizadas isentas de soro deverão ser otimizadas para linhas celulares relevantes para a carne, com o custo como parâmetro chave. (Specht & Lagally, 2017)

3.1.3 BIOMATERIAIS E *SCAFFOLDS*

Na engenharia de tecidos, as características físicas, químicas e biológicas do tecido a ser cultivado são imitadas, de forma que o tecido formado exiba propriedades semelhantes aquele que foi traçado como objetivo. Células e biomateriais são integrados sob condições de cultura adequadas para formar tecidos maduros. Mais especificamente, na engenharia de tecido muscular esquelético, uma grande variedade de tipos celular pode ser co-cultivados em um *scaffold* 3D para gerar fibras musculares, vasos sanguíneos e uma matriz densa extracelular. (Ben-Arye & Levenberg, 2019)

A engenharia de tecidos é a responsável por lidar com a produção de *scaffolds* porosos, capazes de receber as células a serem cultivadas, além de possibilitar sua proliferação e migração, dessa forma, realizando a função estrutural de suporte para que um tecido arquitetado e funcional possa ser gerado. Esta ciência lida com a manipulação de uma alta pluralidade de materiais para confecção dos *scaffolds*, com diferentes tipos de células, biomoléculas e biorreatores. (Specht & Lagally, 2017)

A engenharia de materiais é uma das escolas que lidam com a produção dos *scaffolds* empregados na engenharia de tecidos, onde os polímeros biodegradáveis são amplamente utilizados para o desempenho da função de *scaffold*, que se degrada à medida que as células se proliferam e sintetizam sua própria matriz extra-celular. O alcance sinérgico entre a taxa de degradação do *scaffold* e a taxa de proliferação de síntese de matriz celular por parte das células é um dos grandes desafios a serem alcançados pelos pesquisadores da área de engenharia de tecidos. Modelos matemáticos estão sendo desenvolvidos para

que estas taxas sejam otimizadas de forma que se obtenha um conjunto final que possibilite a formação de um tecido completo livre de resquícios do material aplicado na construção do *scaffold*. (Akalp et al., 2017)

As propriedades mecânicas de um *scaffold* desempenham um papel importante no controle da diferenciação, proliferação e fenótipo de diferentes tipos de células. Especificamente, tecidos naturais com preferência as orientações, incluindo tendão, ligamento e músculo, exibiram comportamentos mecânicos anisotrópicos, com propriedades elásticas aumentadas ao longo da orientação da fibra tecidual. De vários tecidos moles, as células musculares são particularmente dependentes da ancoragem devido ao comportamento contrátil do tecido natural, o que requer um substrato compatível para uma miogênese eficaz. (Cooper et al., 2010)

Fatores de crescimento, polímeros biodegradáveis, enzimas, dentre outros materiais, são amplamente utilizados para cultura de células e engenharia de tecidos. Para a produção de carne cultivada, essas moléculas devem ser derivadas de fontes baratas e livres de animais. (J. Xu et al., 2016)

3.2 NANOFIBRAS POLIMÉRICAS

O nanomaterial pode ser definido como um material natural, incidental ou fabricado que contém partículas, em um estado não ligado ou como um agregado ou como um aglomerado e em que, para 50% ou mais das partículas na distribuição de tamanho numérico, uma ou mais dimensões externas estão na faixa de tamanho 1 nm - 100 nm. (Rauscher et al., 2015)

A ciência que envolve o desenvolvimento e estudos dos nanomateriais compreende uma ampla variedade de materiais interessantes, com excelentes propriedades e características físicas e químicas. Esses materiais incluem nanopartículas, nanofios unidimensionais, nanofibras, nanotubos e nanopartículas bidimensionais. Considerados nanomateriais com grande potencial de aplicação, as nanofibras destacam-se entre os demais. Uma das características mais marcantes das nanofibras é a sua excepcional relação área/volume de superfície e sua alta porosidade, tornando-as candidatas robustas e atraentes para muitas aplicações avançadas.(Kenry & Lim, 2017)

Nanofibras vem sendo produzidas a partir de uma grande variedade de materiais, como polímeros naturais, polímeros sintéticos, nanomateriais à base de carbono, nanomateriais compostos e nanomateriais semicondutores. O rápido avanço em tecnologias de síntese e caracterização de nanofibras nos últimos anos tornaram delas um material amplamente aplicado em setores de alta tecnologia. Enormes esforços foram concentrados em explorar as possíveis aplicações funcionais das nanofibras, incluindo geração e armazenamento de energia, cuidados de saúde, engenharia de tecidos e tratamento de água. (Kenry & Lim, 2017)

Os *scaffolds* produzidos utilizando-se nanofibras como matéria base servem como uma excelente estrutura para adesão, proliferação e diferenciação celular. Portanto, as nanofibras, independentemente de seu método de síntese, têm sido usadas como *scaffolds* para a engenharia de tecidos musculoesqueléticos (incluindo ossos, cartilagens, ligamentos e músculos esqueléticos), engenharia de tecidos vasculares, engenharia de tecidos da pele, engenharia de tecidos neurais e como dispositivo de entrega controlada de drogas. (Vasita & Katti, 2006)

O desenvolvimento e a pesquisa de técnicas capazes de produzir nanofibras poliméricas aprimorou o escopo para a fabricação de *scaffolds* porosos que possam imitar a arquitetura do tecido humano natural na escala nanométrica. A alta área de superfície em relação ao volume das nanofibras combinada com sua estrutura microporosa favorece sua aplicação como suporte mecânico durante a cultura celular. (Vasita & Katti, 2006)

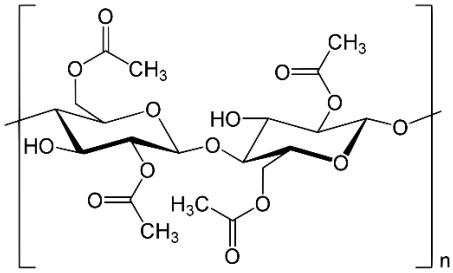
3.2.1 ACETATO DE CELULOSE

O acetato de celulose (AC) é um importante polímero biocompatível que tem sido utilizado em um amplo campo de aplicações. A aplicação biotecnológica desses polímeros está completamente associada à sua biodegradabilidade, processabilidade, solubilidade e aplicabilidade. De acordo com seu processamento, o AC pode ser usado para diversas aplicações, como fibras, filmes, membranas, dentre outras aplicações. (N. Bifari et al., 2016)

A variação acetilada da celulose, acetato de celulose é considerado um bom candidato para aplicações biomédicas devido ao seu baixo custo, hidrofilicidade,

não toxicidade, boa processabilidade e propriedades biodegradáveis e renováveis. A existência de grupos como grupos hidroxila, carboxila e éter na cadeia principal do acetato de celulose fornece as características iônicas e, como resultado, torna-se um excelente candidato a matéria-prima para a confecção de *scaffolds*. A figura 4 exibe a molécula de acetato de celulose. (Konwarh et al., 2013)

Figura 4 - Molécula de acetato de celulose.



Fonte: Domínio público.

A solubilidade do acetato de celulose depende, entre outras coisas, do grau de substituição, AC com grau de substituição de 2-2,5 é solúvel em acetona, dioxano e acetato de metila. Tipos acetilados com elevados valores de grau de substituição são solúveis em diclorometano. O ácido acético é geralmente um bom solvente para acetatos de celulose. (Fischer et al., 2008)

Poucos trabalhos discutem a influência dos parâmetros de eletrofiação na natureza das fibras de AC produzidas. Verificou-se que o diâmetro médio das nanofibras AC eletrofiadas aumenta com o aumento da umidade. Por outro lado, a temperatura determina a taxa de evaporação do solvente e a viscosidade da solução polimérica. Verificou-se que esses dois parâmetros influenciam profundamente o diâmetro da fibra do AC eletrofiada. (Konwarh et al., 2013)

A celulose é um material hidrofílico, mas insolúvel em água devido à extensa rede de ligação de hidrogênio. Quando degradada por hidrólise, a celulose forma glicose, tornando os produtos de degradação bioabsorvíveis. Para expandir as opções de processamento, derivados de celulose como acetato de celulose podem ser transformados em celulose por regeneração em álcalis sem afetar a estrutura da fibra. (Rodríguez et al., 2014)

Experimentos identificaram que o principal mecanismo de degradação para o acetato de celulose deve começar com uma etapa inicial de desacetilação por hidrólise química e acetilesterases, permitindo assim a degradação da estrutura da celulose com a celulase. Estudos comprovaram a evidência de que os mecanismos de biodegradação devam ser diferentes para os polímeros de celulose em contra-partida aos polímeros a base de acetato de celulose. (Puls et al., 2011)

A celulose é facilmente biodegradada por organismos que utilizam enzimas celulase, mas devido aos grupos acetil adicionais, o acetato de celulose requer a presença de esterases na primeira etapa da biodegradação. Uma vez que a desacetilação parcial foi realizada por enzimas ou por hidrólise química parcial, a cadeia polimérica de celulose do polímero é facilmente biodegradada.(Puls et al., 2011)

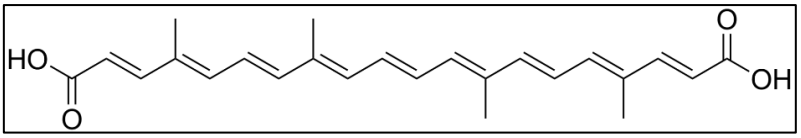
Estudos conduzidos por Barud et al (2008) mostram que a caracterização de amostras de acetato de celulose acetiladas em menor tempo mostrou a formação de uma estrutura heterogênea e, paralelamente, foi produzida uma estrutura mais homogênea para amostras preparadas com um tempo de acetilação mais longo. Esta diferença estrutural altera o comportamento térmico das amostras da AC. Os resultados de caracterização térmica revelaram que amostras submetidas a um tempo de acetilação mais longo exibem maior cristalinidade e consequente maior estabilidade térmica do que amostras submetidas a um tempo de acetilação mais curto. (Barud et al., 2008)

Segundo Bifari et al, vários estudos têm sido orientados não apenas para melhorar as diferentes propriedades do AC tradicional, mas também para promover o desenvolvimento do nanocompósitos de acetato de celulose. O acetato de celulose provou ser biocompatível e não tóxico, sendo recomendado na utilização na forma de nanocompósitos e dispositivos biomédicos. Recentemente, um número significativo de estudos foram publicados em nanocompósitos de AC, no qual observaram que os nanocompostos de AC apresentam propriedades superiores em ensaios biológicos in vitro em comparação com AC puro.

3.3 EXTRATO DE *BIXA ORELLANA*

A *Bixa orellana* é um arbusto nativo da região do norte da América do sul, um corante natural pode ser obtido das camadas externas das sementes de sua planta. Suas sementes e seus extratos são designados coletivamente como E160b e são permitidos como aditivos alimentares na União Europeia e em outros lugares, e têm amplo uso na indústria de alimentos para a coloração de muitos produtos, incluindo farinha e açúcar, produtos de confeitaria, produtos lácteos e salgados, refrigerantes e peixe. Os principais componentes da semente de *Bixa orellana* são os carotenoides bixina (Figura 5) e norbixina (Figura 6). Embora sejam quimicamente muito semelhantes, as diferenças em suas propriedades químicas apresentam vários desafios ao químico analítico em relação à estereoquímica, solubilidade, comportamento cromatográfico e estabilidade. (Scotter, 2009)

Figura 5 - Molécula de Bixina.



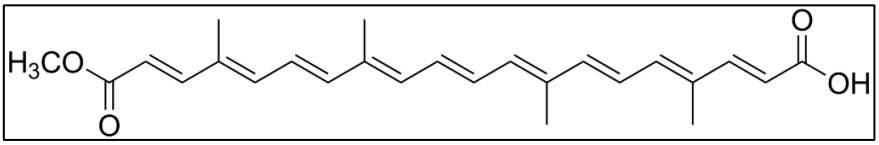
Fonte: Domínio público.

Em geral, bixina, ácidos fenólicos, tocotrienóis (isômero menos proeminente da vitamina E), ligninas e flavonoides são os principais compostos bioativos que compõe o extrato de *Bixa orellana*. O extrato das sementes de *Bixa orellana* contém principalmente bixina e compostos de polifenóis responsáveis pelas atividades antioxidantes e antimicrobianas. Particularmente, a bixina é uma molécula altamente conjugada e os compostos de polifenóis apresentam grupos hidroxila em sua estrutura, capazes de capturar elétrons, extinguindo o oxigênio, desativando o estado excitado de sensibilizadores, que geralmente estão associados a fotos sensibilização e aos radicais livres radicais durante seus estados de transição. (Quintero Quiroz et al., 2019)

Estudos realizados por Khor et al demostraram que a vitamina E possui influência sob a diferenciação de mioblastos, na qual mioblastos senescentes mostraram uma morfologia celular que se assemelhava à de células jovens, onde

mais células fusiformes estavam presentes, sugerindo melhora na fisiologia celular por ambos os tratamentos com vitamina E.

Figura 6 - Molécula de norbixina.



Fonte: Domínio público.

As sementes da *Bixa orellana* está entre várias especiarias cujas capacidades antioxidantes foram comparadas por Tomé et al com os antioxidantes alimentares permitidos na peroxidação lipídica. A semente de *Bixa orellana* foi relatada como tendo uma maior capacidade antioxidante do que o hidroxilanisol butilado (BHA) ou o hidroxitolueno butilado (BHT) na prevenção de danos à desoxirribose por radicais hidroxila. (Martínez-Tomé et al., 2001)

Uma ampla gama de atividades biológicas foi descrita na literatura a respeito da utilização do extrato de *Bixa orellana*, incluindo propriedades antioxidantes e de eliminação de radicais livres, atividades antibacterianas e antifúngicas, atividade anti-inflamatória, atividade anticancerígena, motilidade gastrointestinal aprimorada e atividades neuro farmacológicas e anticonvulsivantes através de observação detalhada com respeito a seus usos. (Shahid-ul-Islam et al., 2016)

Embora estudos realizados com a *Bixa orellana* tenham confirmado sua ampla gama de atividades biológicas, são necessárias pesquisas mais rigorosas para explorar os constituintes químicos individuais e seus mecanismos de ação, a fim de introduzir esta planta na indústria da engenharia de tecidos e no ramo da carne cultivada. A maioria dos estudos demonstram que os extratos de *Bixa orellana* possuem atividades biológicas potentes em comparação a medicamentos utilizados geralmente, o que incentiva ainda mais sua exploração. (Shahid-ul-Islam et al., 2016)

3.4 ELETROFIAÇÃO

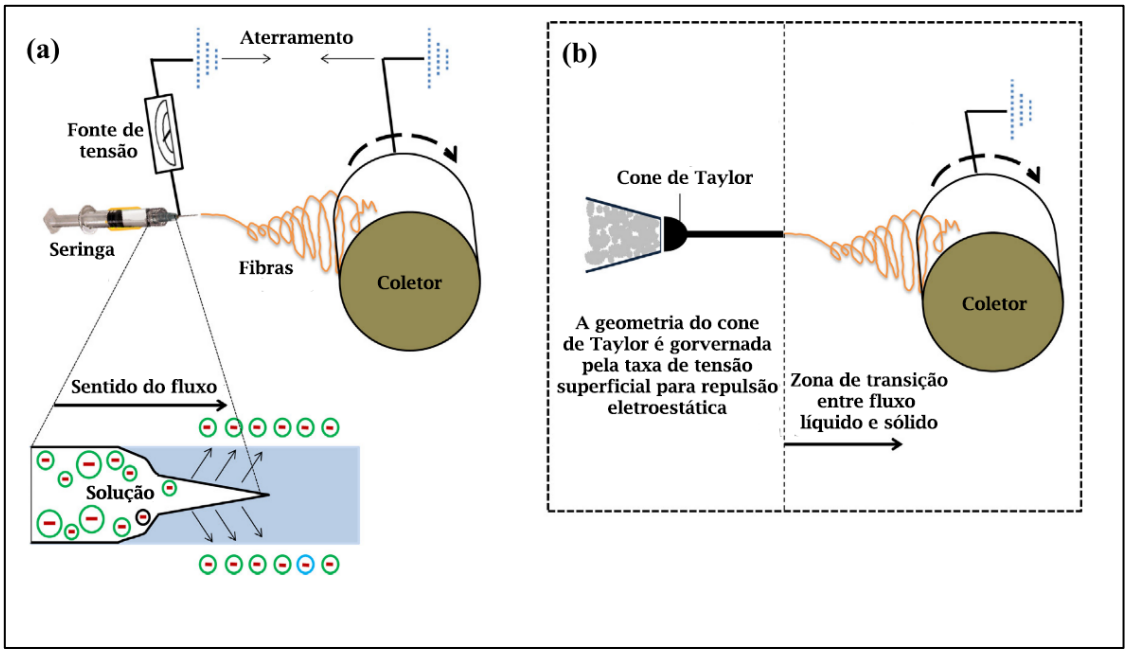
3.4.1 CONTEXTO HISTÓRICO E PRINCIPIO DE FUNCIONAMENTO

Na literatura, várias técnicas são relatadas para a fabricação de nanomateriais. Desde o final do século 20, a eletrofiação vem ganhando cada vez mais atenção na comunidade científica e na indústria e é considerada um empreendimento científico e comercial vital com benefícios econômicos globais. Isso inclui síntese assistida por modelos, técnicas de processamento de desenhos, automontagem, separação de fases, fundição de solventes e eletrofiação. Com o crescente conhecimento sobre nanotecnologia, especialmente relacionado a nanoestruturas, nanopartículas e, mais especificamente, a preparação de *scaffolds*, a eletrofiação tornou-se a técnica mais adotada com freqüência para a produção destas estruturas. (Haider et al., 2018a)

A criação de fibras, eletrificando um fluido, remonta aos últimos anos dos anos 1800. Máquinas eletrostáticas que geravam potenciais de centenas de quilovolts estavam então disponíveis em muitos laboratórios. O efeito dos campos elétricos nos materiais era de interesse contemporâneo. Efeitos piezoelétricos foram descobertos e caracterizados. (Reneker & Hao, 2006)

A eletrofiação é um processo interessante para a fabricação de fibras com diâmetros médios na faixa de micrômetros a nanômetros. Neste processo, uma cadeia contínua de um líquido de polímero (isto é, solução ou fusão) é puxada através de um fiandeiro por altas forças eletrostáticas para se depositar aleatoriamente em um coletor aterrado como uma esteira não tecida. Essas fibras têm várias características interessantes, por exemplo, elevada área superficial, um pequeno tamanho de poro interfibroso com alta porosidade, vastas possibilidades de funcionalização da superfície. (Tungprapa et al., 2007) A Figura 7 esquematiza a produção de nanofibras através da técnica de eletrofiação.

Figura 7 - Representação esquemática da técnica de eletrofiação e do fenômeno elétrico do cone de Taylor



Fonte: Adaptada de Haider 2018.

O processo inicia quando cargas elétricas se movem para a solução de polímero através da agulha metálica. Isso causa instabilidade na solução de polímero como resultado da indução de cargas na gota de polímero. Ao mesmo tempo, a repulsão recíproca de cargas produz uma força que se opõe à tensão superficial e, finalmente, a solução de polímero flui na direção do campo elétrico (Figura 07b). Um aumento somatório ao campo elétrico faz com que a gota esférica se deforme e assuma uma forma cônica. Neste estágio, as nanofibras são geradas a partir da gota cônica de polímero (cone de Taylor), que é coletada no coletor metálico, mantido a uma distância otimizada. Um jato de carga estável pode ser formado apenas quando a solução de polímero possui força coesiva suficiente. Durante o processo, as forças de carga interna e externa causam o chicote do jato de líquido na direção do coletor. Esse movimento de chicote permite que as cadeias poliméricas da solução se estendam e deslizem entre si, o que resulta na criação de fibras com diâmetros pequenos o suficiente para serem chamados de nanofibras. (Haider et al., 2018a)

A eletrofiação é uma complexa técnica de produção de nanofibras poliméricas, na qual existem diversos fatores que influenciam nos aspectos físicos, químicos

e formológicos finais que a nanofibra produzida apresenta. Parâmetros de processo como a tensão aplicada, tipo do coletor empregado, distância entre o bocal e o coletor, condutividade e viscosidade da solução, temperatura e umidade do ambiente devem ser otimizados a fim de controlar os apectos da nanofibra. (Tungprapa et al., 2007)

3.4.2 COLETOR

As propriedades físicas das fibras obtidas pela técnica de eletrofiação (como morfologia do cristal e orientação molecular) são afetadas pela natureza dos coletores. O coletor mais comumente utilizado é o coletor de tambor rotativo, que é mostrado na Figura 8. Com este coletor (devido à velocidade do tambor), o diâmetro da fibra pode ser controlado. O disco rotativo é usado para criar fibras alinhadas uniaxiais. (Mirjalili & Zohoori, 2016)

Figura 8 - Diferença entre os coletores utilizados na eletrofiação.



Fonte: (Mirjalili & Zohoori, 2016)

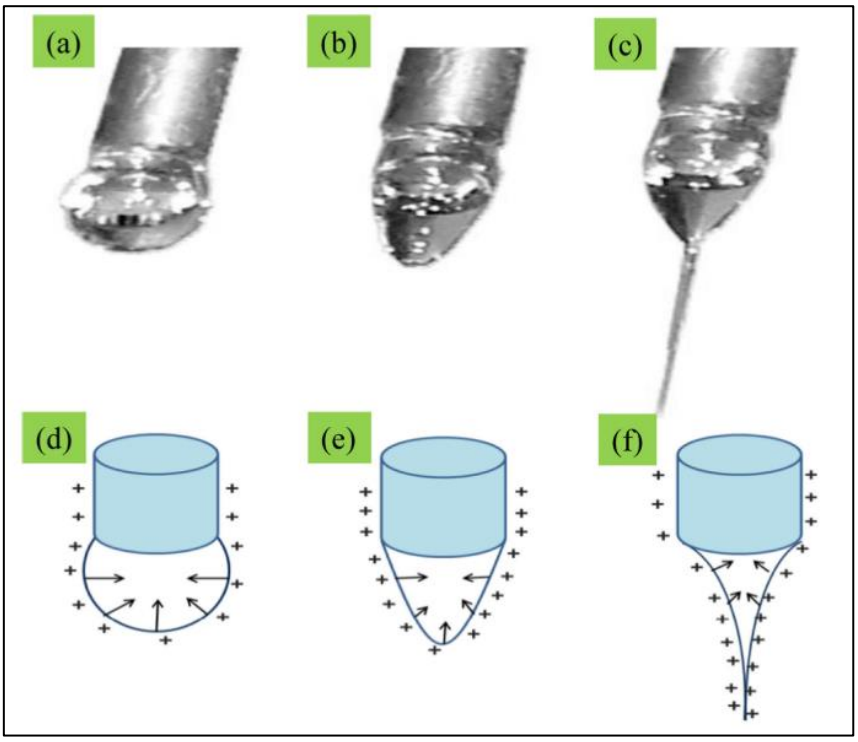
A velocidade do coletor pode melhorar a orientação do cristal das fibras devido ao alinhamento das cadeias moleculares do polímero na direção do eixo da fibra, que é obtido devido à força da velocidade de rotação do coletor. Deve-se mencionar que o uso do coletor rotacional de alta velocidade pode causar o efeito da evaporação do solvente, acarretando modificações nos aspectos da nanofibra. (Mirjalili & Zohoori, 2016)

3.4.3 TENSÃO APLICADA

Geralmente, é um fato conhecido que o fluxo de corrente de uma fonte de alimentação de alta tensão para uma solução através de uma agulha metálica

fará com que uma gota esférica se deforme em um cone de Taylor e forme nanofibras a uma tensão crítica (Fig. 9 a-c). Este valor crítico da tensão aplicada varia de polímero para polímero. A formação de nanofibras de menor diâmetro com um aumento na tensão aplicada é atribuída ao alongamento da solução polimérica em correlação com a repulsão de carga no jato polimérico. (Laudenslager e Sigmund 2012)

Figura 9 - Efeito da tensão sobre a formação do cone de Taylor



Fonte: Laudenslager e Sigmund, 2012

A aplicação de alta tensão à solução de polímero mantida por sua tensão superficial cria uma carga na superfície do líquido, como indicado na Figura 9 d-f. A repulsão de carga recíproca e a contração das cargas de superfície no contra-eletrodo causam uma força diretamente oposta à tensão de superfície. À medida que a intensidade do campo elétrico aumenta, a gota hemisférica formada na ponta da agulha é transformada em formato cônico. (Laudenslager e Sigmund 2012)

Um aumento na tensão aplicada além do valor crítico resultará na formação de esferas ou nanofibras com beads. O aumento no diâmetro e na formação de gotas ou nanofibras com beads com um aumento na tensão aplicada são

atribuídos à diminuição no tamanho do cone de Taylor e ao aumento na velocidade do jato para a mesma vazão. (Haider et al., 2018a)

A intensidade crítica do campo elétrico para nanofibras de eletrofiação é proposta como:

$$E = \sqrt[4]{4\gamma\rho g/\varepsilon^2} \qquad (1)$$

Onde ρ é a densidade da massa líquida, g é a aceleração da gravidade, γ é a tensão superficial da solução, ε é a permissividade. (Sun et al., 2014)

3.4.4 DISTÂNCIA ENTRE BOCAL E COLETOR

O outro parâmetro que afeta a estrutura, morfologia, propriedades físicas e químicas das fibras eletro-fiadas é a distância entre o bocal da agulha e o coletor. Tem efeito direto nas propriedades finais da fibra, com base na taxa de evaporação, tempo de deposição e intervalo de inconsistência. Os estudos mostram que, ao diminuir a distância entre o bico e o coletor, temos a fibra eletro-fiada úmida, com estrutura frisada. Por outro lado, o estudo mostra que, para dispersão aquosa de polímero, é necessária mais distância para secar a fibra. (Mirjalili & Zohoori, 2016)

3.4.5 TAXA DE VAZÃO DA SOLUÇÃO

A taxa de vazão da solução polimérica através da ponta da agulha metálica tem grande influência sobre a morfologia das nanofibras eletrofiadas. Nanofibras eletro-fiadas uniformes sem beads podem ser preparadas através de uma taxa de fluxo crítica para uma solução polimérica. Este valor crítico varia com o sistema de polímero, a proporção polímero/solvente determina a viscosidade do sistema polimérico. Aumentar a taxa de fluxo acima do valor crítico pode levar à formação de gotas. Em um estudo realizado por Megelski em 2002, no caso de poliestireno, quando a taxa de fluxo foi aumentada para 0,10 mL/min, foi observada a formação de esferas. No entanto, quando a taxa de fluxo foi reduzida para 0,07 mL/min, formaram-se nanofibras sem grânulos. Aumentar a vazão além de um valor crítico não apenas leva ao aumento do tamanho dos poros e do diâmetro da fibra, mas também à formação de gotas (devido à secagem incompleta do jato de nanofibra durante o vôo entre a ponta da agulha e o coletor metálico) (Megelski et al., 2002)

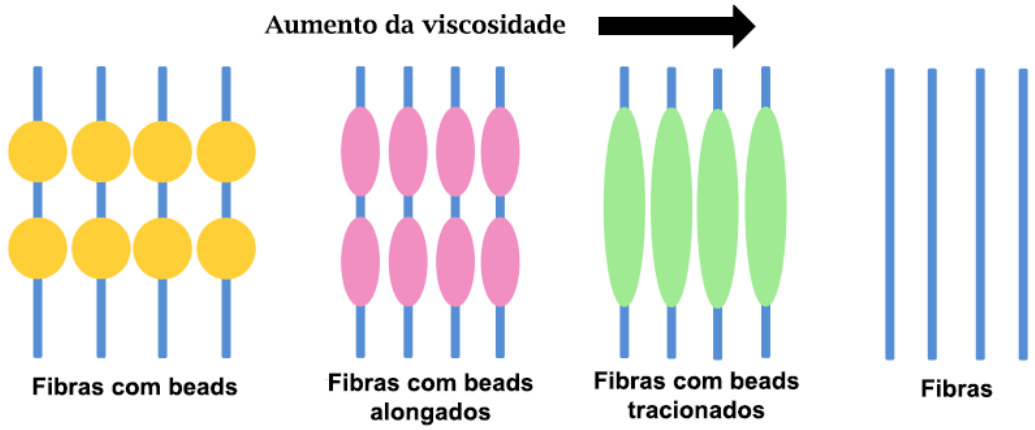
3.4.6 CONDUTIVIDADE DA SOLUÇÃO

Resultados encontrados por Angammana em 2011 mostraram que a corrente média do jato inicialmente aumenta com o aumento da condutividade da solução e, posteriormente, diminui ligeiramente. Por outro lado, o diâmetro médio da fibra diminui com o aumento da condutividade da solução, refletindo em uma relação de lei de energia. Esses comportamentos podem ser totalmente explicados pela distribuição da carga da superfície em torno do jato da eletrofiação e pela variação no campo elétrico tangencial ao longo da superfície do fluido. Soluções de polímeros com condutividade muito baixa não conseguem eletrofiar porque não há carga superficial na superfície da gota de fluido para formar um cone de Taylor. Da mesma forma, soluções com condutividade muito alta também não formarão um cone de Taylor por causa do campo elétrico tangencial enfraquecido ao longo da superfície da gota de fluido. Os outros efeitos que podem ser observados quando a condutividade da solução de polímero é aumentada são a formação de multi-jatos na gota de fluido e as saliências na fibra. (Angammana, 2011)

3.4.7 CONCENTRAÇÃO E VISCOSIDADE DA SOLUÇÃO POLIMÉRICA

O processo de eletrofiação depende do fenômeno do alongamento uniaxial de um jato polimérico carregado eletricamente. O alongamento do jato carregado é significativamente afetado pela alteração da concentração da solução polimérica. Por exemplo, quando a concentração da solução polimérica é baixa, o campo elétrico aplicado e a tensão superficial fazem com que as cadeias emaranhadas de polímeros se quebrem em fragmentos antes de atingir o coletor. Esses fragmentos causam a formação de esferas ou nanofibras com beads. Aumentar a concentração da solução polimérica levará a um aumento na viscosidade, o que aumenta o emaranhamento da cadeia entre as cadeias poliméricas. Esses emaranhados de cadeia superam a tensão superficial e, finalmente, resultam em nanofibras elétricas uniformes sem *beads*. (Haider et al., 2018a) A figura 10 esquematiza o efeito do aumento da viscosidade pela presença de *beads* na estrutura da nanofibra.

Figura 10 - Efeito do aumento da viscosidade sobre a morfologia da fibra.



Fonte: Adaptada de (Haider et al., 2018b)

Além disso, aumentar a concentração além de um valor crítico (a concentração na qual são formadas nanofibras uniformes sem beads) dificulta o fluxo da solução através da ponta da agulha (a solução polimérica seca na ponta da agulha e precipita em estado sólido, bloqueando a passagem de solução, o que pode acarretar a interrupção da técnica), o que em última análise, resulta em nanofibras defeituosas ou com beads. (Haider et al., 2018a)

3.4.8 TEMPERATURA E UMIDADE

Além dos parâmetros de eletrofiação e solução, recentemente foi relatado que fatores ambientais como a umidade relativa e a temperatura durante e realização da técnica também afetam o diâmetro e a morfologia das nanofibras. A umidade causa alterações no diâmetro das nanofibras, controlando o processo de solidificação do jato carregado. Este fenômeno é, no entanto, dependente da natureza química do polímero. A temperatura causa dois efeitos que proporcionam a alteração do diâmetro médio das nanofibras: primeiro, aumenta a taxa de evaporação do solvente e segundo, diminui a viscosidade da solução. O aumento na evaporação do solvente e a diminuição da viscosidade da solução funcionam por dois mecanismos adequados, no entanto, ambos levam à diminuição do diâmetro médio da fibra. (Huan et al., 2015)

3.5 FIAÇÃO POR JATO ROTATIVO (ROTARY JET SPINNING)

3.5.1 CONTEXTO HISTÓRICO E PRINCÍPIO DE FUNCIONAMENTO

A automontagem, a separação de fases e a eletrofiação são comumente usadas para gerar *scaffolds* nanofibrosos. Entre esses, a eletrofiação é a estratégia mais

popular, produzindo fibras ultrafinas ao carregar eletricamente uma gota de líquido polimérico. Apesar da versatilidade e popularidade dos campos elétricos de alta tensão, a técnica de eletrofiação possui um controle impreciso sobre a orientação das fibras, sensibilidade à variabilidade na condutividade da solução, baixa taxa de produção, e a dificuldade em fabricar estruturas tridimensionais (3D) limitam sua aplicação. Existem poucas estratégias para expandir a versatilidade da eletrofiação. No entanto, a necessidade de métodos confiáveis para gerar fibras poliméricas de micro a nanoescala bem caracterizadas e alinhadas persiste. (Badrossamay et al., 2010)

A fiação por jato rotativo (RJS) é conhecido por alguns nomes na comunidade de pesquisa, no entanto, o título do RJS resume o processo melhor do que a maioria dos casos. O RJS também é conhecido como centrifugação, rotação do rotor e Forcespinning™. As patentes iniciais foram registradas por Lozano e Sarkar da Universade do Texas. (Rogalski et al., 2017)

O maior número de registros de patentes vem da China e dos Estados Unidos (Tabela 01). A quantidade de patentes seguiu uma tendência de crescimento com o passar do tempo, demonstrando interesse pela tecnologia por diversos institutos de pesquisa, universidades e startups de diversas nacionalidades, indicando um interesse contínuo na tecnologia, com 2016 sendo o maior número até o momento.

Tabela 1 – Lista de países com a maior quantidade de patentes relacionadas a equipamentos capazes de produzir fibras a partir de dispositivos rotativos de 2000 até 2016

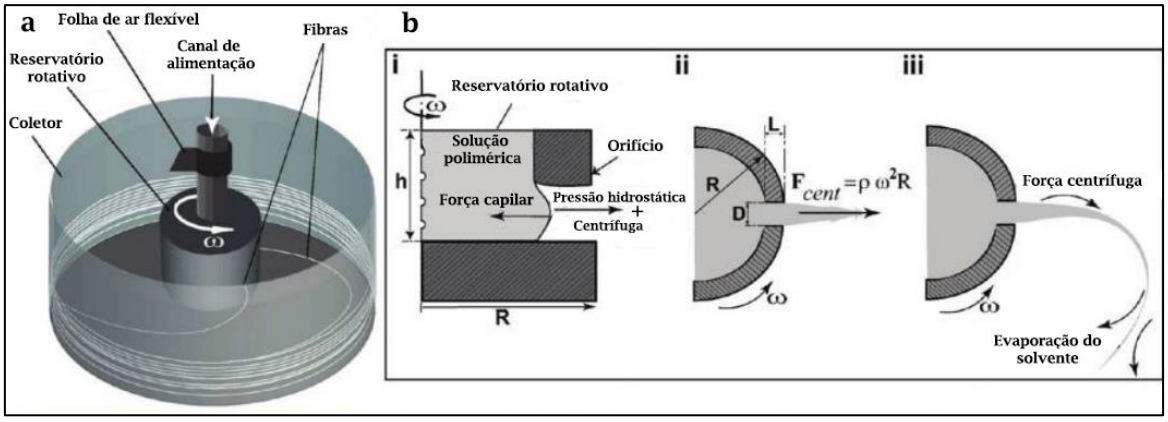
País	**Total**
China	126
Estados Unidos	88
Coréia do sul	56
Organização mundial da propriedade intelectual	50
Japão	39
Escritório de patentes europeias	35
Alemanha	16
Espanha	13

Áustria	10
Canada	9
Austrália	7

Fonte: Próprio autor, referência: (Rogalski et al., 2017)

Enquanto que a eletrofiação é a técnica mais comumente usada para produção de nanofibras seja para pesquisa, ou para a comercialização, a fiação por jato rotativo surgiu como uma técnica alternativa para fabricar fibras de diâmetro sub-micrométrico. Usando forças inerciais rotacionais para extrusão de jatos de polímero viscoso, as nanofibras são fiadas a taxas de produção elevadas e apresentam alta taxa de alinhamento. O trabalho desenvolvido por Mellado e sua equipe (2011) consiste em um reservatório perfurado contendo soluções de polímeros ligadas a um motor. Quando o reservatório é rotacionado em torno de seu eixo de simetria a uma taxa maior que um limite determinado pelo equilíbrio entre as forças capilar e centrífuga, um jato viscoso é ejetado de um pequeno orifício. Este jato é jogado para fora ao longo de uma trajetória espiral como evaporador de solvente, devido à sua área superficial relativamente alta. Enquanto em movimento, ele é estendido por forças centrífugas e o solvente evapora. O jato viaja até atingir as paredes do coletor cilíndrico estacionário. Uma vez lá, o solvente restante evapora, as fibras solidificam e podem ser coletadas. (Mellado et al., 2011) A figura 11 apresenta uma representação esquemática da técnica de RJS.

Figura 11 - Representação esquemática da técnica de fiação por jato rotativo



Fonte: Adaptada de Badrossamay, 2010.

O processo de produção de fibra é composto por iniciação por jato para induzir o fluxo da solução de polímero através do orifício, extensão por jato para aumentar a área superficial da fibra produzida e evaporação de solvente para solidificar e encolher o jato de polímero. Durante a primeira etapa (Figura 11-i), uma combinação de pressão hidrostática e pressão centrífuga na extremidade do capilar excede as forças capilares resistentes ao fluxo e impulsiona a solução do polímero através do capilar do bico como um jato. A força centrífuga radial externa estica o jato de polímero à medida que é projetado em direção à parede do coletor (Figura 11-ii), mas o jato viaja em uma trajetória ondulada devido à inércia dependente de rotação. O alongamento do jato de polímero extrudado é fundamental para reduzir o diâmetro do jato ao longo da distância do bico ao coletor. Simultaneamente, o solvente na solução de polímero evapora, solidificando e contraindo o jato (Figura 11-iii). A taxa de evaporação do solvente depende de sua volatilidade. Se o solvente é altamente volátil, os jatos formam fibras mais espessas, pois o solvente que evapora rapidamente potencializa a solidificação rápida, dificultando a extensão do jato. (Badrossamay et al., 2010)

3.5.2 COMPARAÇÃO COM OUTRAS TÉCNICAS

Muitas técnicas além do RJS podem ser usadas para criar nanofibras poliméricas, mas nenhuma com capacidade tão alta para aplicações industriais usando um baixo consumo de energia. Outros métodos de produção de nanofibras incluem síntese por template, separação de fases, automontagem, eletrofiação, e fiação por fusão. Cada um desses processos possui vantagens e desvantagens distintas, especificado por Nayak et al (2012) em seu artigo de revisão a respeito das técnicas de produção de nanofibras poliméricas. Embora o RJS às vezes seja rotulado como amigo do meio ambiente termos amigáveis, o processo só pode ser creditado como tal se o solvente for reciclado ou não for usado, como o RJS fundido. No entanto, métodos alternativos usados para produzir fibras a partir do fundido podem usar significativamente mais energia, tornando-os menos ecológicos. Em todas essas técnicas de processamento por fusão, a degradação térmica é uma possibilidade, mas pode ser superada usando estabilizadores térmicos. (Nayak et al., 2012)

3.5.3 PARÂMETROS DO PROCESSO

Durante a produção de nanofibras, os parâmetros de fiação influenciam significativamente a morfologia e o diâmetro das fibras, como velocidade de rotação, viscoelasticidade do polímero, taxa de evaporação (para soluções), temperatura (para derretimento) e distância de coleta. Investigações sistemáticas sobre o impacto e a interação dos parâmetros nas propriedades das fibras foram estudadas nos últimos anos. No caso da fiação da solução, a concentração da solução e a velocidade de rotação foram consideradas os principais fatores entre os parâmetros mencionados.(H. Xu et al., 2014)

Na fiação do jato rotativo, existem várias variáveis que podem ser ajustadas para definir as propriedades finais da fibra produzida, mas nem todas elas influenciam o diâmetro da fibra ou a formação da manta. Os parâmetros de processamento que demonstraram afetar o diâmetro da fibra são a concentração da solução de polímero e o tamanho do bocal. (Rogalski et al., 2018)

3.5.4 FORÇA CENTRÍFUGA E TENSÃO SUPERFICIAL

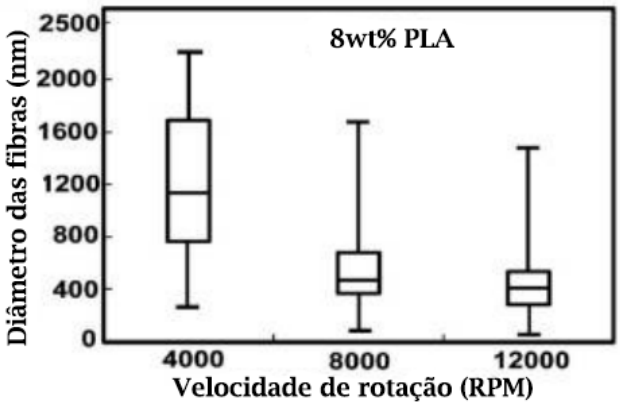
Com base em seus estudos, Badrossamay e sua equipe concluíram que o mecanismo de formação das nanofibras pela técnica de RJS é a otimização das forças centrífugas concorrentes e da tensão superficial do jato. A tensão superficial causa instabilidade do jato e formação de beads, enquanto a força centrífuga acelera um fluxo delgado de líquido, onde a evaporação do solvente e o alongamento da cadeia do polímero ocorrem simultaneamente. Assim, uma força centrífuga mais alta induz maior extensão e impulso do jato de polímero, o que resulta em diâmetros de fibra mais finos. (Badrossamay et al., 2010)

3.5.5 VELOCIDADE DE ROTAÇÃO

Uma hipótese foi criada por Badrossamay a respeito do efeito em que a rotação aplicada no processo de RJS causa sobre a morfologia final das nanofibras produzidas. Para testar essa hipótese, primeiro a velocidade de rotação, mantendo uma concentração constante da solução de PLA. A força centrífuga por volume da solução aumenta significativamente com a velocidade de rotação, enquanto a tensão superficial permanece a mesma. A distribuição do diâmetro da fibra é muito maior em velocidade de rotação mais baixa e a probabilidade de

formação de esferas é maior. (Badrossamay et al., 2010) A figura 12 esboça os resultados obtidos em sua pesquisa. Identifica-se que para a rotação de 12000 RPM, tanto o tamanho médio de fibra obtido, quanto a distribuição de tamanho foram menores em relação as rotações menores.

Figura 12 - Variação do diâmetro de fibras de PLA em função da velocidade de rotação em RJS.



Fonte: Adaptado de Badrossamay et al, 2010

A velocidade de rotação é o que promove o processo, e aumentar esta variável trará uma força centrífuga maior, aumentando a força com a qual o polímero é expelido do orifício do equipamento. Essa premissa básica do RJS é utilizada por Mellado et al. em sua equação derivada para determinar o limiar crítico de velocidade de rotação, conforme indicado abaixo. (Mellado et al., 2011)

$$\omega_{th} = \sqrt{\frac{\sigma}{a^2 \rho S_0}} \qquad (2)$$

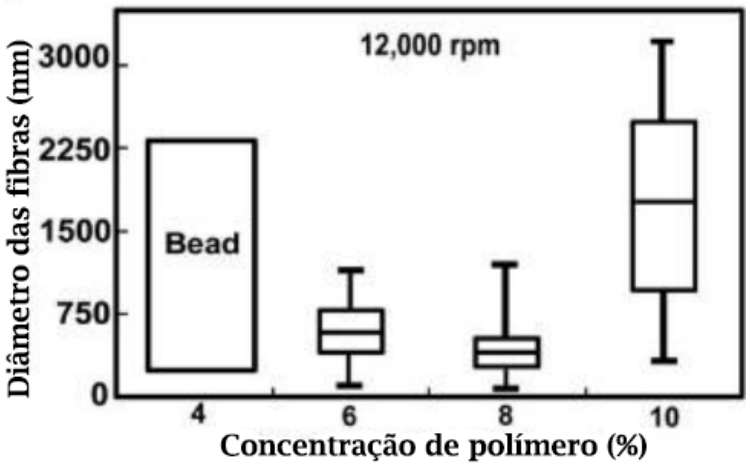
A equação significa que, para um dado polímero que virá a ser processado, cada limiar será diferente com base nas medições de tensão (σ), densidade (ρ), diâmetro do orifício (a) e distância da linha central à abertura do orifício (S_0) Com essas medidas obtidas previamente, a teoria prevê que uma velocidade rotacional crítica deve ser selecionada para uma fiação via fusão ou solução (Rogalski et al., 2017)

3.5.6 CONCENTRAÇÃO DA SOLUÇÃO POLIMÉRICA

Experimentos realizados por Badrossamay utilizando PLA como material de estudo, foram esclarecedores quanto a questão da influência da concentração

da solução em um processo de fiação por jato rotativo. Sua hipótese foi de que a tensão superficial da solução de polímero e sua tendência a induzir beads pudessem ser compensadas variando a concentração de polímero. A uma velocidade de rotação constante, em baixas concentrações de polímero (4% em peso), o RJS resultou fibras com beads. À medida que se aumentou a concentração de polímero (10% em peso), a concentração aumentada de polímero e a viscosidade da solução estabilizaram o jato, resultando na formação de fibras (Figura 13).

Figura 13 - Variação do diâmetro de fibras de PLA em função da concentração da solução em RJS.



Fonte: Adaptado de Badrossamay et al, 2010.

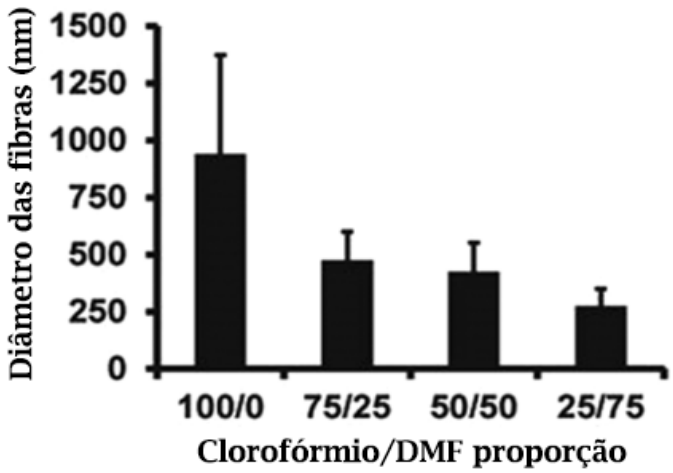
Esses dados demonstram que a formação de fibras é uma função da concentração de polímero, onde uma faixa ideal de concentrações aumenta a probabilidade de emaranhamento da cadeia de polímeros, resistindo ao rebordo e resultando em fibras finas. Além dessa faixa ideal (10% em peso e superior), a viscosidade mais alta da solução limita a evaporação e a estricção do solvente, resultando em fibras mais espessas. (Badrossamay et al., 2010)

3.5.7 TAXA DE EVAPORAÇÃO DO SOLVENTE

A hipótese principal consiste em que a evaporação mais rápida do solvente leva ao aumento da viscosidade do jato e, portanto, a diâmetros de fibra maiores. Para provar tal hipótese Glolecki et al testaram empiricamente está influência em experimentos com soluções de PLA com clorofórmio e DMF, modificando as proporções de solvente, de forma a alterar a taxa de evaporação. O clorofórmio

(pressão parcial de vapor P = 21,2 kPa) é um solvente orgânico mais volátil que o DMF (pressão parcial de vapor P = 0,36 kPa) (Golecki et al., 2014) A figura 14 esboça a infuência da taxa de evaporação do solvente em relação ao diâmetro das fibras produdizas pela técnica RJS.

Figura 14 - Influência da taxa evaporação do solvente sobre o diâmetro das fibras produzidas por RJS



Fonte: Adaptado de Golecki et al, 2014.

Os resultados representados sugerem que um solvente mais volátil leva a uma evaporação mais rápida do solvente, o que aumenta a concentração e a viscosidade do polímero durante a secagem, resultando em diâmetros de fibra maiores. Esses resultados sugerem que o diâmetro da fibra pode variar independentemente da viscosidade da solução e velocidade de rotação especificamente. (Golecki et al., 2014)

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS UTILIZADOS

4.1.2 PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS NANOFIBRAS

- Acetato de celulose em pó SIGMA-ALDRICH - Mn 30000 por GPC, densidade 1,3g/mL;
- Acetona Synth - 99,5% de pureza - PM: 58,08;
- Dimetilformamida Dinâmica Química Contemporânea Ltda - 99,8% de pureza - PM: 73,09;
- Extrato de *Bixa orellana* – Amazon Forest Trading
- Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM) Gibco-Invitrogen;
- Soro fetal bovino (SBF) Gibco-Invitrogen;
- Solução de penicilina-estreptomicina Gibco-Invitrogen;
- Brometo de 3(4,5-dimetiltiazolil-2)-2,5-difenilterazólio (MTT) Gibco-Invitrogen.

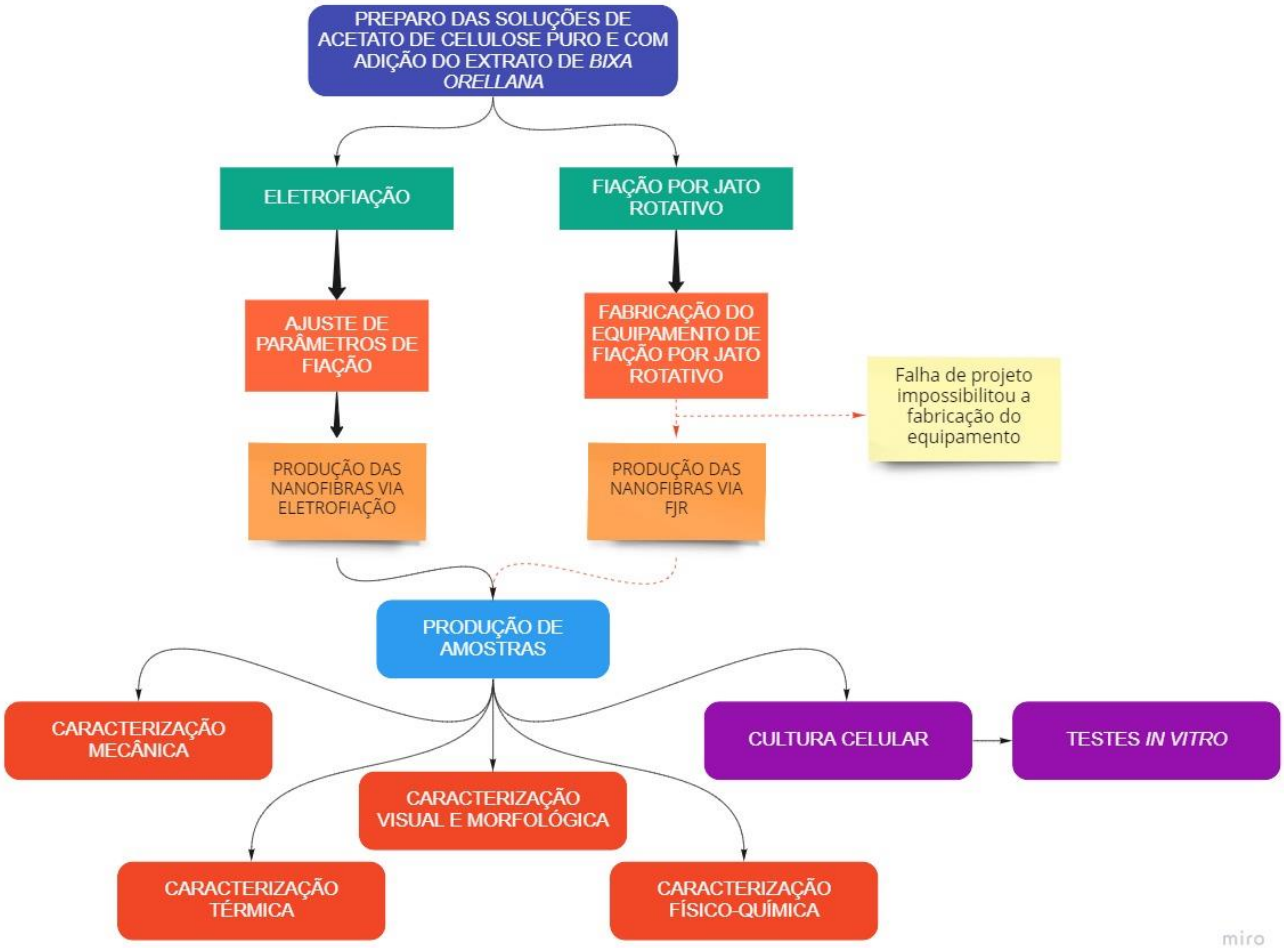
4.1.3 CONSTRUÇÃO DO EQUIPAMENTO RJS

- Motor elétrico Philco 1400W;
- Seringa de polipropileno 20mL;
- Massa epóxi Loctite;
- Agulha hipodérmica 0,55x20mm BD PrecisionGlide.

4.1.4 FLUXOGRAMA GERAL DO PROJETO

A figura 15 expõe a metodologia empregada no desenvolvimento deste projeto, identificando todas suas etapas.

Figura 15 – Fluxograma geral da metodologia do trabalho.



A princípio, a ideia geral do projeto foi a de produção de um *scaffold* a partir de nanofibras de acetato de celulose contento extrato de *Bixa orellana* por meio das técnicas de eletrofiação e rotação por jato rotativo, de forma a comparar os resultados de caracterização de natureza química, física, visual e morfológica, mecânica e testes in vitro. Todavia, o protótipo desenvolvido para o processo de fiação por jato rotativo acabou não sendo concebido devido a falhas de projeto e ao início da pandemia e paralisação das atividades na instituição, que impossibilitou o avanço da pesquisa. Portanto, o *scaffold* foi produzido apenas via eletrofiação e caracterizado para análise de aplicabilidade.

4.2 ELETROFIAÇÃO

4.2.1 PREPARO DA SOLUÇÃO

A solução de acetato de celulose foi produzida pela mistura, via agitador magnético com aquecimento IKA HS 7, de acetato de celulose, extrato de *Bixa orellana,* acetona e dimetilformamida. Durante esta etapa, a mistura foi realizada em béquer, devidamente vedado com filme plástico à fim de evitar a evaporação dos solventes durante o tempo de agitação. Para o preparo da solução, foram utilizados: 9mL de acetona, 3mL de dimetilformamida, 1,44g de acetato de celulose e 1(%wt) de extrato de *Bixa orellana*. Vale ressaltar, que para as produções contendo extrato, esse foi adicionado após a mistura dos outros componentes, de maneira a amenizar a degradação dos componentes contidos no extrato, sendo feita uma agitação manual.

4.2.2 PRODUÇÃO DAS NANOFIBRAS VIA ELETROFIAÇÃO

O processo de eletrofiação utilizado neste trabalho foi do tipo por gravidade, no qual uma seringa contendo a solução polimérica, exposta a pressão atmosférica, promove a vazão durante o processo. O equipamento utilizado foi o EN1 Nanobond modificado, como mostra a Figura 16.

Figura 16 - Equipamento EN1 Nanobond modificado.



Fonte: Prório autor

A modificação consistiu da construção de uma caixa de acrílico, na qual foram inseridos o coletor e a seringa. O objetivo principal da modificação, foi a obtenção de um sistema constituído de paredes com isolamento elétrico (acrílico) direcionando a deposição das nanofibras para o coletor metálico.

4.2.3 PARÂMETROS UTILIZADOS

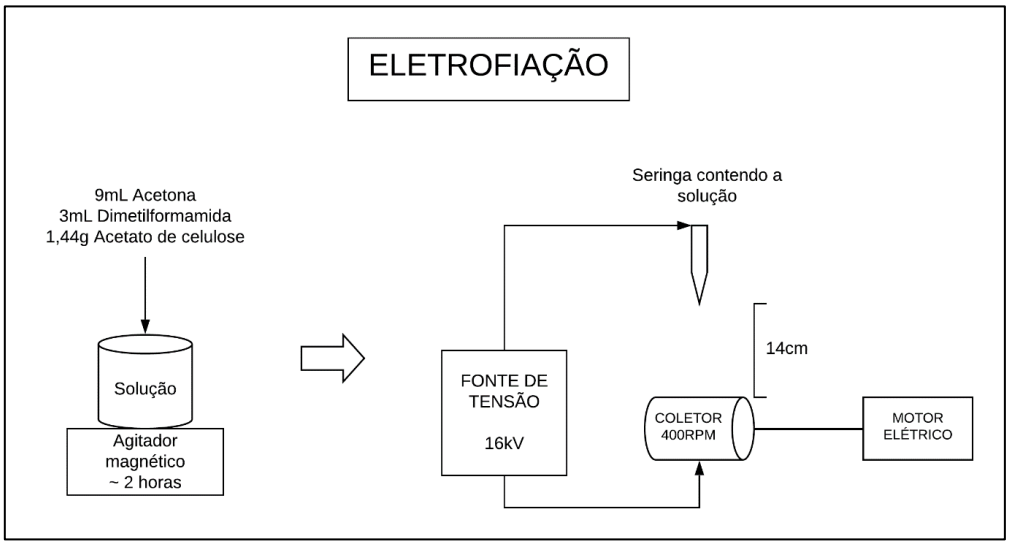
Os parâmetros utilizados para a eletrofiação estão descritos na Tabela 2. A condição de eletrofiação foi escolhida após uma sequência de produções testes, realizadas com o objetivo de determinar os parâmetros para obter uma taxa de produção otimizada, bem como de maneira a evitar a formação de beads durante o processo. O processo de produção encontra-se representado na figura 17.

Tabela 2 – Parâmetros de eletrofiação testados.

Condição	Tensão (kV)	Agulha (mm)	Distância agulha-coletor (cm)	Velocidade de rotação do coletor (rpm)
1	12,0	0.30	14	400
2	14,0	0,55		
3	16,0	0,80		

Fonte: Próprio autor.

Figura 16 - Representação geral do processo de eletrofiação.



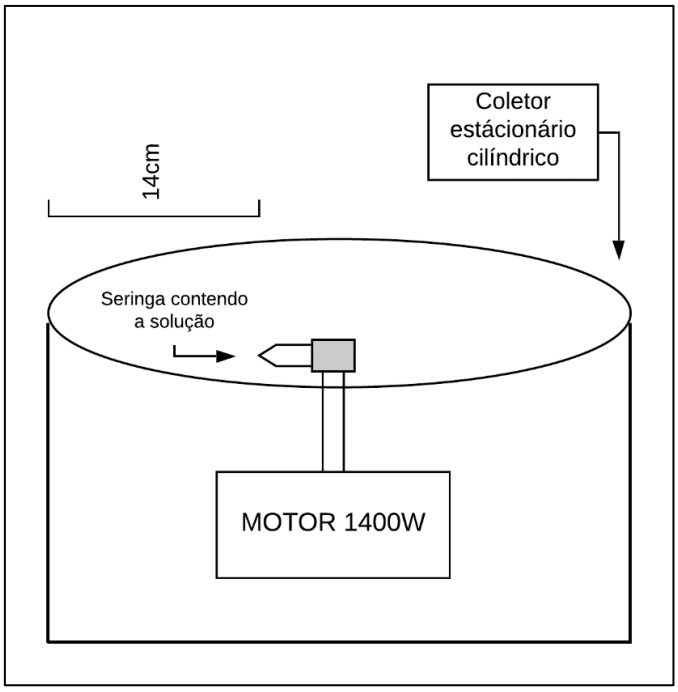
Fonte: Próprio autor

As amostras de nanofibras de acetato de celulose e nanofibra de acetato de celulose contento extrato de *Bixa orellana* foram nomeadas como AC e AC@U.

4.3 FIAÇÃO POR JATO ROTATIVO (RJS)

Neste trabalho foi fabricado um equipamento de fiação por jato rotativo. A figura 18 esboça a montagem e identifica os componentes que compõe o dispositivo.

Figura 18 - Representação esquemática do equipamento de fiação por jato rotativo de barril fechado.



Fonte: Próprio autor

Este equipamento foi fabricado utilizando um motor elétrico rotativo Philco de 1400W de potência. Uma seringa de polipropileno com capacidade volumétrica de 20mL desempenha a função de barril do dispositivo, componente que recebe a solução polimérica de acetato de celulose. O acoplamento desta seringa ao eixo principal do motor foi promovido aplicando-se uma massa epóxi, em torno do corpo da seringa juntamente ao eixo do motor. O coletor escolhido foi do tipo estacionário de formato cilíndrico e foi posicionado a uma distância do coletor de 14 centímetros inicialmente, este valor poderá vir a ser alterado durante o projeto. Tal equipamento foi construído baseado em trabalhos publicados por Parker et.al (2010), todavia, diversas modificações foram implementadas de acordo com a disponibilidade de ferramentas e materiais para a fabricação do

dispositivo. A distância coletor/bocal é um parâmetro essencial para a morfologia da nanofibra fabricada, pois está relacionado diretamente à taxa de evaporação da solução.(Rogalski et al., 2017). Este equipamento modificado possui a grande vantagem em relação ao utilizado pelo trabalho tomado como exemplo, pois a possibilidade de modificação do diâmetro de bocal aplicado durante o procedimento de fiação torna-se possível, pois diferentes agulhas poderão ser utilizadas durante o procedimento de fiação. Dessa forma, durantes as produções testes a serem realizadas, a agulha que apresentar os melhores resultados em relação a morfologia da nanofibra de acetato de celulose produzida, será adotada para o processo. O motor vem de fábrica com 11 rotações pré-definidas, todavia, um inversor de alta frequência poderá ser aplicado de forma a controlar com maior precisão e optar por rotações específicas de trabalho. Para este projeto, serão utilizadas rotações de 15000, 20000 e 25000 RPM.

4.4 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOFIBRAS

4.4.1 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

As imagens de microscopia eletrônica de varredura foram obtidas utilizando o microscópio de marca Shimadzu e modelo SSX-550. O equipamento Quick Coater SC-701 foi utilizado para promoção da metalização das amostras via deposição de ouro, aplicando-se amperagem de 1,5A. O diâmetro médio e a distribuição de tamanho das nanofibras foram obtidos por meio da análise das imagens utilizando o software Image J, sendo realizadas 200 medições de diâmetro por imagem.

4.4.2 ANGULO DE CONTATO

O ângulo de contato das amostras foi obtido utilizando o equipamento da marca KRUSS modelo DAS 100. As amostras com dimensões 20 cm x 20 cm foram depositadas na superfície de uma lâmina de vidro para a obtenção das medidas. A inclinação da mesa adotada foi de 2º e o volume de água destilada depositada sobre a superfície foi de 5 microlitros. O tempo de ensaio foi fixado em 30 segundos.

4.4.3 ENSAIO DE DEGRADAÇÃO

As amostras foram inseridas em recipientes contendo água deionizada e deixadas em repouso por 1, 7 , 14 e 21 dias a 37ºC. Ao fim do período de exposição a água, as amostras foram secas em estufa por 24 horas e pesadas. O ensaio foi realizado em triplicata.

4.4.4 ESPECTROSCOPIA UV/VISÍVEL

A análise por espectroscopia UV-visível foi realizada em espectrômetro Perkin Elmer Lambda 1050, na faixa de 350nm a 800nm. As amostras foram diluídas em acetona e dispostas em cubetas de quartzo.

4.4.5 ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO

Foi realizada a espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier para amostras na faixa de de 400-4000 cm^{-1}. Os espectros foram obtidos através da técnica ATR (Reflexão Total Atenuada). O equipamento utilizado foi o da marca Shimadzu modelo IR Prestige 21.

4.4.6 CALORIMETRIA DIFERENCIAL DE VARREDURA (DSC)

A calorimetria diferencial de varredura foi realizada em atmosfera de nitrogênio (50mL/min), com faixa de aquecimento de 30ºC à 300ºC, aplicando-se taxa de aquecimento de 10ºC/min. O equipamento utilizado foi da marca TA Instruments, modelo Q2000.

4.4.7 ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA (TGA-DTA)

A análise termogravimétrica foi realizada da temperatura de 25ºC até 900ºC, com taxa de aquecimento de 10ºC/mim, em atmosfera controlada de N_2. O equipamento aplicado ao ensaio foi o da marca TA instruments, modelo Q50.

4.4.8 ANÁLISE MECÂNICA DINÂMICA NANOMÉTRICA

Os testes de análise mecânica dinâmica em nanoescala (Nano-DMA) foram realizados à temperatura ambiente usando um dispositivo Hysitron TI950 TriboIndenter (Bruker Corporation, Billerica, EUA) equipado com uma ponta Berkovich. As amostras foram coladas a um suporte de epóxi para garantir a estabilidade durante a medição. Uma grade com 100 pontos de medição foi

criada para medições oscilatórias para obter simultaneamente as respostas linear e visco-elástica da amostra. Os espécimes foram carregados com uma função tempo-força senoidal e uma carga máxima de 75μN oscilando em oito frequências diferentes (10, 31, 25, 115, 136, 157, 178 e 201 Hz). A perda (E'') e o módulo de armazenamento (E') foram calculados a partir dos loops de histerese de deslocamento de força medidos usando o software fornecido com o nanoindentador Bruker.

4.5 TESTES DE BIOCOMPATIBILIDADE *IN VITRO*

4.5.1 CULTURA CELULAR

Mioblastos de camundongos imortalizados (C2C12) foram semeados utilizando-se os *scaffolds* de nanofibras de acetato de celulose (AC) e os *scaffolds* de nanofibras de acetato de celulose contendo o extrato de *Bixa orellana* (AC@U) e na monocamada (controle). Antes da semeadura das células, os *scaffolds* foram esterilizados usando irradiação gama. Os materiais foram irradiados à temperatura ambiente com dose padrão de 10 kGy. Foi utilizada uma fonte de raios gama ^{60}Co. A esterilização por radiação gama foi realizada no Laboratório de Irradiação Gama instalado no Centro de Desenvolvimento de Tecnologia Nuclear (CDTN), Belo Horizonte. Antes do plaqueamento das células, os *scaffolds* foram equilibrados com 200 ul de meio de crescimento (meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), alta glicose (Gibco), suplementada com 10% de soro fetal bovino (Gibco) por 24 horas. As células C2C12 foram plaqueadas na 4ª passagem em triplicado, na densidade de $8x10^4$ células/poço em placas de 24 poços. Após 2 horas de incubação a 37 °C e ambiente de 5% de CO_2, o volume foi completo para 500 ul/poço. As células foram mantidas a 37 ° C e 5% de CO_2 por 1, 2, 7, 14, 21 e 28 dias para realização dos ensaios.

4.5.2 VIABILIDADE CELLULAR (MTT)

A viabilidade celular das amostras foi testada utilizando-se o método MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyl tetrazolium bromide), de acordo as instruções do fornecedor (Invitrogen). As células viáveis contém enzimas que reduzem o reagente MTT, formando-se um produto cristalino insolúvel com uma cor púrpura característica. Tais cristais foram dissolvidos e um ensaio de

densidade óptica foi conduzido em um espectrofotômetro a 595nm. O cálculo de células viáveis foi realizado com a seguinte equação:

$$\%células\ viáveis = \left(\frac{abs_{amostra} - abs_{branco}}{abs_{controle} - abs_{branco}}\right) x\ 100 \qquad (3)$$

4.5.3 CONTAGEM DE CÉLULAS

As células foram depositadas sob os *scaffolds* fabricados na densidade de 8x10^4 células/poço. Após 24 horas, o sobrenadante foi coletado. O meio foi transferido para um novo tubo (um tubo por poço) e o poço foi lavado com PBS, em seguida o PBS foi depositado no mesmo tubo com o meio sobrenadante coletado anteriormente. Os tubos contendo meio e PBS de cada poço individual foram ressuspensos em 50 µL e as células foram contadas em uma câmara de Neubauer. Dessa forma, as células que não se aderiram ao substrato foram coletadas e contabilizadas. As seguintes equações foram utilizadas para a aquisição dos resultados.

$$Número\ de \frac{células}{mL} = \frac{(n_1 + n_2 + n_3)\ x\ d\ x\ 10^4}{4} \qquad (4)$$

$$Células\ não\ aderentes - aderentes\ \frac{células}{poço} = \frac{Nº\ de\ \frac{células}{mL}\ x\ 500\ \mu L}{1000\ \mu l} \qquad (5)$$

4.5.4 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE QUANTITATIVA (q-PCR)

As células foram semeadas nas amostras de nanofibras de acetato de celulose (AC) e nas nanofibras de acetato de celulose contendo o extrato de *Bixa orellana* (AC@U) em triplicada. Foram realizadas culturas celulares em meio de crescimento por 14 dias e culturas de 14 dias, sendo os últimos 7 dias em meio de diferenciação (glicose alta de Dulbecco Modified Eagle's Medium (DMEM), suplementada com soro de cavalo a 2% (Gibco). O meio foi substituído por meio fresco a cada dois dias. Todas as células da triplicada foram então reunidas em 1 mL de TriReagent (Sigma-Aldrich) e o RNA total foi isolado seguindo as

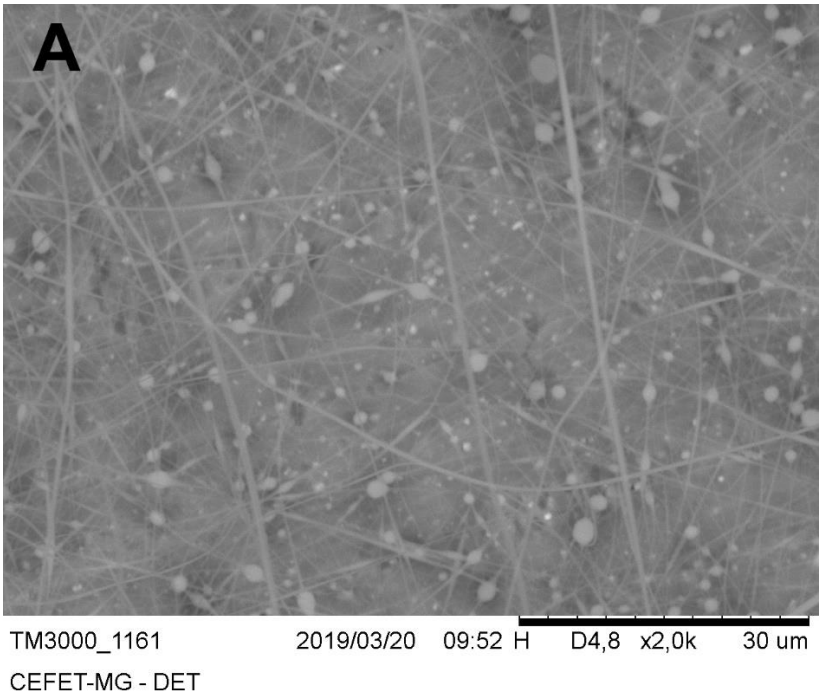
instruções do fabricante. O RNA foi então convertido em cDNA seguindo as instruções do kit de síntese de cDNA da primeira classe RevertAid. A qPCR foi realizada usando a máquina Corbett 3000 (Qiagen), usando 0,4-0,8 uM de cada primer, 1 µl (diluído 1:10) de cada cDNA e 5 uL de iTaq Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad), em uma final volume de 10uL. As reações foram realizadas da seguinte forma: 50 ° C por 2 min, 95 ° C por 2 min, seguido por 45 ciclos de 94 ° C por 15 segundos; 60-62 ° C por 15 segundos e 72 ° C por 20 segundos. GAPDH foi usado como gene de referência. A expressão relativa do gene foi determinada usando o software REST2009. Os fatores reguladores miogênicos avaliados foram MyoD, Myf5 e Myog. A expressão relativa de cada gene foi comparada entre as culturas expostas acima e uma cultura controle de 7 dias em meio de crescimento.

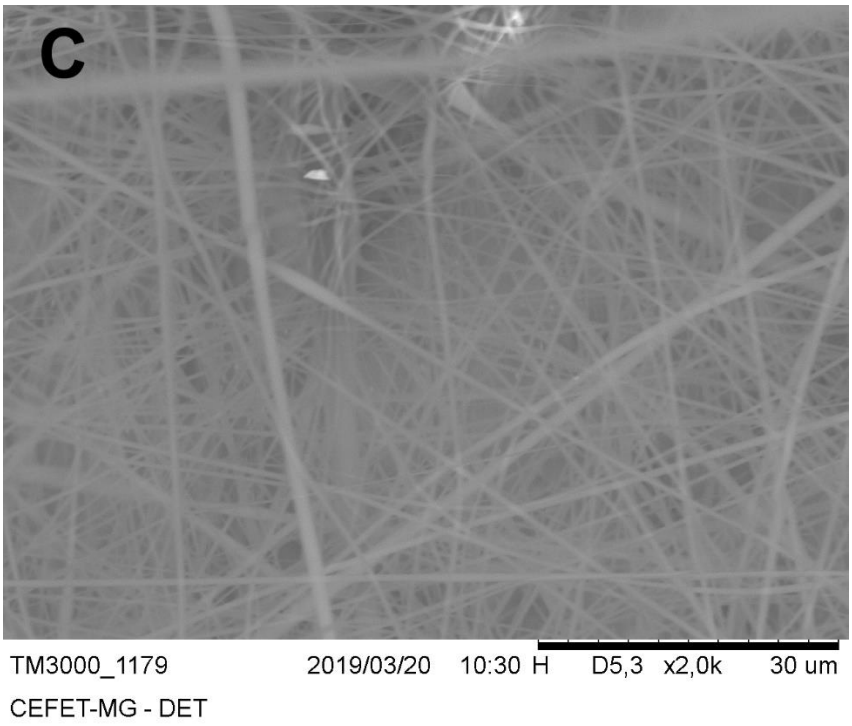
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ELETROFIAÇÃO

As imagens de microscopia eletrônica por varredura obtidas para as amostras produzidas nas condições 1 – 3 (tabela 2) são exibidas na Figura 19.

Figura 19 – Micrografia Microscopia eletrônica de varredura das amostras de nanofibras de acetato de celulose

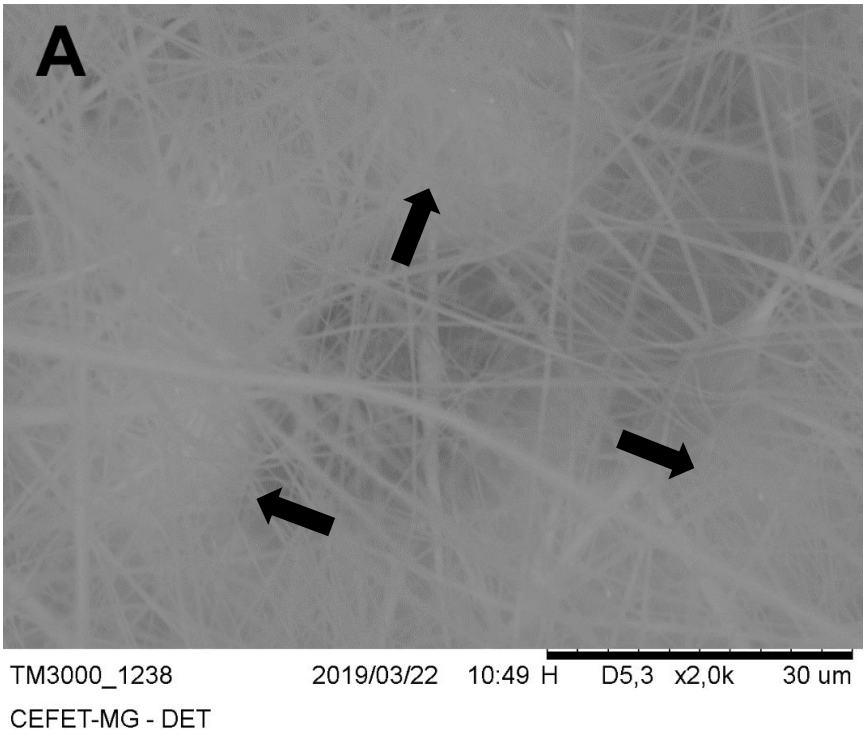


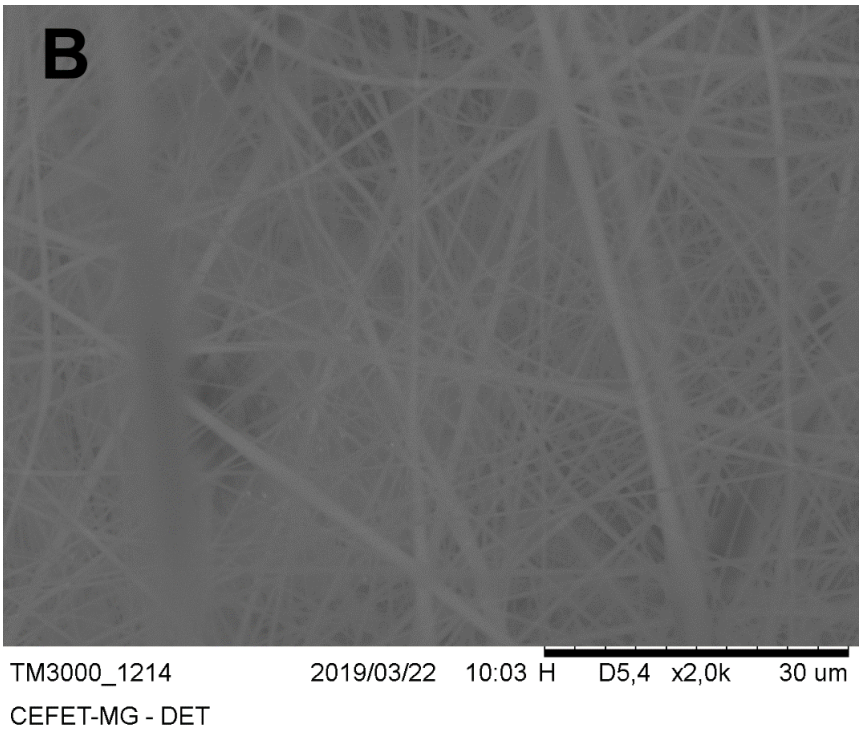


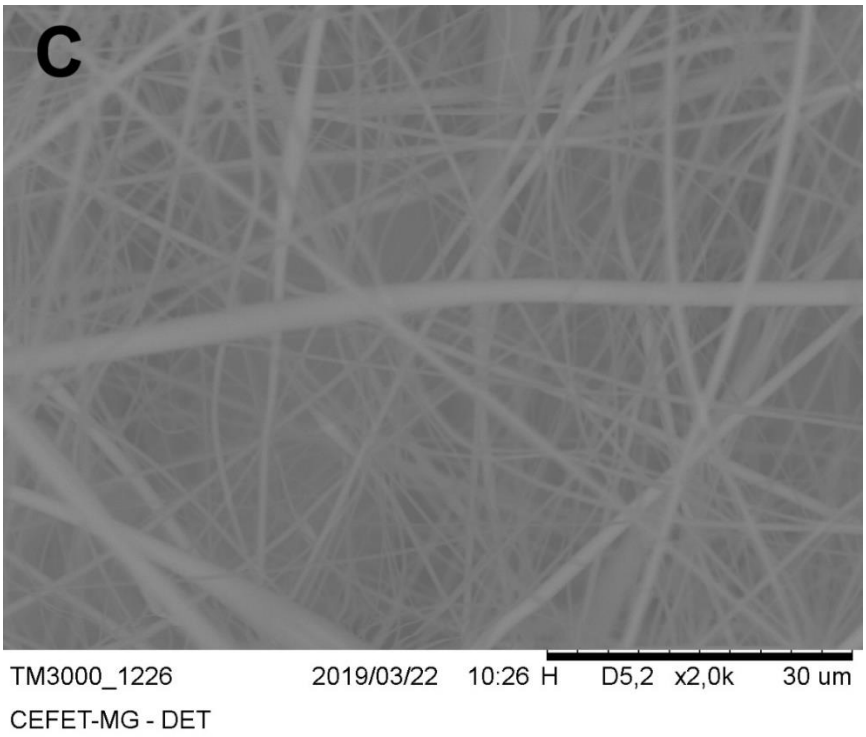
A- Condição 1: Agulha 0,3mm; B – Condição 2: Agulha 0,55mm; C- Condição 3: Agulha 0,8mm. Tensão: 16kV.

Nota-se que para a condição 1 (Figura 19-a), ocorreu a formação de muitos beads e gotas durante o processo, identificadas em toda extensão da Figura 18-a. Essas estruturas não foram observadas nas amostras produzidas utilizando-se as condições 2 e 3 (Figura 19-b e Figura19-c, respectivamente). Comparando-se as condições 2 e 3 não foram observadas diferenças quanto a morfologia da nanofibra produzida. Entretanto, a condição 3 forneceu uma maior taxa de produção fiação em relação as demais e promove a produção de uma nanofibra continua e sem a presença de beads. De acordo com estes resultados, optou-se pela adoção da condição 3, ou seja, o uso da agulha com diâmetro de 0,8mm. Na figura 20 estão representadas as imagens de MEV para amostras fiadas utilizando a condição 3 com diferentes tensões.

Figura 20 - Microscopia eletrônica de varredura das amostras de nanofibras de AC variando-se a tensão.







A- Condição 3a: 12kV; B- Condição 3b: 14kV; C- Condição 3c: 16kV.

Analisando-se as imagens adquiridas (Figura 20), constata-se que para a condição 3a (12kV) ocorrem a formação de gotas durante o processo, identificadas pelas manchas esbranquiçadas presentes em toda a extensão da nanofibra, setas indicam estas áreas na figura 20-a. A condição 3b exibiu o mesmo comportamento em menor intensidade, sendo observada a presença de gotas em determinados pontos da nanofibra produzida. Para estes casos, a tensão possui valor insuficiente para a formação de um cone de Taylor estável, tornando o jato inconsistente e incapaz de promover a fiação de forma efetiva (Haider et al., 2018a). Para o valor testado de 16kV (Figura 20-c) nota-se a inexistência das manchas observadas para os casos anteriores, comprovando que foi atingido o valor crítico de tensão, no qual o cone de Taylor formado possui geometria e estabilidade capazes de promover a fiação de nanofibras contínuas. (Laudenslager e Sigmund 2012). Dessa forma, a tensão de 16kV foi a escolhida como parâmetro definitivo para a técnica de eletrofiação deste projeto.

Analisando-se a eletrofiação como uma técnica de produção de nanofibras poliméricas, esta mostrou-se uma alternativa viável para a produção de nanofibras de acetato de celulose, sendo possível o controle da morfologia das fibras através da alteração de alguns parâmetros de produção. Todavia,

tratando-se uma técnica que envolve a dependência de uma diferença de potencial para a continuidade do processo, as mantas produzidas neste trabalho possuem um limite de espessura, pois a medida que as nanofibras são depositadas sobre o coletor, uma camada isolante é formada, chegando a um momento crítico, no qual o processo é interrompido por falta de atração entre a solução e o coletor. Para comprovarar a hipótese de que, por efeito Joule, a agulha poderia estar sofrente um aumento de temperatura localizado, uma imagem termográfica (Figura 21), utilizando-se a câmera FLIR Ex series, foi realizada.

Figura 21 - Imagem termográfica do equipamento de eletrofiação.



Fonte: Próprio autor

A imagem atestou a inexistência de aumento de temperatura para a agulha. A taxa de produção desta técnica é uma de suas grandes desvantagens, após 3 horas de produção (tempo limite visto o fato da camada isolante) apenas uma fina camada de nanofibras de AC (100x200mm), com espessura inferior a 0,25mm, foi formada, a figura 22 identifica a aparência das nanofibras produzidas.

Figura 2 - Aspecto das mantas de nanofibras produzidas.



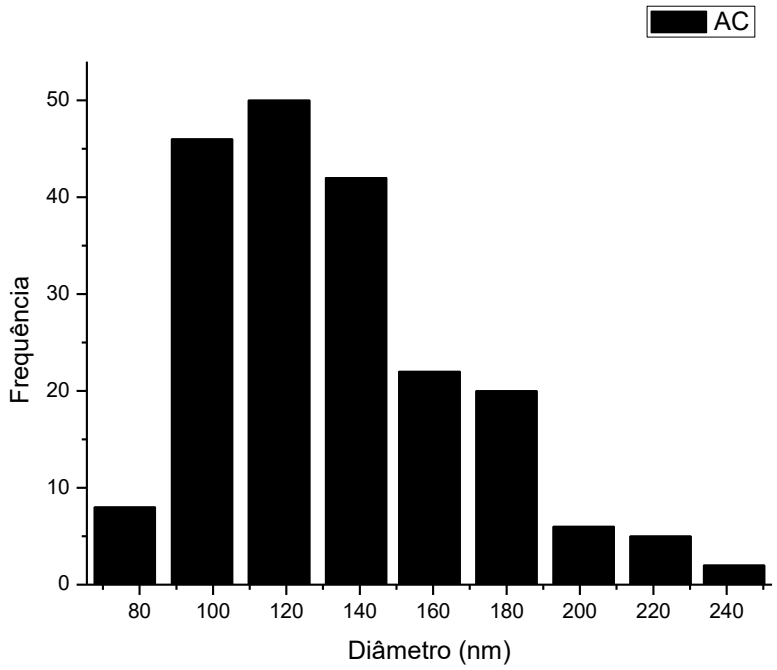
Fonte: Próprio autor

A Figura 22 exibe duas folhas de nanofibras produzidas, nanofibras de AC puro, localizada mais a esquerda da imagem, com coloração esbranquiçada e as nanofibras de AC@U, mais a direita da imagem, de coloração amarela, vista a adição do extrato de *Bixa orellana*, que possui uma coloração avermelhada típica de seus componentes corantes. Tendo em vista a aplicação destas nanofibras para o setor da carne cultivada in vitro, a eletrofiação mostra-se uma técnica viável apenas para aplicações de pesquisa. Sendo necessária a escolha de outra técnica para a produção com o intuito de abastecer as necessidades da produção de carne in vitro iminentes.

5.2 DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO

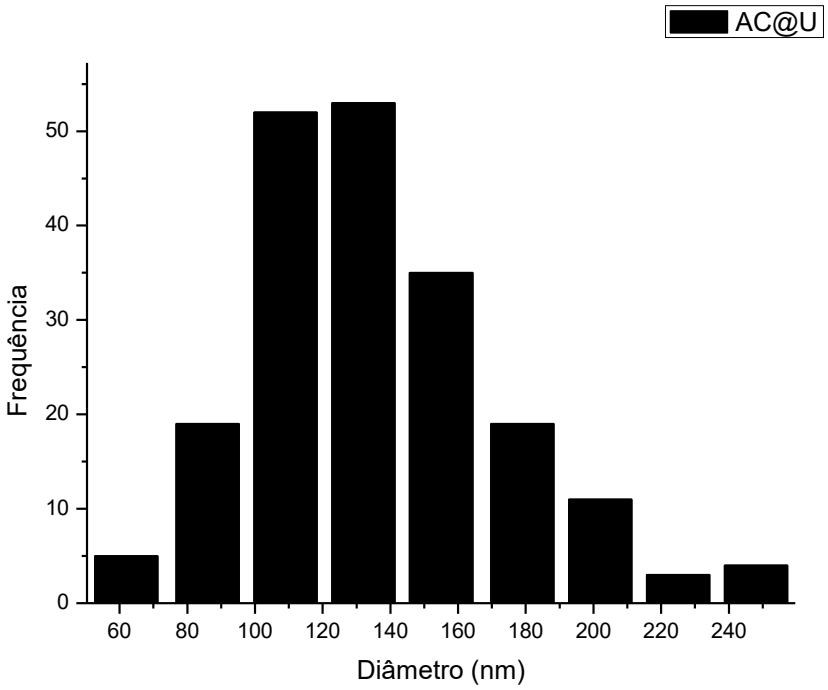
A distribuição de tamanho das nanofibras produzidas foi realizada através das imagens adquiridas da microscopia eletrônica de varredura e do software ImageJ. As figuras 23-24 exibem os resultados.

Figura 23 - Distribuição de tamanho das nanofibras de AC.



As nanofibras de acetato de celulose exibiram diâmetro médio de 143 ± 35nm, os diâmetros mínimo e máximo apresentaram valores de 77nm e 263nm, respectivamente.

Figura 24 - Distribuição de tamanho das nanofibras de AC@U.

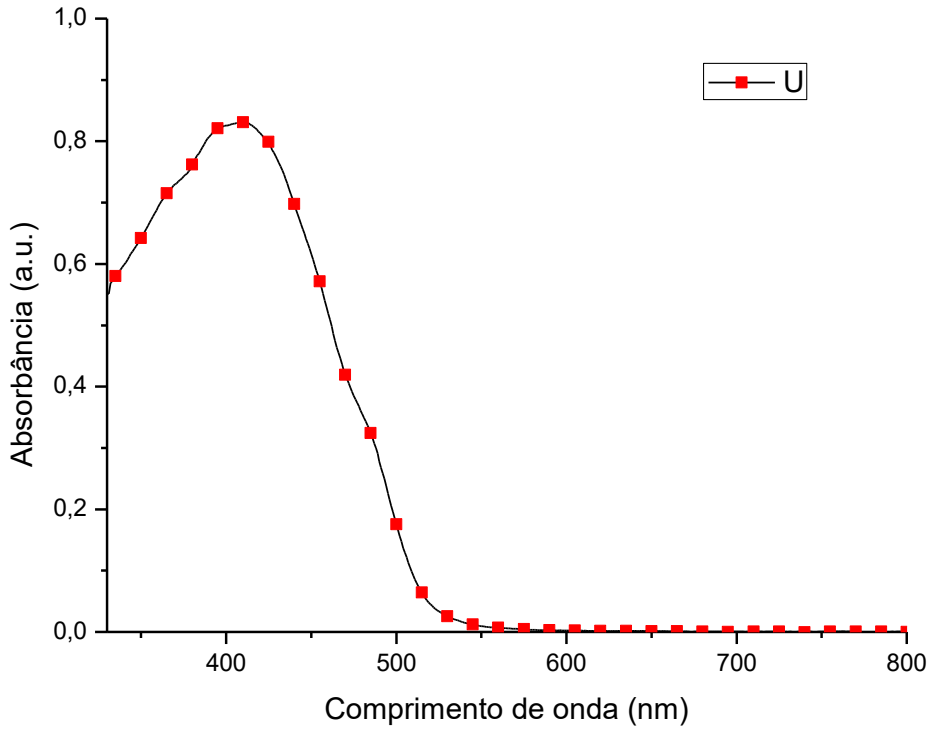


As nanofibras de acetato de celulose contendo o extrato de *Bixa orellana* exibiram diâmetro médio de 149 ± 39nm, os diâmetros mínimo e máximo apresentaram valores de 78nm e 295nm, respectivamente. A adição do extrato de *Bixa orellana* não proporcionou alteração relevante em relação ao diâmetro médio das nanofibras produzidas e a magnitude da distribuição de tamanho.

5.3 ESPECTROSCOPIA UV-VISÍVEL

A espectroscopia ultravioleta visível foi realizada com o intuito de identificar a presença do extrato de *Bixa orellana* na estrutura das nanofibras de acetato de celulose produzidas. Os espectros na região do UV-visível obtidos para o extrato de *Bixa orellana* (U) e as amostras de nanofibras de acetato de celulose (AC) e acetato de celulose contendo extrato de *Bixa orellana* 1%wt (AC@U) são exibidos nas Figuras 25 e 26, respectivamente.

Figura 25 - Espectro da região do UV-visível para o extrato de *Bixa orellana*.

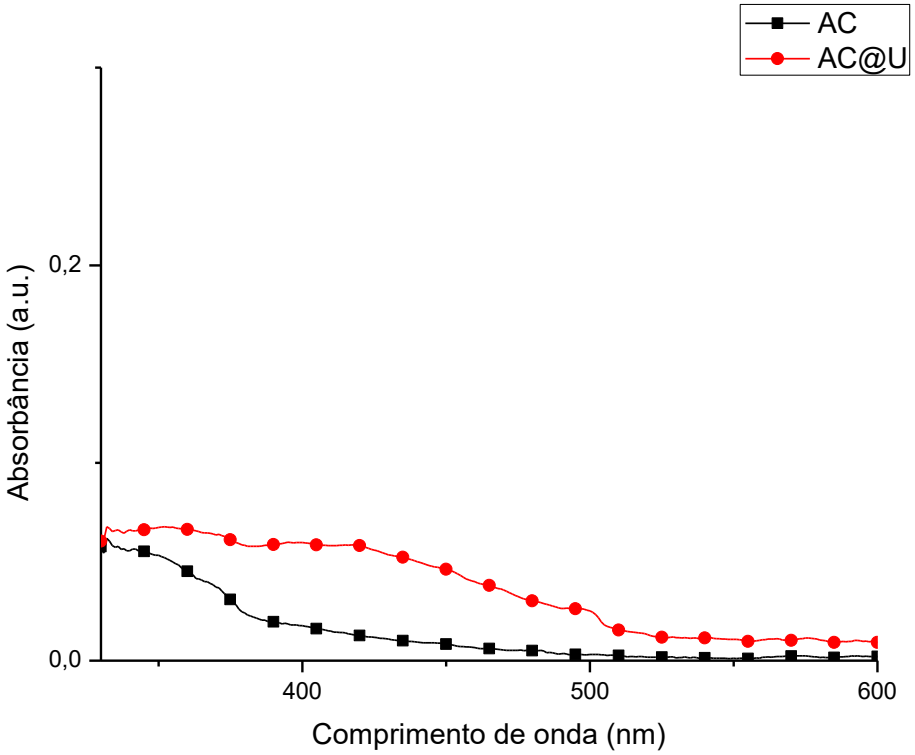


O extrato de *Bixa orellana* exibe uma banda larga e intensa entre 560 – 330 nm com seu valor máximo de absorbância referente ao comprimento de onda igual a 410 nm. Os principais componentes corantes da *Bixa orellana* são a bixina

($C_{25}H_{30}O_4$) e a norbixina. (Scotter, 2009). Devido a uma transição dipolo eletrônico orientada ao longo do eixo da molécula, a bixina e a norbixina exibem fortes bandas de absorção acima de 400 nm. (Calogero et al., 2015) Dessa forma, demonstrou-se de maneira qualitativa que o extrato utilizado neste trabalho contém os componentes bixina e norbixina em sua composição.

As amostras de nanofibras AC e AC@U também foram caracterizadas utilizando a técnica de UV-visível e os espectros estão representados na Figura 26.

Figura 26 - Espectro da região do UV-visível para as amostras AC e AC@U.

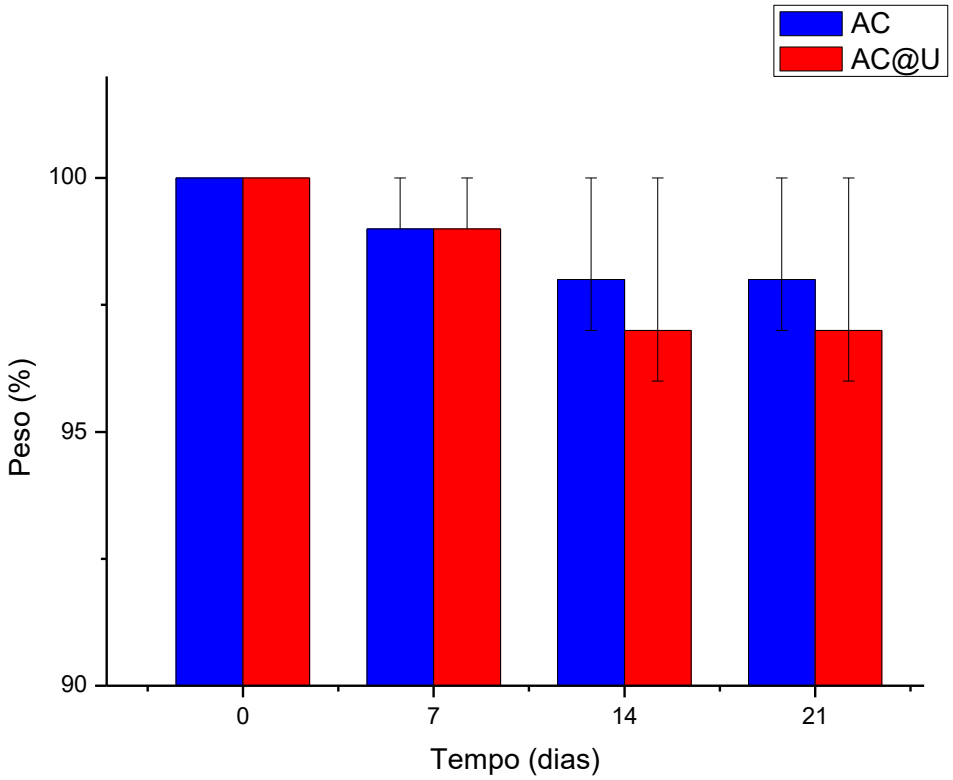


A amostra AC apresentou absorção na faixa de 440-320nm, com valor máximo de absorbância referente ao comprimento de onda de 346 nm, valor que condiz com o esperado para nanofibras de acetato de celulose (Shuiping et al., 2010). A amostra AC@U exibiu absorção na faixa de 550–330 nm, apresentando dois picos característicos, com valores de absorbância máximos referente aos comprimentos de onda de 414 nm e 346 nm, que podem ser atribuídos aos componentes do extrato de *Bixa orellana* e ao acetato de celulose, respectivamente.

5.4 ENSAIO DE DEGRADAÇÃO

Os resultados obtidos no ensaio de degradação realizado em água deionizada à temperatura fisiológica estão apresentados na figura 27.

Figura 27 - Ensaio de degradação realizado no período de 21 dias.



Os dados apresentados indicam que não houve degradação ao longo do período de teste para as duas amostras. Resultado que condiz com o estudo realizado por Puls et al a cerca das propriedades degradativas do acetato de celulose, no qual foi comprovada a necessidade da etapa de desacetilação por meio de enzimas acetil esterases ou por hidrólise química, para posterior degradação da cadeia de celulose. (Puls et al., 2011)

Logo, posteriores ensaios de degradação, implementando-se enzimas de natureza acetil esterase, são pertinentes de serem realizados para uma melhor compreensão do comportamento degradativo das nanofibras de acetato de celulose.

5.5 CALORIMETRIA DIFERENCIAL DE VARREDURA (DSC)

As curvas de calorimetria diferencial de varredura obtidas para as amostras AC e AC@U são exibidas na Figura 28.

Figura 28 - Curvas de calorimetria diferencial de varredura das amostras AC e AC@U.

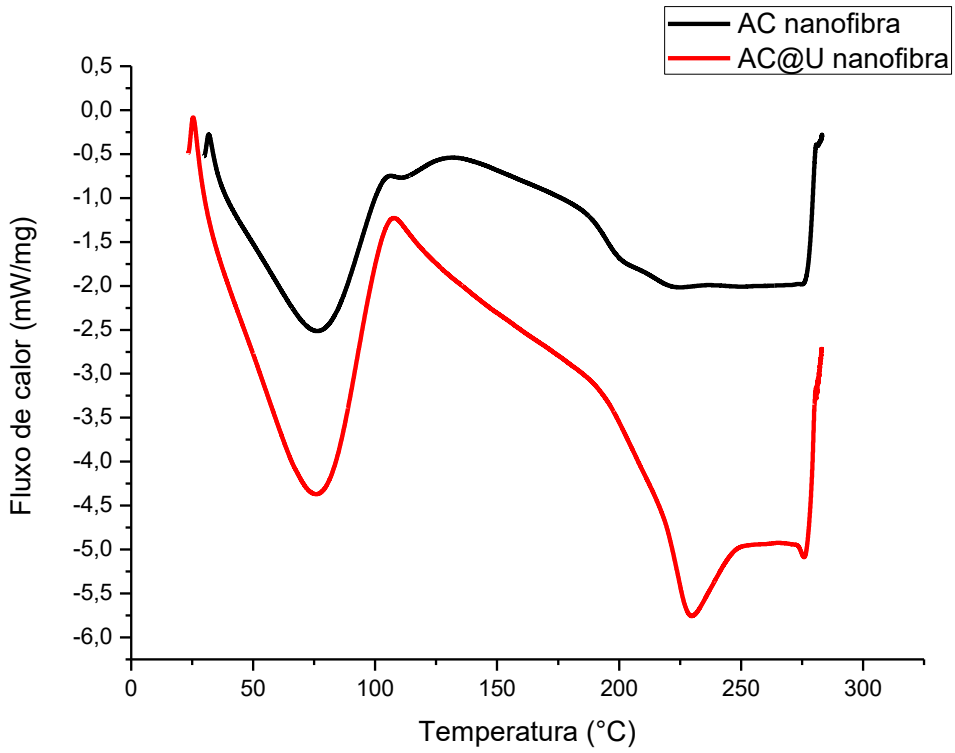


Tabela 3: Temperaturas obtidas do ensaio de DSC.

Nanofibras de AC	**Nanofibras de AC@U**
Temperatura de evaporação: 76,1 ºC	Temperatura de evaporação: 75,2 °C
Cristalização: 132,1 ºC	Cristalização 108,3 °C
Transição vítrea: 189,2 ºC	Transição vítrea: 193,4 °C
Temperatura de fusão: 223-275 ºC	Temperatura de fusão: 229,8 °C

As duas curvas observadas têm em comum a presença de um amplo evento endotérmico presente na faixa de 25 °C - 100 °C. Este evento pode ser atribuído à dessorção de água da estrutura polimérica. (Barud et al., 2008) As temperaturas de cristalização obtidas para as nanofibras AC e AC@U são 132,1 °C e 108,3 °C, respectivamente, identificadas por um pico exotérmico atribuído ao processo de cristalização da porção amorfa do acetato de celulose durante a

varredura. (Candido et al., 2017). O ponto de inflexão identificado próximo a 190 °C para ambas as nanofibras indica a temperatura de transição vítrea (Tg). O pico endotérmico observado próximo ao valor de 230 °C para a amostra AC@U está relacionado à sua temperatura de fusão. Para a amostra de AC, o pico associado à fusão não pôde ser identificado com precisão e está presente na faixa de 223-275 °C. Dessa maneira, é possível inferir que a presença do extrato de *Bixa orellana*, de certa forma, provocou um aumento da estabilidade da estrutura do acetato de celulose, pois a amostra AC@U exibiu um pico característico e de fácil identificação da temperatura de fusão durante o ensaio e a amostra AC exibiu apenas uma faixa de temperatura.

5.6 ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA (TGA-DTA)

O resultado da análise termogravimétrica das amostras de nanofibras de AC e AC@U estão expostas nas Figuras 29, 30 e 31.

Figura 29 – Análise Termogavimétrica (DTA-TGA) da amostra de AC.

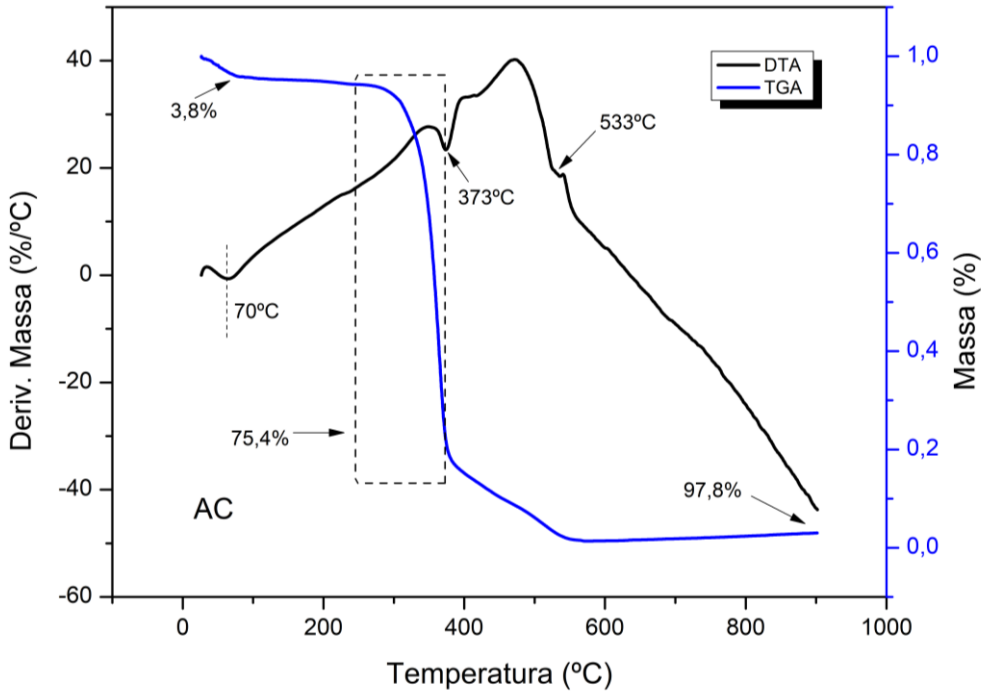
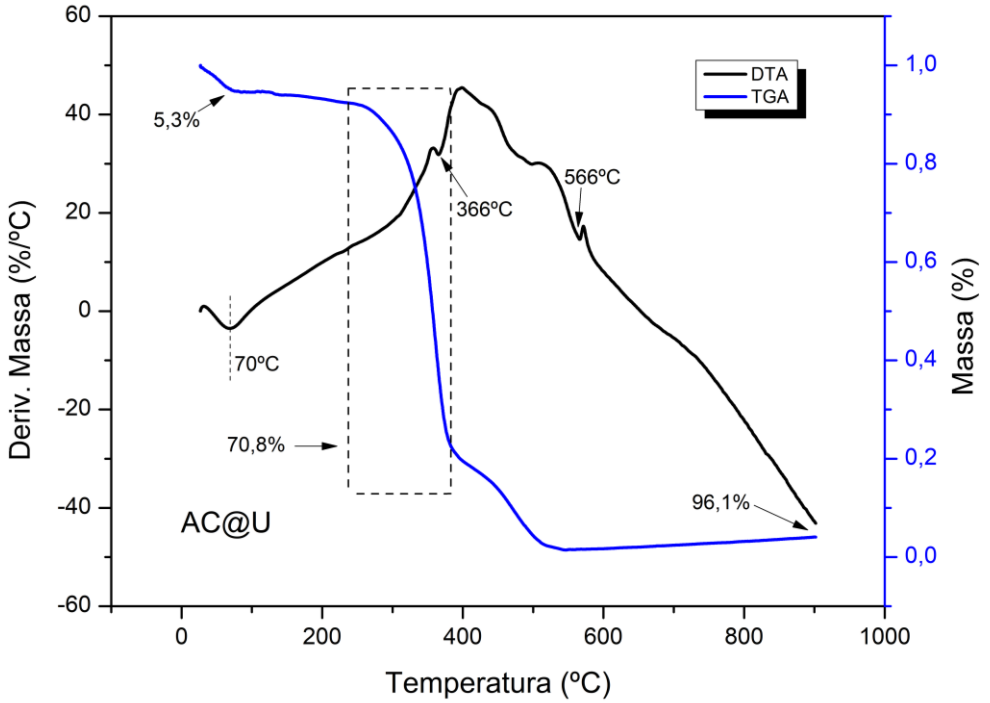
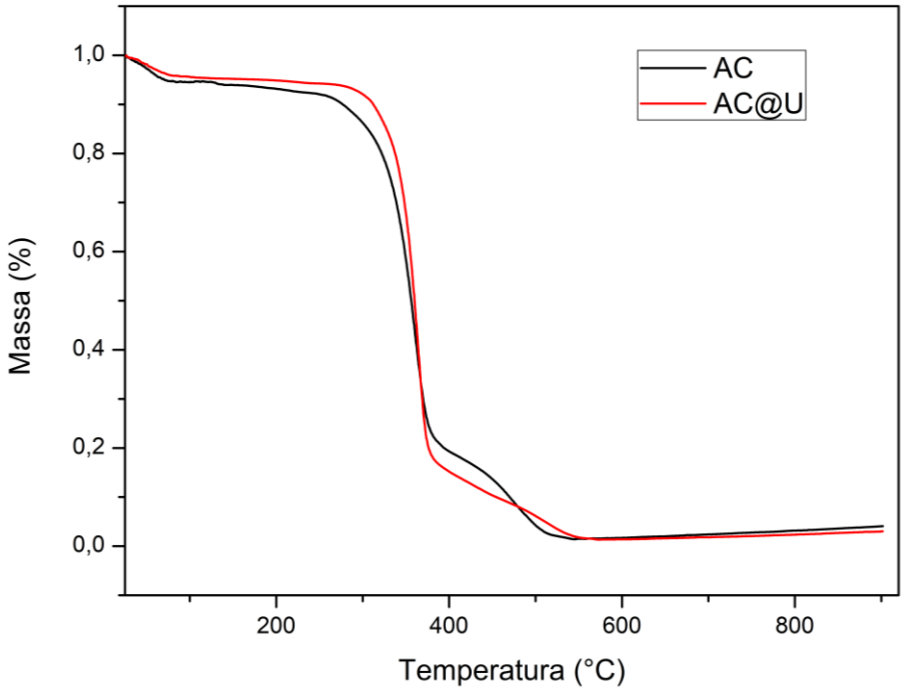


Figura 30 - Análise Termogavimétrica (DTA-TGA) da amostra de AC@U



Para a amostra pura (AC), foi observada uma perda de massa (3,8%) antes de 100°C, evento que pode ser atribuído a um processo endotérmico de perda de água (Mandal et al., 2014). Neste caso, a água é fisicamente adsorvida entre as estruturas moleculares do acetato de celulose. Esta primeira perda de massa também é atribuída aos restos de solventes que podem ter prevalecido entre as nanofibras (dos Santos et al., 2021) (Santos et al., 2015) Para a amostra AC@U foi observada uma maior perda de massa (5,3%) antes do valor de 100°C. Provavelmente, a presença do extrato aumentou a quantidade de água entre as moléculas do polímero, fato relacionado ao aumento de hidrofilicidade, confirmado pela ensaio de ângulo de contato. Uma segunda perda de massa foi observada entre 245ºC e 373ºC para AC e entre 237ºC e 383ºC para amostras AC@U. Esta segunda perda de massa está relacionada com a degradação térmica do acetato de celulose (dos Santos et al., 2021), desacetilação e decomposição pirolítica das cadeias do polímero (entre 240 e 380 ° C) (Candido et al., 2017). Outro evento térmico foi observado em torno de 533 °C para a amostra de AC e 566 °C para a amostra AC@U e pode ser atribuído à carbonização do polímero remanescente (dos Santos et al., 2021). O conteúdo residual a 900 ºC foi em torno de 2,2%, para a amostra AC, e 3,9% para AC@U.

Figura 31 - Análise termogravimétrica (TGA) das amostras de AC e AC@U.

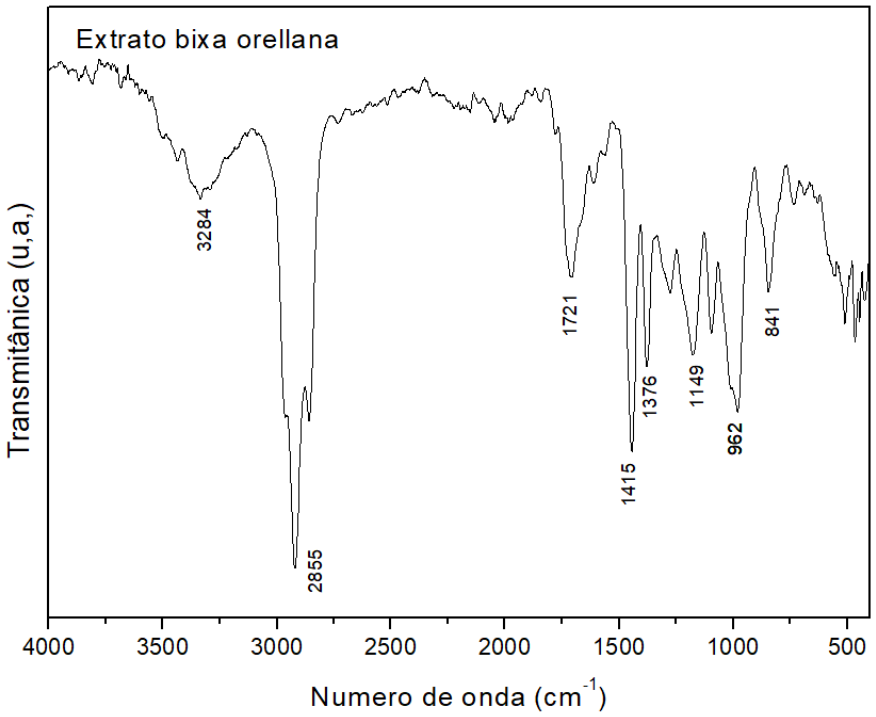


Os resultados da curva de TGA como indicados pela Figura 31 sugerem que o AC apresentou estabilidade térmica durante o preparo da solução (25°C) e durante a eletrofiação (25°C), mesmo quando 1%wt do extato esteve presente. Até 275ºC, um ligeiro aumento em termos de estabilidade térmica foi observado para a amostra contendo o extrato. É possível inferir que a presença de moléculas de bixina, presentes no extrato de *Bixa orellana*, dificulte as reações envolvidas com a degradação térmica do AC, proporcionando um aumento de resistência térmica como indicado pelas curvas de TGA. À 368 ºC ocorreu uma inversão de comportamento "*cross over"* e acima deste valor de temperatura obteve-se um comportamento invertido, onde a amostra de AC@U apresentou menor taxa de perda de massa do que as amostras de AC puro. Esse comportamento pode estar relacionado à degradação térmica das moléculas de bixina, que ocorre entre 280 °C e 380 °C (Silva et al., 2005)

5.7 ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

A Espectroscopia FTIR foi realizada para as amostras AC, AC@U e para o extrato de *Bixa orellana* (U). As figura 32 e 33 exibem os resultados.

Figura 32 - Espectroscopia da amostra de extrato de *Bixa orellana*.

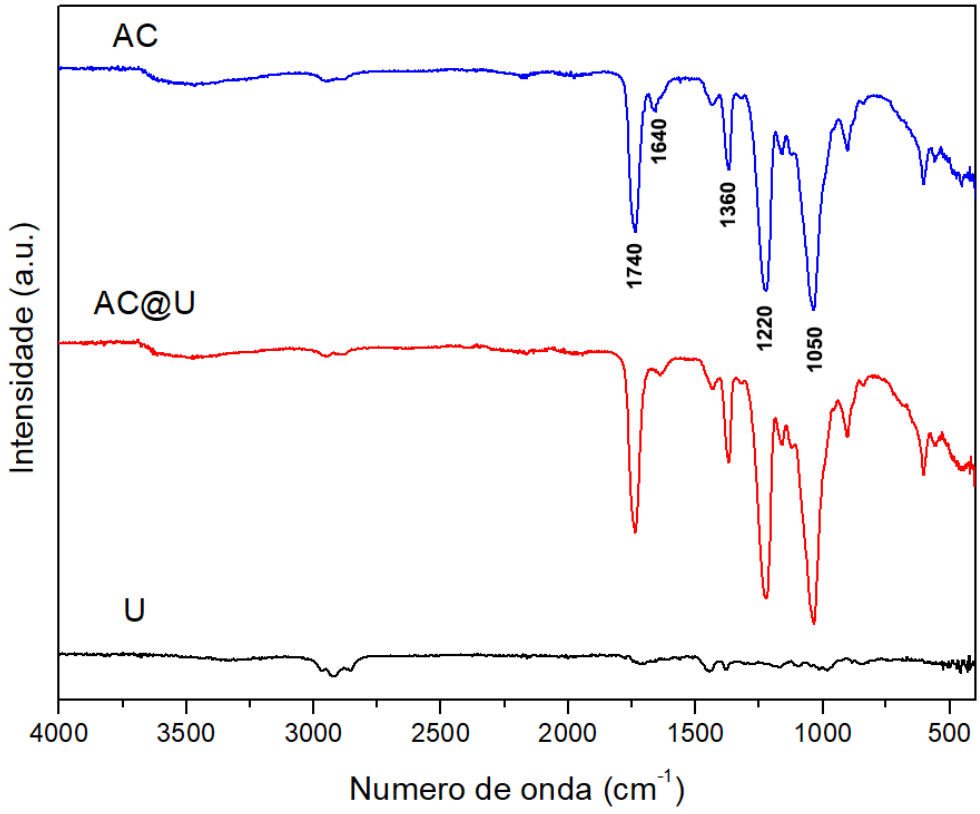


O espectro obtido exibe uma banda larga em 3284 cm^{-1}, atribuída à vibração de estiramento dos grupos OH, a banda 2855 cm^{-1} está associada às vibrações de estiramento simétrico dos grupos CH_2 . As demais bandas de absorção, típicas de compostos carotenóides, em particular a bixina, são exibidas na tabela 4.(Yusa Marco et al., 2008) De acordo com Rahmalia et al foi postulada a presença de outros componentes carotenoides na composição das sementes da *Bixa orellana*, tais como, β-caroteno, criptoxantinam, luteína e zeaxantina, todavia as bandas referentes a tais compostos não foram identificadas pela análise. Sabe-se que o principal componente corante presente nas sementes da *Bixa orellana* é confirmado como sendo a bixina, pois a diferença entre os espectros de bixina pura e o extrato da sementes da *Bixa orellana* não é significativa. (Rahmalia et al., 2015)

Tabela 4: Bandas de absorção identificadas pelo ensaio de FTIR para o extrato de *Bixa orellana*.

Número de onda (cm^{-1})	Atribuição
3284	Estiramento dos grupos OH
2855	Estiramento simétrico dos grupos CH_2
1721	Estiramento dos grupos C=O
1415	Flexão da ligação OH do grupo fenol
1376	Flexão simétrica do grupo CH_3
1149	Estiramento do grupo CO
962	Deformação do grupo OH
841	Deformação fora de plano CH

Figura 33 - Espectroscopia das amostras AC, AC@U e U.



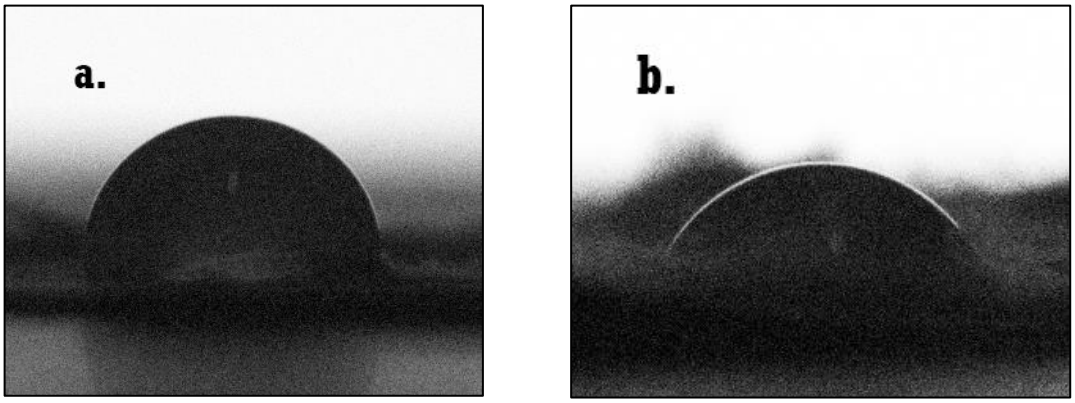
O espectro FTIR das amostras de AC e AC@U apresentaram bandas para o grupo funcional carbonila (C=O) em 1740 cm^{-1}, grupo C-O-C em 1640 cm^{-1}.A

banda 1360 cm^{-1} corresponde a vibração da ligação CH, presente na estrutura do grupo acetil, a banda referente ao valor de 1220 cm^{-1} está relacionado a vibração da ligação CO, responsável pela ligação entre a celulose e o grupo acetil, a ligação C-O simétrica é identificada pela banda 1050 cm^{-1}. (Candido et al., 2017) Não foi obervada diferença signifitiva entre as amostras de nanofibras de acetato de celulose puro e das nanofibras de acetato de celulose contendo o extrato, visto o fato de que o percentual em peso de apenas 1% do extrato dificulta a identificação de um pico característico dos componentes que compõe o extrato de *Bixa orellana*.

5.8 ÂNGULO DE CONTATO

O ensaio de ângulo de contato foi conduzido a fim de avaliar a influência da presença do extrato de *Bixa orellana* sob a hidrofilidade dos *scaffolds*. Logo, as amostras de AC e AC@U foram submetidas ao ensaio (Figura 34).

Figura 34 - Ensaio de ângulo de contato das amostras de nanofibras de AC (a) e AC@U (b).



Os resultados mostram que ambas amostras apresentaram natureza hidrofílica, com valores de ângulos inferiores a 90º. As amostras de AC exibiram ângulo de 77 ± 3º e as amostras de AC@U 50 ± 3º. Logo, a adição em 1% p/p de extrato de *Bixa orellana* aumentou a hidrofilidade do *scaffold* produzido (aumento de aproximadamente 35%). Estudos dirigidos por Ali et al e Shuiping et al em seus trabalhos com nanofibras de acetato de celulose eletrofiadas adquiriram valores de ângulo de contato iguais a 110 ± 1º e 147,3º, respectivamente para suas amostras (Ali et al., 2014) (Shuiping et al., 2010). De acordo com Menzies et al,a hidrofilicidade de um material está diretamente ligada a sua capacidade de

adesão celular, sendo que quanto mais hidrofílico é o material, maior esta propriedade. Já é de conhecimento que uma molhabilidade aprimorada, evidenciado por valores baixos de ângulo de contato em ensaios com água, resultam em uma biocompatibilidade aprimorada pelo material analisado. (Menzies & Jones, 2010) Dessa maneira, a adição do extrato de *Bixa orellana* foi benéfica neste quisito, auxiliando na característica de viabilização celular das nanofibras de acetato de celulose.

5.9 ANÁLISE MECÂNICA DINÂMICA NANOMÉTRICA

Com o objetivo de avaliar a influência do extrato de *Bixa orellana* sobre o comportamento de viscoelasticidade de nanofibras de AC foram realizados ensaios mecânicos de Nano-DMA. As Figuras 35 e Figura 36 mostram os módulos de armazenamento E'(ω) e os módulos de perda (E"(ω), respectivamente.

Figura 35 – Módulo de armazenamento E'(ω) das amostras AC e AC@U.

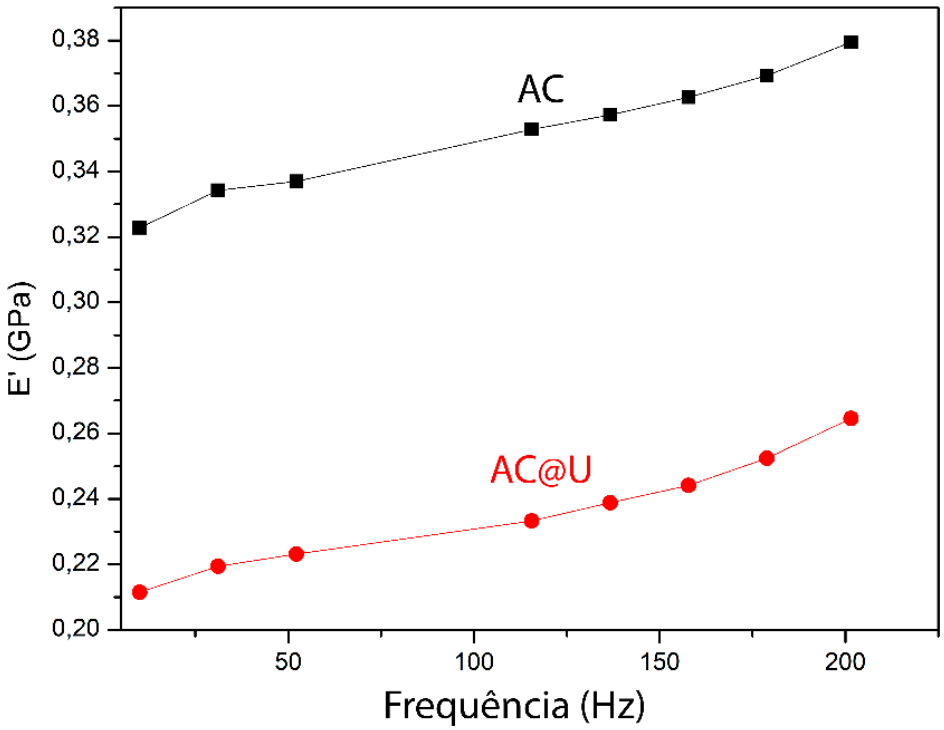
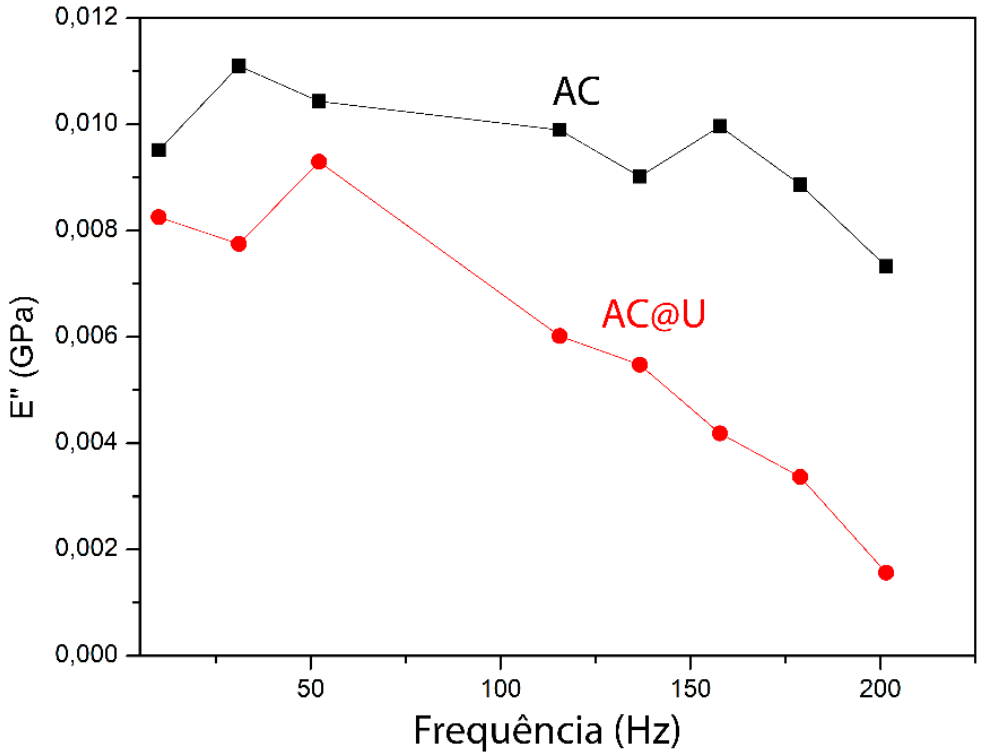


Figura 36 – Módulo de perda E”(ω) das amostras AC e AC@U.

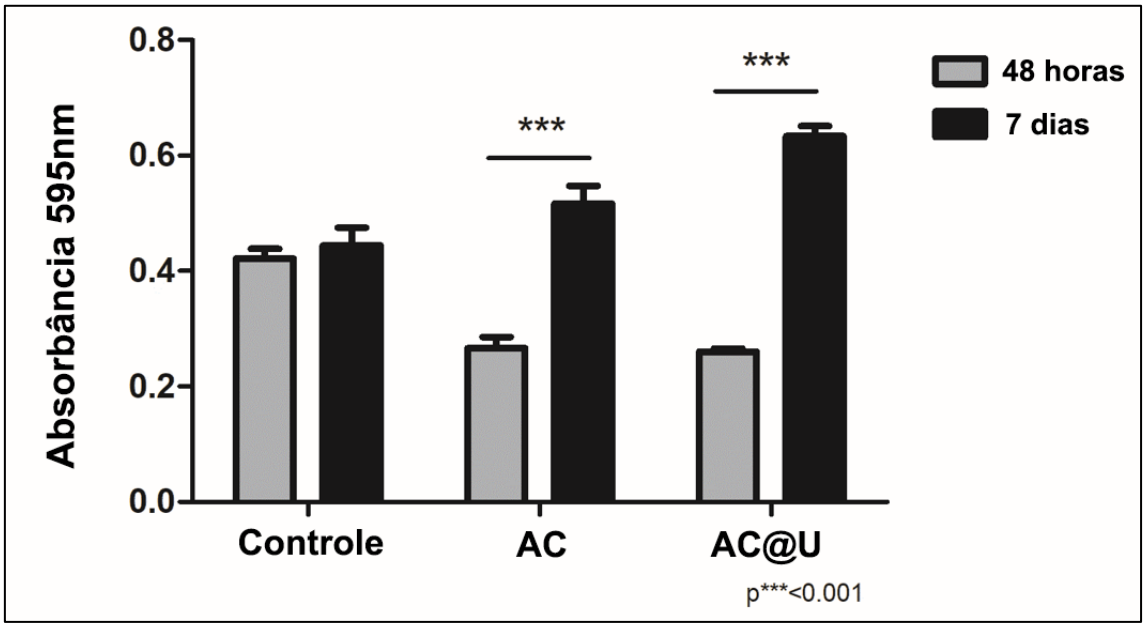


Pode-se perceber que a adição de extrato de *Bixa orellana* nas nanofibras de acetato de celulose proporcionou uma redução em ambos os valores de módulo, E'(ω) e E"(ω). Tomando o valor de frequência de 10 Hz para motivos de comparação de módulo, E'(ω) foi 0,32277 GPa para a amostra AC e 0,21148 GPa para a amostra AC@U, uma redução de 34,48% em termos de módulos de armazenamento foi alcançada pela adiçãodo extrato. Em relação aos módulos de perda, a 10 Hz E”(ω) foi 0,00952 GPa para a amostra AC e 0,00826 GPa para a amostra AC@U, ou seja, obteve-se uma redução de 13,26%. Esse efeito é geralmente encontrado quando plastificantes são adicionados à massa do polímero (Vieira et al., 2011). Portanto, sugere-se que o extrato apresentou efeito semelhante ao de um plastificante, reduzindo as interações entre as moléculas, portanto menos emaranhamentos e maior movimento molecular são esperados, gerando maior deformação e menor módulo.

5.10 VIABILIDADE CELULAR – MTT

O ensaio de viabilidade celular das amostras de nanofibras de AC, AC@U e da a partir do método MTT encontra-se apresentado na Figura 37.

Figura 37 - Proliferação celular de mioblastos C2C12 para as amostras de nanofibras de AC, AC@U e controle.

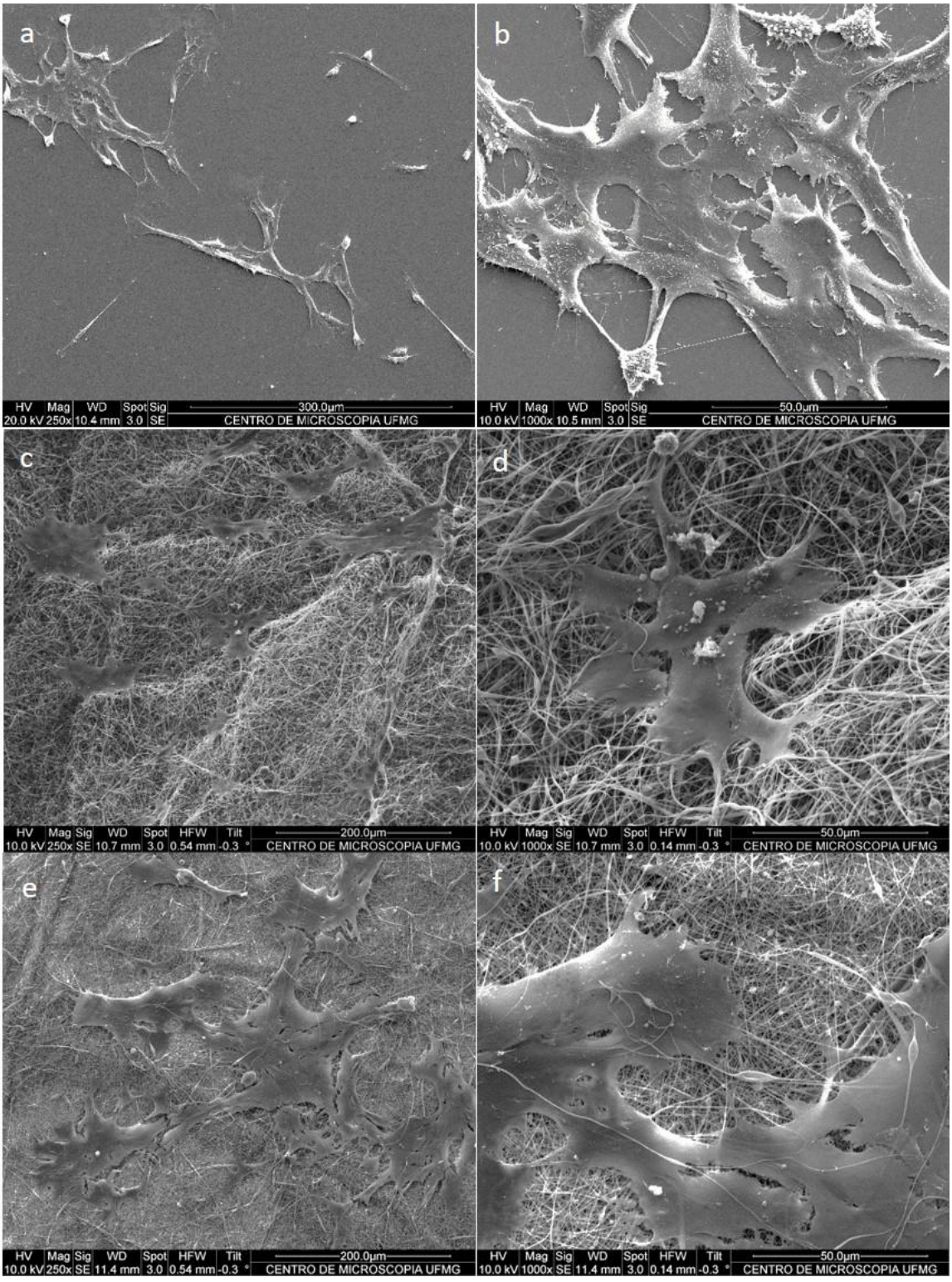


Os resultados indicam melhor proliferação celular do controle realizado em lamínulas de vidro em relação as nanofibras produzidas de AC e AC@U para a condição de 48 horas de cultura celular. Todavia, os resultados para a cultura de 7 dias esboçaram o comportamento contrário, as amostras de AC e AC@U apresentaram maior taxa de proliferação celular em relação ao controle. Dessa maneira, as nanofibras produzidas neste trabalho são mais recomendadas para culturas celulares mais prolongadas. Com relação ao efeito da presença do extrato de *Bixa orellana*, foi avaliado que sua presença proporcionou um aumento da proliferação celular. Tal fenômeno pode ser atribuído ao aumento da hidrofilicidade dos *scaffolds* contendo o extrato, conforme demonstrado no ensaio de ângulo de contato. Outro fator que pode estar influenciando a proliferação celular é a presença de moléculas antioxidantes presentes no extrato de *Bixa orellana*. De acordo com Quiroz et al, substâncias antioxidades podem promover um aumento da proliferação dos mioblastos C2C12 (Quintero Quiroz et al., 2019).

5.11 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA – CULTURA CELULAR

As imagens de microscopia eletrônica de varredura obtidas para as células C2C12 cultivados durante 2 e 7 dias são exibidas na Figura 38.

Figura 38 - Imagens de MEV das células C2C12 após dois dias de cultura.

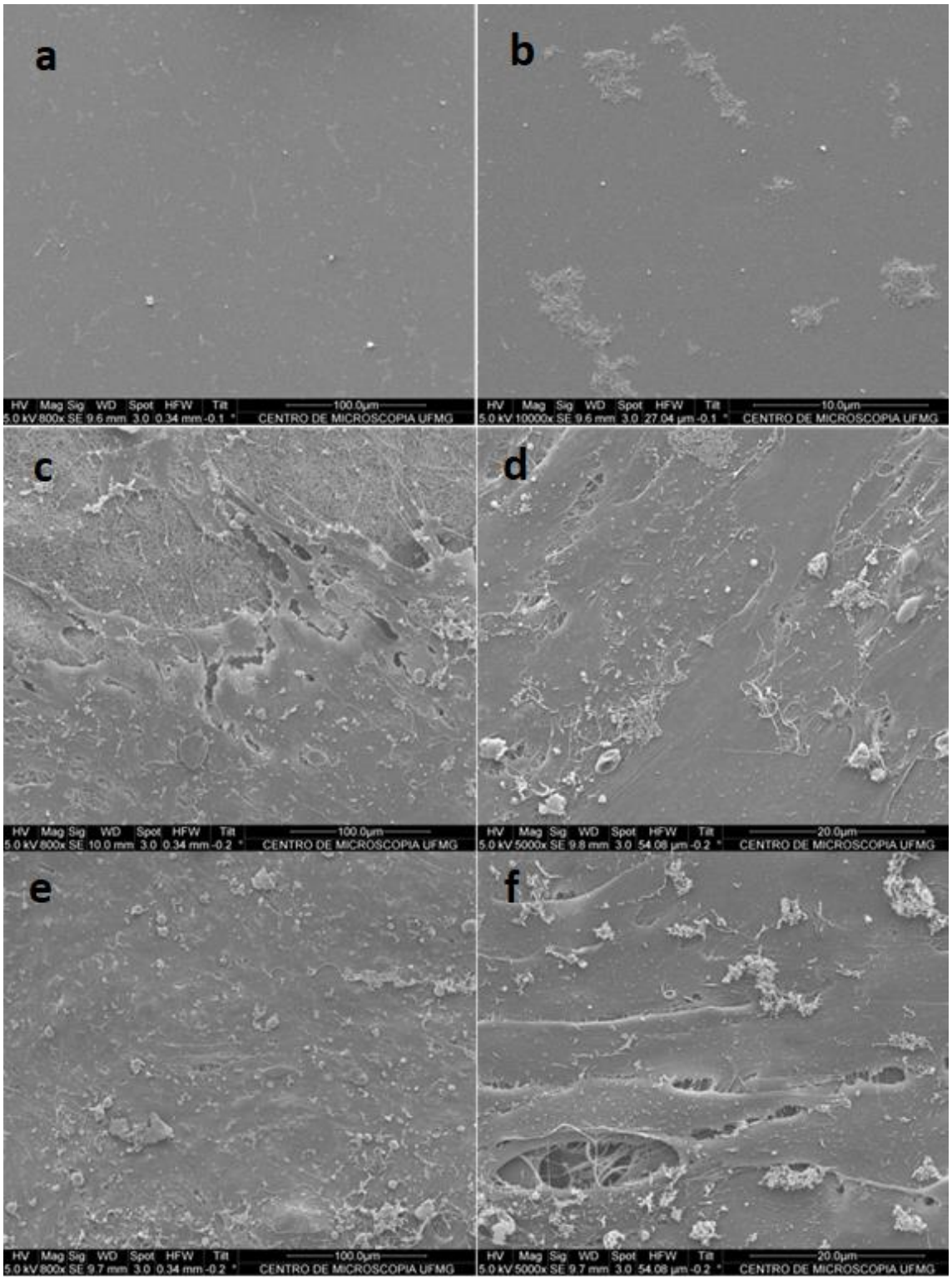


a,b- Controle – Lâmina de vidro ; c,d- Nanofibras de AC; e,f- Nanofibras de AC@U.

As imagens mostram que após 2 dias de cultura as células estão bem aderidas à superfície das nanofibras e da lâmina de vidro. É possível observar a presença

de células isoladas e agrupadas nas imagens realizadas para as amostras de AC e AC@U, sendo que para esta última, qualitativamente, é obeservada maior presença. Com relação a morfologia das células, existe uma predominância do formato estrela e fusiforme, característicos de mioblastos indiferenciados. Não foi possível observar diferenças significativas entre as células cultivadas nas nanofibras e nas lâminas de vidro.

Figura 39 - Imagens de MEV das células C2C12 após sete dias de cultura.



a,b- Controle (lamínula de vidro); c,d- Nanofibras de AC; e,f- Nanofibras de AC@U.

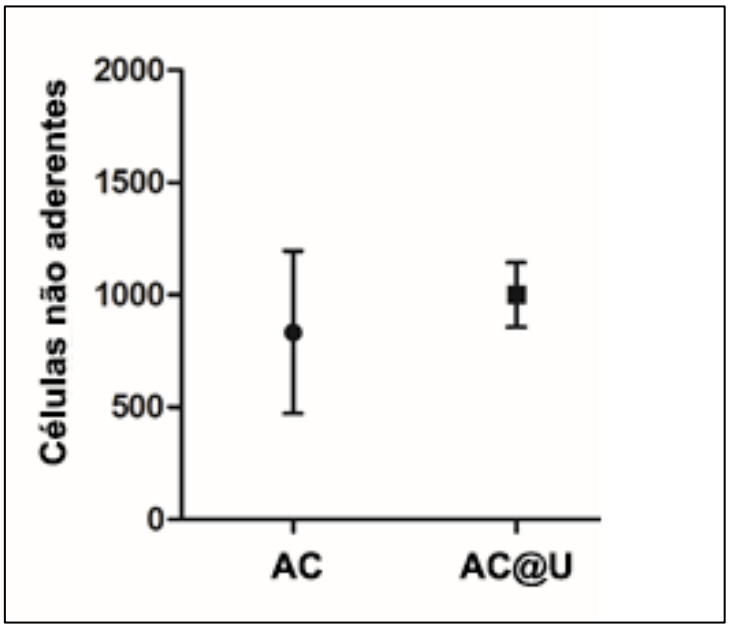
Após 7 dias de cultura celular as células exibiram alto índice de confluência para as amostras de AC e AC@U, sendo observado o recobrimento de quase toda superfície dos materiais. Entretanto, as células cultivada no material controle

exibiram formato esférico , indicando morte celular. As nanofibras AC@U mostraram distribuição uniforme de células grandes e planas após os 7 dias de cultura, indicando alto índice de proliferação celular. Estes resultados estão de acordo com o ensaio MTT realizado, que revelou que a proliferação celular para as amostras de AC@U foi mais elevada, logo, a taxa com a qual as células se reproduzem é maior em comparação a taxa exibida pelas amostras AC puro, tornando do extrato de *Bixa orellana*, um aditivo interessante para aumentar a taxa de proliferação celular em *scaffolds* porosos.

5.12 CONTAGEM DE CÉLULAS – 24 HORAS

A contagem das células foi realizada após 24 horas de cultura celular em meio de crescimento, foram testadas as amostras de nanofibras de AC e AC@U. A figura 40 apresenta a contagem das células não aderentes ao *scaffolds* ensaiados.

Figura 40 - Contagem de células não aderentes para *scaffolds* de AC e AC@U.



Para ambos os *scaffolds*, foram depositadas 80.000 células/poço. Os resultados mostraram que menos de 3000 células por poço não aderiram a nenhum substrato. As taxas adesão celular observadas foram de 97,5% e 98% para células cultivadas em *scaffolds* de AC e AC@U, respectivamente. Logo, não houve diferença significativa entre o nível de adesão entre as amostras de

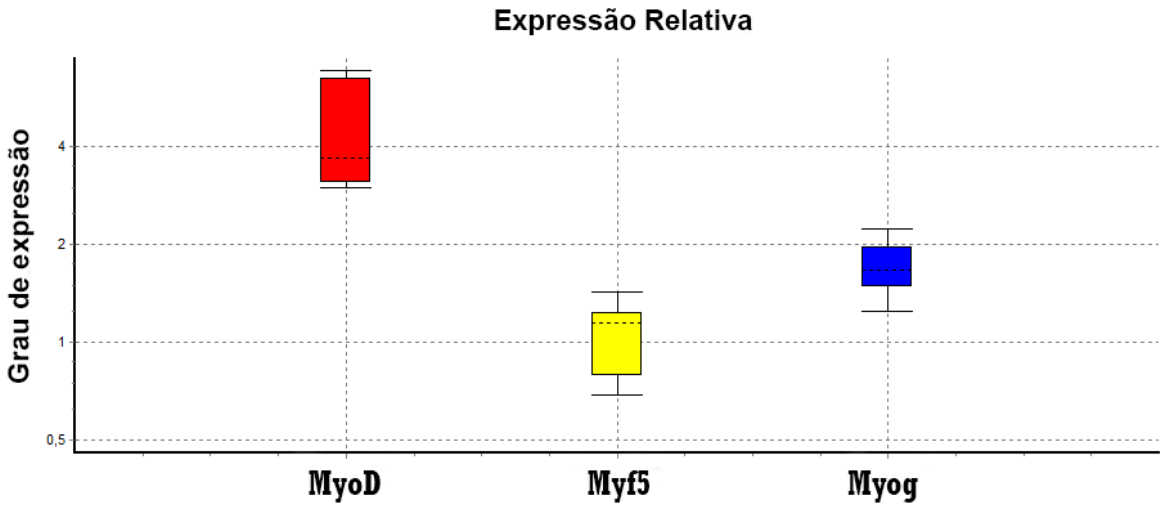
nanofibras de AC e AC@U, onde ambas apresentaram resultados excelentes quanto a propriedade de adesão celular.

5.13 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE QUANTITATIVA (q-PCR)

Os resultados obtidos pelo ensaio de q-PCR para a cultura celular das células C2C12 em período de 14 dias estão expostas pelas Figuras 41-44.

- **Condição 1** – Comparação de expressão relativa dos primers MyoD, Myf5 e Myog entre cultura celular de 14 dias em meio de crescimento e cultura celular de 7 dias em meio de crescimento (controle).
- **Condição 2** – Comparação de expressão relativa dos primers MyoD, Myf5 e Myog entre cultura celular de 14 dias em meio de crescimento, sendo os últimos 7 dias em meio de diferenciação e cultura celular de 7 dias em meio de crescimento (controle).

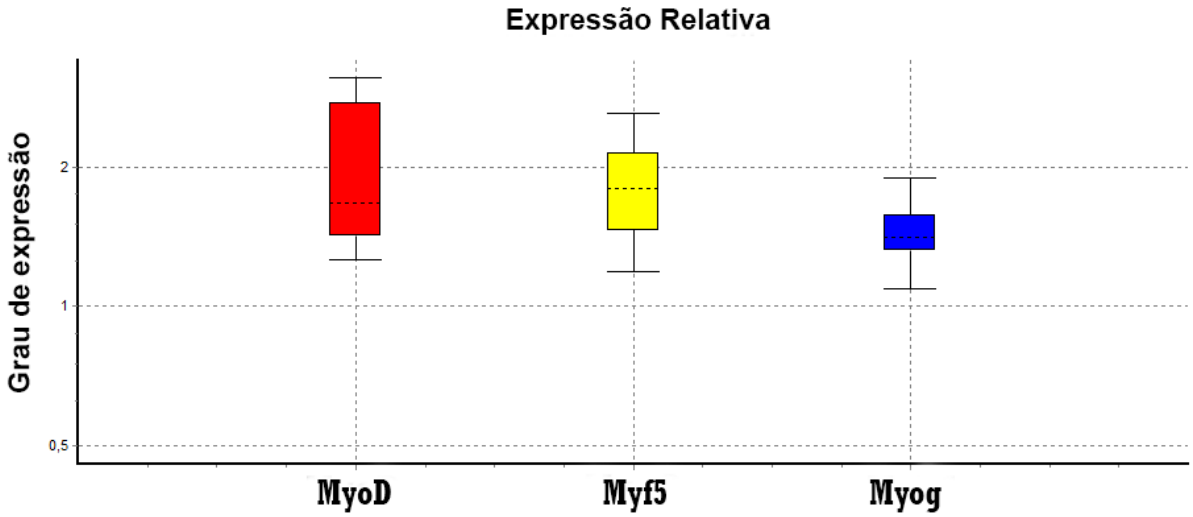
Figura 41 - Ensaio de PCR para as amostras de AC seguindo a condição 1.



Resultados de PCR que exibem grau de expressão superior a 1, indicam a ocorrência de maior expressão gênica relativa, ou seja, representa que as células expressaram mais o gene sob análise em relação ao controle de 7 dias de cultura celular em meio de crescimento. Logo, analisando-se a Figura 40, nota-se que para os primers MyoD e Myog, a condição 1 exibiu maior expressão relativa, enquanto que o gene Myf5 não houve aumento observado. De acordo com Chal et al, os primers MyoD, Myf5 e Myog estão diretamente ligados a etapa

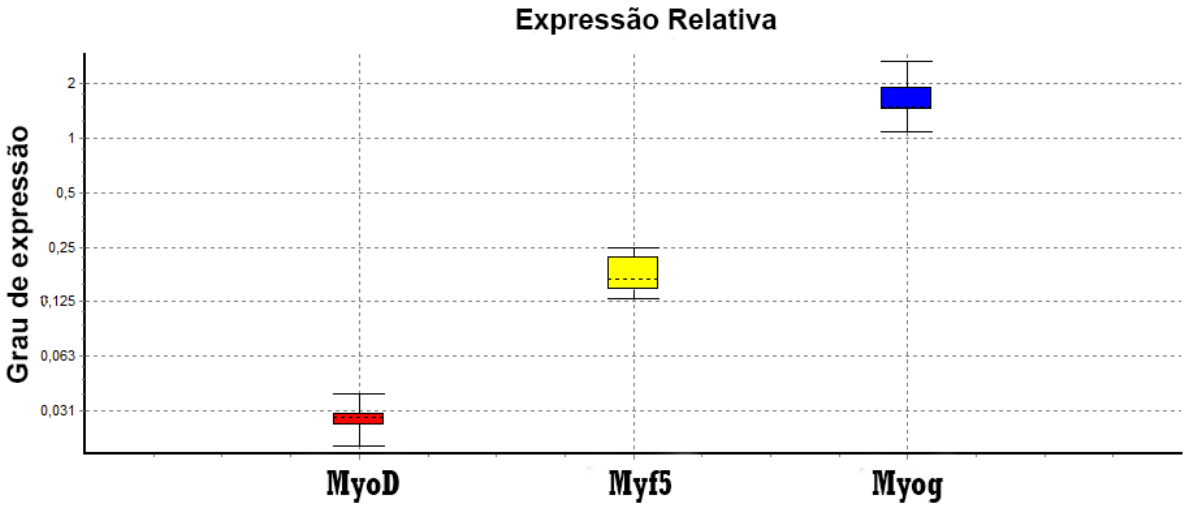
de diferenciação celular do fenômeno de miogênese, na qual as células assumem uma forma mais alongada, onde o primer MyoD e Myf5 aparecem primeiro, estando relacionado mais a proliferação das células, já o primer MyoG encontra-se mais expresso na etapa de fusão celular, etapa de formação de células multinucleadas denominadas miotubos. Dessa forma, é possível dizer que para as amostras de AC, o fenômeno de diferenciação celular das células C2C12 foi favorecido, tornando o acetato de celulose um material indicado para o cultivo e desenvolvimento de tecido muscular *in vitro.* (Chal & Pourquié, 2017)

Figura 42 - Ensaio de PCR para as amostras de AC seguindo a condição 2.



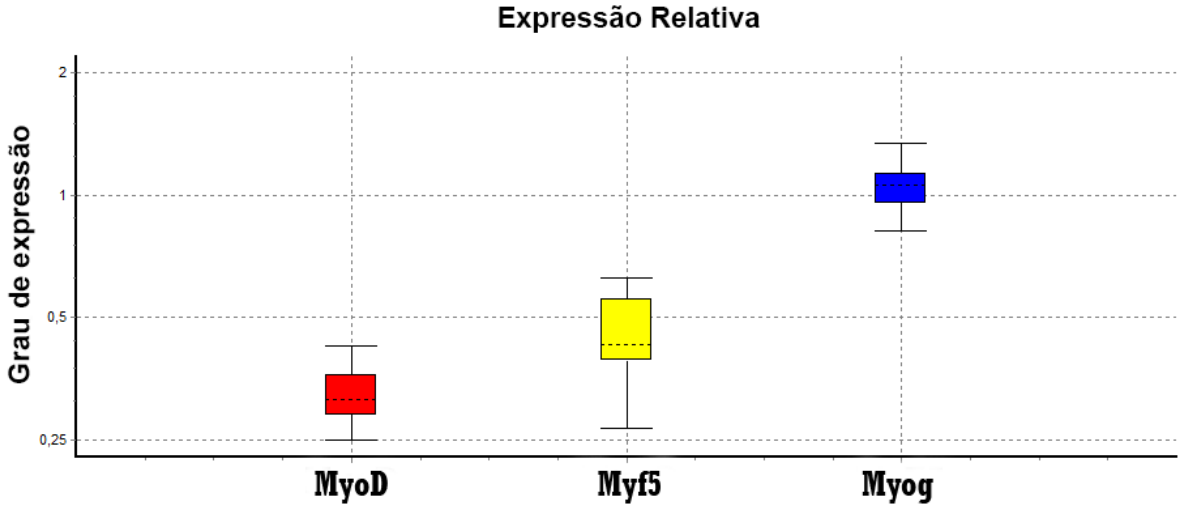
Nota-se que para os 3 primers analisados, a expressão relativa foi superior ao controle (Figura 42). A presença do meio de diferenciação auxiliou na ocorrência do fenômeno de miogênese em comparação a condição 1 ensaiada (Figura 40), sendo que, para esta condição, o primer Myf5 apresentou maior grau de expressão, indicando que as células chegaram a atingir uma etapa de diferenciação mais avançada. Havendo grau de expressão superior a 1 para os 3 genes, conclui-se que o processo de diferenciação celular foi favorecido.

Figura 43 - Ensaio de PCR para as amostras de AC@U seguindo a condição 1.



Resultados de grau de expressão com valores abaixo de 1 indicam que a expressão gênica relativa foi inferior ao controle de cultura celular de 7 dias em meio de crescimento. Logo, para a amostra de AC@U ensaiadas para condição 1, os genes MyoD e Myf5 esboçaram grau de expressão inferiores em relação ao controle, enquanto que o gene Myog apresentou expressão superior. Myog está relacionado ao processo de diferenciação da etapa de alongamento e fusão celular, dessa maneira, as células aprensentaram certo comportamento de diferenciação. Todavia, a baixa expressão do gene MyoD indica que o processo de diferenciação não ocorreu com a mesma intensidade das amostras de AC que não continham o extrato de *Bixa orellana*.

Figura 44 - Ensaio de PCR para as amostras de AC@U seguindo a condição 2.



Os resultados indicados pela Figura 43 indicam que para os primers MyoD e Myf5, a expressão relativa foi inferior comparando-se ao controle, o primer Myog não esboçou comportamento de influência para a comparação. Analisando-se todas os resultados de PCR como um todo, é possível inferir que as amostras de AC favoreceram mais o fenômeno de miogênese em comparação as amostras de AC@U, tornando do extrato de *Bixa orellana* um aditivo que não realiza par sinérgico com o fenótipo de diferenciação celular para as células C2C12. No entanto, os resultados do ensaio MTT sugeriram que o extrato de *Bixa orellana* pode contribuir com a viabilidade e proliferação das células C2C12, indicando que este aditivo natural é útil quando a proliferação do progenitor é necessária. Uma hipótese plausível para o efeito negativo do extrato na miogênese é que ele pode emparelhar sinergicamente com outros tipos de células, o que é confirmado pela pesquisa de Capella et al., que descobriram que o extrato de *Bixa orellana* auxiliou no processo de cicatrização de feridas abertas quando o tecido conjuntivo foi analisado.(Capella et al., 2016)

6 CONCLUSÃO

- A eletrofiação demonstrou-se uma técnica apropriada para pesquisa e estudo da produção de nanofibras de acetato de celulose. Sendo possível o controle da morfologia das nanofibras através do ajuste de parâmetos do processo;
- Os parâmetros de processo ideias para produção das nanofibras de acetato de celulose puro e contendo o extrato de *Bixa orellana* via eletrofiação foram: tensão: 16kV; diâmetro da agulha: 0,8mm; distância agulha-coletor: 14cm; rotação: 400rpm;
- O ensaio de UV-vis atestou a presença de componentes do extrato de *Bixa orellana* na estrutura das nanofibras de acetato de celulose, logo, comprovando sua incorporação durante o processo de eletrofiação;
- O extrato de *Bixa orellana* provou ser capaz de aprimorar certas características físicas do acetato de celulose, como sua estabilidade e resistência térmica, comprovados pelos ensaios de DSC e TGA-DTA. Também demonstrou-se um adititivo ideal para aumento da proliferação celular em *scaffolds* de nanofibras. O ensaio de ângulo de contato identificou aumento de molhabilidade devido a presença do extrato, característica que auxilia na adesão celular em ensaios de cultura *in vitro*;
- O ensaio de degradação em água deionizada (21 dias) não registrou degradação aparente por parte das nanofibras de acetato de celulose;
- O ensaio mecânico de Nano-DMA atestou que o extrato de *Bixa orellana* atuou como plastificante, diminuindo os módulos de armazendo e perda das amostras ensaiadas;
- Os ensaios de MTT e contagem de células atestaram que o acetato de celulose provou ser biocompatível e não tóxico, sendo recomendado como matéria-prima no desenvolvimento de *scaffolds* porosos para aplicação na engenharia de tecidos;
- O ensaio de q-PCR atestou que a diferenciação celular foi desfavorecida pela adição do extrato de *Bixa orellana*, tornando deste, um aditivo interessante para otimizar a etapa de proliferação celular dentro do processo de cultivo de carne in vitro se, adicionado um sinal posterior que

conduza as células ao caminho da diferenciação e desenvolvimento do tecido muscular;

- O desenvolvimento de um equipamento baseado no trabalho utilizando-se altas velocidades de rotação provou-se desafiador, sendo necessária um estudo mais aprofundado e desenvolvimento de ajustes técnicos e operacionais, de forma a minimizar as vibrações e contornar as dificuldades inerentes ao processo.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Produzir nanofibras de acetato de celulose com a adição de diferentes quantidades do extrato de *Bixa orellana*, afim de averiguar o efeito de sua influência;
- Estudar a degradação das nanofibras em ambiente que simule de forma mais precisa e controlada o pH e temperatura do sangue animal;
- Caracterizar de forma quantitativa a presença do extrato de *Bixa orellana* na estrutura das nanofibras após a fiação;
- Realizar a cultura celular utilizando-se diferentes linhagens de células;
- Investigar e projetar um protótipo de equipamento de Fiação por Jato Rotativo levando em consideração o balanço de massa e vibrações inerentes a sua utilização.

8 REFERÊNCIAS

Akalp, U., Bryant, S. J., Vernerey, F. J., & Engineering, B. (2017). *Sensitive Hydrogels : a Mathematical Model*. *12*(36), 7505–7520. https://doi.org/10.1039/c6sm00583g.Tuning

Ali, S., Khatri, Z., Oh, K. W., Kim, I. S., & Kim, S. H. (2014). Zein/cellulose acetate hybrid nanofibers: Electrospinning and characterization. *Macromolecular Research*, *22*(9), 971–977. https://doi.org/10.1007/s13233-014-2136-4

Angammana, C. J. (2011). *Thesis: A Study of the Effects of Solution and Process Parameters on the Electrospinning Process and Nanofibre Morphology*. *47*(3), 1109–1117.

Anomaly, J. (2015). What's wrong with factory farming? *Public Health Ethics*, *8*(3), 246–254. https://doi.org/10.1093/phe/phu001

Badrossamay, M. R., McIlwee, H. A., Goss, J. A., & Parker, K. K. (2010). Nanofiber assembly by rotary jet-spinning. *Nano Letters*, *10*(6), 2257–2261. https://doi.org/10.1021/nl101355x

Barud, H. S., de Araújo Júnior, A. M., Santos, D. B., de Assunção, R. M. N., Meireles, C. S., Cerqueira, D. A., Rodrigues Filho, G., Ribeiro, C. A., Messaddeq, Y., & Ribeiro, S. J. L. (2008). Thermal behavior of cellulose acetate produced from homogeneous acetylation of bacterial cellulose. *Thermochimica Acta*, *471*(1–2), 61–69. https://doi.org/10.1016/j.tca.2008.02.009

Ben-Arye, T., & Levenberg, S. (2019). Tissue Engineering for Clean Meat Production. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, *3*(June), 1–19. https://doi.org/10.3389/fsufs.2019.00046

Calogero, G., Bartolotta, A., Di Marco, G., Di Carlo, A., & Bonaccorso, F. (2015). Vegetable-based dye-sensitized solar cells. *Chemical Society Reviews*, *44*(10), 3244–3294. https://doi.org/10.1039/c4cs00309h

Candido, R. G., Godoy, G. G., & Gonçalves, A. (2017). Characterization and application of cellulose acetate synthesized from sugarcane bagasse. *Carbohydrate Polymers*, *167*, 280–289.

https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.03.057

Capella, S. O., Tillmann, M. T., Félix, A. O. C., Fontoura, E. G., Fernandes, C. G., Freitag, R. A., Santos, M. A. Z., Félix, S. R., & Nobre, M. O. (2016). Potencial cicatricial da Bixa orellana L. em feridas cutâneas: Estudo em modelo experimental. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia*, *68*(1), 104–112. https://doi.org/10.1590/1678-4162-8374

Chal, J., & Pourquié, O. (2017). Making muscle: Skeletal myogenesis in vivo and in vitro. *Development (Cambridge)*, *144*(12), 2104–2122. https://doi.org/10.1242/dev.151035

Cooper, A., Jana, S., Bhattarai, N., & Zhang, M. (2010). Aligned chitosan-based nanofibers for enhanced myogenesis. *Journal of Materials Chemistry*, *20*(40), 8904–8911. https://doi.org/10.1039/c0jm01841d

Dias, D. A., Urban, S., & Roessner, U. (2012). A Historical overview of natural products in drug discovery. *Metabolites*, *2*(2), 303–336. https://doi.org/10.3390/metabo2020303

dos Santos, A. E. A., dos Santos, F. V., Freitas, K. M., Pimenta, L. P. S., de Oliveira Andrade, L., Marinho, T. A., de Avelar, G. F., da Silva, A. B., & Ferreira, R. V. (2021). Cellulose acetate nanofibers loaded with crude annatto extract: Preparation, characterization, and in vivo evaluation for potential wound healing applications. *Materials Science and Engineering C*, *118*(July 2020), 111322. https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.111322

Eisenbarth, E. (2007). Biomaterials for tissue engineering. *Advanced Engineering Materials*, *9*(12), 1051–1060. https://doi.org/10.1002/adem.200700287

Fischer, S., Thümmler, K., Volkert, B., Hettrich, K., Schmidt, I., & Fischer, K. (2008). Properties and applications of cellulose acetate. *Macromolecular Symposia*, *262*(1), 89–96. https://doi.org/10.1002/masy.200850210

Golecki, H. M. I., Yuan, H., Glavin, C., Potter, B., Badrossamay, M. R., Goss, J. A., Phillips, M. D., & Parker, K. K. (2014). Effect of solvent evaporation on fiber morphology in rotary jet spinning. *Langmuir*, *30*(44), 13369–13374. https://doi.org/10.1021/la5023104

Haider, A., Haider, S., & Kang, I. K. (2018a). A comprehensive review summarizing the effect of electrospinning parameters and potential applications of nanofibers in biomedical and biotechnology. *Arabian Journal of Chemistry*, *11*(8), 1165–1188. https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2015.11.015

Haider, A., Haider, S., & Kang, I. K. (2018b). A comprehensive review summarizing the effect of electrospinning parameters and potential applications of nanofibers in biomedical and biotechnology. *Arabian Journal of Chemistry*, *11*(8), 1165–1188. https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2015.11.015

Hajiali, H., Summa, M., Russo, D., Armirotti, A., Brunetti, V., Bertorelli, R., Athanassiou, A., & Mele, E. (2016). Alginate-lavender nanofibers with antibacterial and anti-inflammatory activity to effectively promote burn healing. *Journal of Materials Chemistry B*, *4*(9), 1686–1695. https://doi.org/10.1039/c5tb02174j

Huan, S., Liu, G., Han, G., Cheng, W., Fu, Z., Wu, Q., & Wang, Q. (2015). Effect of experimental parameters on morphological, mechanical and hydrophobic properties of electrospun polystyrene fibers. *Materials*, *8*(5), 2718–2734. https://doi.org/10.3390/ma8052718

João Paulo Ferreira Santos, Aline Bruna da Silva, Uttandaraman Sundararaj, R. E. S. B. (2015). Novel Electrical Conductive Hybrid Nanostructures Based on PA 6/MWCNTCOOH Electrospun Nanofibers and Anchored MWCNTCOOH. *Society*, 1–10. https://doi.org/10.1002/pen

Kenry, & Lim, C. T. (2017). Nanofiber technology: current status and emerging developments. *Progress in Polymer Science*, *70*, 1–17. https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2017.03.002

Konwarh, R., Karak, N., & Misra, M. (2013). Electrospun cellulose acetate nanofibers: The present status and gamut of biotechnological applications. *Biotechnology Advances*, *31*(4), 421–437. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.01.002

Lloyd, A. G. (1980). Extraction and chemistry of cochineal. *Food Chemistry*, *5*(1),

91–107. https://doi.org/10.1016/0308-8146(80)90067-9

Martínez-Tomé, M., Jiménez, A. M., Ruggieri, S., Frega, N., Strabbioli, R., & Murcia, M. A. (2001). Antioxidant properties of Mediterranean spices compared with common food additives. *Journal of Food Protection*, *64*(9), 1412–1419. https://doi.org/10.4315/0362-028X-64.9.1412

McLeod, a, & United, N. F. and A. O. of the. (2011). World Livestock 2011 Livestock in food security World. In *World*.

Megelski, S., Stephens, J. S., Bruce Chase, D., & Rabolt, J. F. (2002). Micro- and nanostructured surface morphology on electrospun polymer fibers. *Macromolecules*, *35*(22), 8456–8466. https://doi.org/10.1021/ma020444a

Mellado, P., McIlwee, H. A., Badrossamay, M. R., Goss, J. A., Mahadevan, L., & Kit Parker, K. (2011). A simple model for nanofiber formation by rotary jet-spinning. *Applied Physics Letters*, *99*(20). https://doi.org/10.1063/1.3662015

Menzies, K. L., & Jones, L. (2010). The impact of contact angle on the biocompatibility of biomaterials. *Optometry and Vision Science*, *87*(6), 387–399. https://doi.org/10.1097/OPX.0b013e3181da863e

Mirjalili, M., & Zohoori, S. (2016). Review for application of electrospinning and electrospun nanofibers technology in textile industry. *Journal of Nanostructure in Chemistry*, *6*(3), 207–213. https://doi.org/10.1007/s40097-016-0189-y

N. Bifari, E., Bahadar Khan, S., A. Alamry, K., M. Asiri, A., & Akhtar, K. (2016). Cellulose Acetate Based Nanocomposites for Biomedical Applications: A Review. *Current Pharmaceutical Design*, *22*(20), 3007–3019. https://doi.org/10.2174/1381612822666160316160016

Nayak, R., Padhye, R., Kyratzis, I. L., Truong, Y. B., & Arnold, L. (2012). Recent advances in nanofibre fabrication techniques. *Textile Research Journal*, *82*(2), 129–147. https://doi.org/10.1177/0040517511424524

Post, M., & van der Weele, C. (2013). Principles of Tissue Engineering for Food. In *Principles of Tissue Engineering: Fourth Edition* (Fourth Edi). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-398358-9.00078-1

Puls, J., Wilson, S. A., & Hölter, D. (2011). Degradation of Cellulose Acetate-Based Materials: A Review. *Journal of Polymers and the Environment*, *19*(1), 152–165. https://doi.org/10.1007/s10924-010-0258-0

Quintero Quiroz, J., Naranjo Duran, A. M., Silva Garcia, M., Ciro Gomez, G. L., & Rojas Camargo, J. J. (2019). Ultrasound-assisted extraction of bioactive compounds from annatto seeds, evaluation of their antimicrobial and antioxidant activity, and identification of main compounds by LC/ESI-MS analysis. *International Journal of Food Science*, *2019*, 5–7. https://doi.org/10.1155/2019/3721828

Rahmalia, W., Fabre, J.-F., & Mouloungui, Z. (2015). Effects of Cyclohexane/Acetone Ratio on Bixin Extraction Yield by Accelerated Solvent Extraction Method. *Procedia Chemistry*, *14*(December), 455–464. https://doi.org/10.1016/j.proche.2015.03.061

Rauscher, H., Roebben, G., Rauscher, H., Roebben, G., Sanfeliu, A. B., Emons, H., Gibson, N., Koeber, R., Linsinger, T., Rasmussen, K., Sintes, J. R., Sokull-klüttgen, B., & Stamm, H. (2015). *Towards a review of the EC Recommendation for a definition of the term " nanomaterial " part 3*. https://doi.org/10.2788/678452

Reneker, D. H., & Hao, F. (2006). Polymeric nanofibers: Introduction. *ACS Symposium Series*, *918*, 1–6. https://doi.org/10.1021/bk-2006-0918.ch001

Rodríguez, K., Sundberg, J., Gatenholm, P., & Renneckar, S. (2014). Electrospun nanofibrous cellulose scaffolds with controlled microarchitecture. *Carbohydrate Polymers*, *100*, 143–149. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.12.037

Rogalski, J. J., Bastiaansen, C. W. M., & Peijs, T. (2017). Rotary jet spinning review – a potential high yield future for polymer nanofibers. *Nanocomposites*, *3*(4), 97–121. https://doi.org/10.1080/20550324.2017.1393919

Rogalski, J. J., Bastiaansen, C. W. M., & Peijs, T. (2018). PA6 nanofibre production: A comparison between rotary jet spinning and electrospinning. *Fibers*, *6*(2), 1–13. https://doi.org/10.3390/fib6020037

Scotter, M. (2009). The chemistry and analysis of annatto food colouring: A review. *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment*, *26*(8), 1123–1145. https://doi.org/10.1080/02652030902942873

Shahid-ul-Islam, Rather, L. J., & Mohammad, F. (2016). Phytochemistry, biological activities and potential of annatto in natural colorant production for industrial applications - A review. *Journal of Advanced Research*, *7*(3), 499–514. https://doi.org/10.1016/j.jare.2015.11.002

Shuiping, L., Lianjiang, T., Weili, H., Xiaoqiang, L., & Yanmo, C. (2010). Cellulose acetate nanofibers with photochromic property: Fabrication and characterization. *Materials Letters*, *64*(22), 2427–2430. https://doi.org/10.1016/j.matlet.2010.08.018

Silva, M. C. D., Botelho, J. R., Conceição, M. M., Lira, B. F., Coutinho, M. A., Dias, A. F., Souza, A. G., & Filho, P. F. A. (2005). Thermogravimetric investigations on the thermal degradation of bixin, derived from the seeds of annatto (bixa orellana L.). *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, *79*(2), 277–281. https://doi.org/10.1007/s10973-005-0049-3

Specht, L., & Lagally, C. (2017). Mapping Emerging Industries: Opportunities in Clean Meat. *White Paper by the Good Food Institute*, *501*(c), 8. https://www.gfi.org/images/uploads/2017/06/Mapping-Emerging-Industries.pdf%0Ahttp://www.gfi.org/images/uploads/2017/06/Mapping-Emerging-Industries.pdf

Sun, B., Long, Y. Z., Zhang, H. D., Li, M. M., Duvail, J. L., Jiang, X. Y., & Yin, H. L. (2014). Advances in three-dimensional nanofibrous macrostructures via electrospinning. *Progress in Polymer Science*, *39*(5), 862–890. https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2013.06.002

Tungprapa, S., Puangparn, T., Weerasombut, M., Jangchud, I., Fakum, P., Semongkhol, S., Meechaisue, C., & Supaphol, P. (2007). Electrospun cellulose acetate fibers: Effect of solvent system on morphology and fiber diameter. *Cellulose*, *14*(6), 563–575. https://doi.org/10.1007/s10570-007-9113-4

Vargas, E. A. T., do Vale Baracho, N. C., de Brito, J., & de Queiroz, A. A. A. (2010). Hyperbranched polyglycerol electrospun nanofibers for wound dressing applications. *Acta Biomaterialia*, *6*(3), 1069–1078. https://doi.org/10.1016/j.actbio.2009.09.018

Vasita, R., & Katti, D. S. (2006). Nanofibers and their applications in tissue engineering. *International Journal of Nanomedicine*, *1*(1), 15–30. https://doi.org/10.2147/nano.2006.1.1.15

Vieira, M. G. A., Da Silva, M. A., Dos Santos, L. O., & Beppu, M. M. (2011). Natural-based plasticizers and biopolymer films: A review. *European Polymer Journal*, *47*(3), 254–263. https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2010.12.011

Xu, H., Chen, H., Li, X., Liu, C., & Yang, B. (2014). A comparative study of jet formation in nozzle-and nozzle-less centrifugal spinning systems. *Journal of Polymer Science, Part B: Polymer Physics*, *52*(23), 1547–1559. https://doi.org/10.1002/polb.23596

Xu, J., Towler, M., & Weathers, P. J. (2016). Bioprocessing of Plant In Vitro Systems. In *Bioprocessing of Plant In Vitro Systems*. https://doi.org/10.1007/978-3-319-32004-5

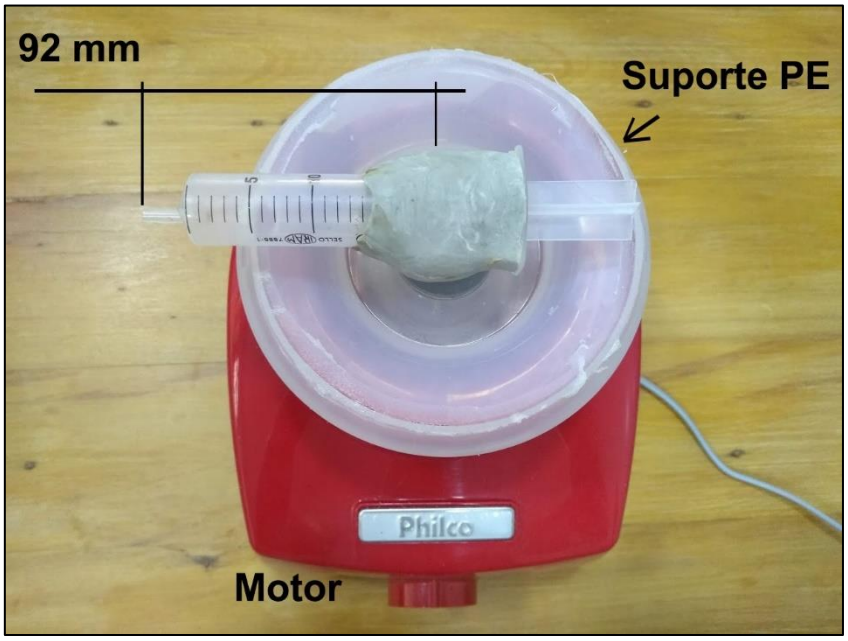
Yusa Marco, D., Domenech Carbo, M., VACCARELLA, I., BATISTA DOS SANTOS, A., Vicente Palomino, S., & Fuster López, L. (2008). Characterization of colouring compounds in annatto (Bixa Orellana L.) Used in historic textiles by means of uv-vis spectrophotometry and ft-ir spectroscopy. *Arché*, *3*, 153–158.

Zhang, W., Ronca, S., & Mele, E. (2017). Electrospun nanofibres containing antimicrobial plant extracts. *Nanomaterials*, *7*(2), 1–17. https://doi.org/10.3390/nano7020042

9 ANEXO 1 - EQUIPAMENTO DE FIAÇÃO POR JATO ROTATIVO (ROTARY JET SPINNING)

O equipamento de RJS foi construído de acordo com o procedimento proposto por Parker et. al. A figura 45 esquematiza a formatação utilizada neste trabalho, na qual uma seringa de polipropileno foi acoplada via massa epóxi no eixo de um motor rotativo de 1400W Philco.

Figura 45 - Vista superior do equipamento RJS.



Fonte: Próprio autor

A seringa foi posicionada sob o eixo do motor de forma que todo seu volume interno de trabalho estivesse posicionado na direção do jato polimérico a ser formado. Caso a seringa estivesse posicionada sob a eixo na posição central da seringa, turbulências poderiam ocasionar um jato polimérico inconsistente e de difícil controle. A massa epóxi foi depositada de forma a envolver todo o diâmetro da seringa juntamente ao eixo do motor, sendo formada uma proteção em seu entorno. Foi observado que massa epóxi demonstrou-se resistente quanto as rotações testadas e continuará a ser aplicada em futuros testes.

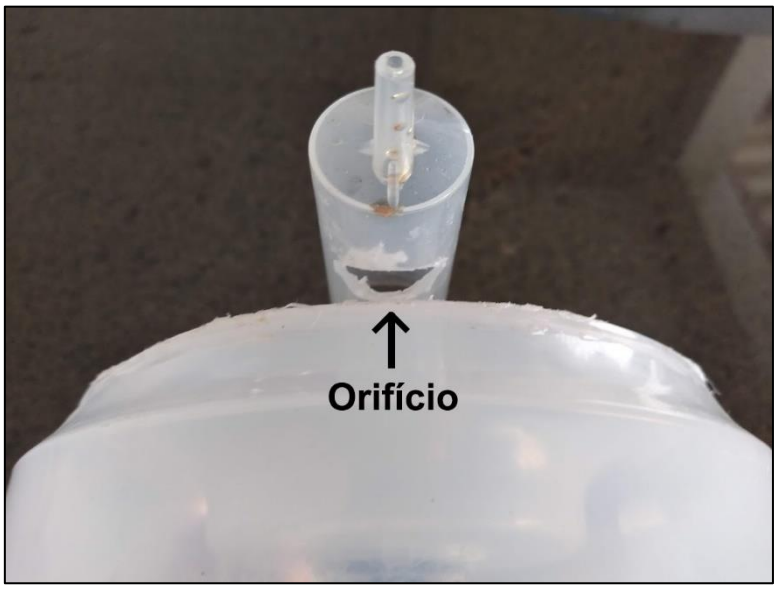
Foram conduzidos 3 testes experimentais utilizando-se este equipamento em sua menor rotação de trabalho (~12000RPM; velocidade de rotação medida via

tacômetro). Todos exibiram falhas durante o funcionamento do mesmo. As falhas observadas foram:

- Vibrações do equipamento;
- Contato da parte inferior da seringa com o suporte de polietileno;

A figura 46 exibe a consequência de uma falha de trabalho ocorrida durante um dos testes do protótipo, ocorrendo o contato da seringa com a parte superior do suporte utilizado. Devido a alta rotação aplicada, o contato aqueceu a região inferior da seringa devido ao atrito, e um orifício foi aberto na região do contato.

Figura 46 - Falha identificada após condução de teste experimental.



Fonte: Próprio autor

Uma hipótese do possível motivo da ocorrência desta falha foi a da ausência de um balanço de massa equilibrado. Objetos submetidos a altas rotações, como no caso, estão sujeitos a grandes forças de natureza centrípeta e centrífuga, logo, o posicionamento correto dos componentes que irão ser submetidos a rotação é de suma importância. Da maneira como a seringa foi posicionada, é possível dizer que um desbalanço de massa tenha ocasionado uma tendência de projetá-la para baixo, proporcionando seu contato com o suporte. Todavia, tal falha é passível de solução, em tese, basta posicionar a seringa a uma distância de segurança superior a utilizada, de maneira a evitar este contato indesejado, ou modificar a seringa de forma que existam duas saídas para o jato, de forma

que o abastecimento seja feito por um canaleto posicionado na parte superior do conjunto. Uma segunda hipótese referente a falha seria a da vibração do equipamento. A vibração pode ter sido responsável pela oscilação da seringa durante o funcionamento do equipamento, promovendo o contato da seringa com o suporte, sendo necessária uma melhor fixação do equipamento sob a mesa de trabalho.