



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

INSTITUTO DE QUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

“Síntese e caracterização de membranas de celulose regenerada a partir da celulose extraída do bagaço de cana-de-açúcar para produção de cuprofane”

Edmar Eustáquio de Souza

Orientadora: Prof^ª. Dra Rosana Maria Nascimento de Assunção

Co-Orientador: Prof. Dr. Guimes Rodrigues Filho.

Uberlândia

2009



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

INSTITUTO DE QUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

“Síntese e caracterização de membranas de celulose regenerada a partir da celulose extraída do bagaço de cana-de-açúcar para produção de cuprofane”.

Edmar Eustáquio de Souza

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Química como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Química, área de concentração em Físico-Química.

Orientadora: Prof^ª. Dra Rosana Maria Nascimento de Assunção

Co-Orientador: Prof. Dr. Guimes Rodrigues Filho.

Uberlândia

2009

ii

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

S729s Souza, Edmar Eustáquio de.

Síntese e caracterização de membranas de celulose regenerada a partir da celulose extraída do bagaço de cana-de-açúcar para produção de cuprofan / Edmar Eustáquio de Souza. - 2009.

71 f.

Orientadora: Rosana Maria Nascimento de Assunção.

Co-orientador: Guimes Rodrigues Filho.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Química.

Inclui bibliografia.

1. Química - Teses. 2. Bagaço de cana de açúcar - Teses. 3. Celulose - Teses. I. Assunção, Rosana Maria Nascimento de. II. Rodrigues Filho, Guimes. III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Química. III. Título.

CDU: 54

Elaborado pelo Sistema de Bibliotecas da UFU / Setor de Catalogação e Classificação



ALUNO(A): EDMAR EUSTÁQUIO DE SOUZA

NÚMERO DE MATRÍCULA: 86333

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: QUÍMICA

PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA: NÍVEL MESTRADO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO:

“Síntese e caracterização de membranas de celulose regenerada a partir da celulose extraída do bagaço de cana-de-açúcar para produção de cuprofane”

ORIENTADOR(A):

PROFª DRA. ROSANA MARIA NASCIMENTO ASSUNÇÃO

A Dissertação foi **APROVADA** em apresentação pública realizada na Sala 103 do Bloco 3Q, no Campus Santa Mônica, no dia 4 de setembro de 2009, às 14:00 horas, tendo como Banca Examinadora:

NOME:

ASSINATURA:

Profª. Dra. Rosana Maria Nascimento Assunção
(IQUFU)

Profª Dra. Harumi Otaguro
(UFSCar)

Prof. Dr. Manuel Gonzalo Hernández-Terrones
(IQUFU)

Uberlândia, 4 de setembro de 2009.

Dedico este trabalho primeiramente a Deus; e à duas pessoas que me ensinaram que tudo na vida deve ser feito com muito amor e que o segredo do sucesso está na simplicidade de colocar 'raça' em nossas habilidades; á minha mãe Dona Eunice e ao meu pai Sr. José Maria.

Dedico este trabalho à minha amada esposa Regiane Cristina da Silva Souza, companheira das horas alegres e difíceis,... me mostrou que "... o amor não busca seus próprios interesses, não se irrita, não guarda rancor. Não se alegra com a injustiça, mas se rejubila com a verdade. Tudo desculpa tudo crê, tudo espera, tudo suporta (Coríntios 13, 4-7)

AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores Rosana M. N. Assunção e Guimes Rodrigues Filho, pelas oportunidades, pela paciência e pela confiança depositada ao longo do nosso projeto.

Aos meus filhos Andressa e Gabriel pela compreensão nos momentos difíceis e pelo carinho nos momentos necessários.

Aos meus irmãos Márcia e Josimar pelo carinho e apoio nos momentos importantes e pelo orgulho em espelhá-los em muitos aspectos. Aos meus cunhados: Wellington e Cirlei pela amizade e apoio; Aos meus sobrinhos Henrique, Mayara e Maria Eduarda pelos momentos mágicos de ternura e amizade.

Ao Instituto de Química UFU pelo acolhimento e pelas atividades a mim confiadas.

Aos meus amigos técnicos IQUFU: André, Ildo, Buiatte, Edmilson, Otávio, Moacir, Wallans, Ricardo, Marilda, Ivan e Liana, pela amizade e pela contribuição ao meu projeto.

Ao Professor Dr Carlos Alberto pelo empenho nos testes de citotoxicidade e biocompatibilidade.

À Carla Meireles, Daniel, Julia, Sabrina, Geandre, Bárbara, Leandra e demais componentes do grupo de reciclagem de polímeros IQUFU pelo companheirismo e pela realização do trabalho conjunto.

Ao Instituto de Química da USP, Campus São Paulo, pelo ensaio de citotoxicidade da celulose regenerada.

Aos professores do IQUFU pela contribuição cultural e pessoal em cada etapa deste trabalho.

Aos meus demais familiares, em especial meu avô pelo carinho e incentivo.

Aos amigos da Escola Estadual João Rezende pelo incentivo e pela licença concedida para realização deste trabalho.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

Sumário

Índice de Figuras	ii
Índice de Tabelas	iv
Lista de Símbolos e abreviatura	v
Resumo	vi
Abstract	vii
Capítulo I. Introdução	2
Capítulo II. Revisão bibliográfica	5
II.1- Materiais Lignocelulósicos - principais fontes, importância e composição	5
II.2-Propriedades químicas e estruturais dos principais componentes da biomassa	8
II.2.1- Celulose	8
II.2.2- Hemicelulose	11
II.2.3- Lignina.....	12
II.3- Dissolução da celulose e produção da celulose regenerada	15
II.4- Diálise e hemodiálise	17
II.5- Ensaios de citotoxicidade	20
Capítulo III. Parte experimental	24
III.1- Obtenção da celulose a partir do bagaço de cana-de-açúcar....	24
III.2- Caracterização do bagaço de cana-de-açúcar e da celulose purificada	24
III.2.1- Lignina Klason	24
III.2.2- Obtenção da holocelulose	24
III.2.3- Obtenção da celulose	25
III.3- Preparação das membranas de celulose regenerada	26
III.4 -Caracterização dos materiais	27
III.4.1- Espectroscopia na região do infravermelho (FTIR)	27
III.4.2- Análise termogravimétrica	27
III.4.3- Espectroscopia de absorção atômica	27
III.4.4- Microscopia eletrônica de varredura	28
III.4.5- Determinação da viscosidade intrínseca - Determinação da viscosidade em soluções de hidróxido de bis(etilenodiamino)cobre (II) (CUEN) com viscosímetro capilar	28

III.5 -Ensaio de citotoxicidade	29
Capítulo IV- Resultados e Discussão	32
IV.1- Caracterização da celulose de partida.....	32
IV.2- Espectroscopia na região do infravermelho	38
IV.3- Análise termogravimétrica	45
IV.4- Microscopia eletrônica de varredura.....	46
IV.5- Espectroscopia de absorção atômica.....	47
IV.6- Ensaio de citotoxicidade.....	48
Capítulo V- Conclusão.....	51
Capítulo VI- Trabalhos futuros.....	53
Capítulo VII- Referências bibliográficas.....	55

Índice de Figuras

Figura 1: Representação esquemática do aproveitamento dos principais componentes da biomassa	7
Figura 2: Estrutura que se repete na molécula de celulose.....	8
Figura 3: Estrutura dos cristais de celulose I e celulose II – (a) Projeção da cela unitária ao longo do plano a – b, (b) distinção entre celulose I e II a partir do padrão de ligações de hidrogênio	10
Figura 4: Açúcares presentes nas hemiceluloses	11
Figura 5: Representação esquemática das (a) unidades estruturais da lignina , (b) estrutura da lignina proposta por Adler	13
Figura 6: Parte do sistema de ligações de hidrogênio na celulose nativa e sua mudança após a coordenação com íons cobre (II) presentes no cuoxam.....	16
Figura 7: Representação esquemática do processo de diálise	18
Figura 8: Representação esquemática do processo de hemodiálise	19
Figura 9: Esquematização da produção de membrana de celulose regenerada.....	26
Figura 10: Processamento da celulose na forma de membrana.....	36
Figura 11: Espectros na região do infravermelho para a celulose purificada do bagaço de cana-de-açúcar (a) e para a celulose da Rodhia usada como padrão (b)	38
Figura 12: Espectros na região do infravermelho para as membranas de celulose regenerada (a) e para Cuprofan comercial (b)	40
Figura 13: Espectros na região do infravermelho para as membranas de celulose regenerada – região de 1700 a 500 cm^{-1}	42
Figura 14: Razão entre a intensidade das bandas em 1370 e 2900 cm^{-1} em função do grau de cristalinidade das amostras obtida pela técnica de difração de raios - X...	43

Figura 15: Modelo para o corte das linhas de base e da intensidade referente as bandas analisadas.....	44
Figura 16: Curva termogravimétrica para as membranas de celulose regenerada	45
Figura 17: Microscopia eletrônica de varredura para as membranas de celulose regenerada.....	46
Figura 18: Resultado dos testes de citotoxicidade. Curvas de viabilidade celular usando a absorção do corante vermelho neutro	49

Índice de Tabelas

Tabela 1: Algumas fontes para obtenção de celulose.....	5
Tabela 2: Composição percentual de resíduos agroindustriais.....	6
Tabela 3: Caracterização do bagaço de cana-de-açúcar bruto e da celulose após a extração.....	32
Tabela 4: Composição dos 3 principais componentes da pasta celulósica da Rhodia usada como padrão	33
Tabela 5: Massa molecular média obtida por viscosimetria capilar.....	34
Tabela 6: Principais atribuições das bandas de absorção dos espectros na região do infravermelho para a celulose purificada do bagaço de cana-de-açúcar (A) e da celulose da Rodhia (B)	39
Tabela 7: Principais bandas de absorção de ligninas.....	40
Tabela 8: Grau de ordem obtido por espectroscopia na região do infravermelho.....	44
Tabela 9: Teor de Cu(II).....	48

Lista de símbolos e abreviaturas

- FTIR = Espectrometria no Infravermelho com Transformada de Fourier
- MEV = Microscopia Eletrônica de Varredura
- CUEN = Hidróxido de bis(etilenodiamino)cobre (II)
- \overline{M}_v = Massa Molecular Média Viscosimétrica
- a = parâmetro do solvente utilizado em viscosimetria.
- K = parâmetro do solvente utilizado em viscosimetria.
- η_{rel} = viscosidade relativa
- η_{int} = viscosidade intrínseca
- η_{sp} = viscosidade específica
- l = espessura da membrana
- J = fluxo através da membrana
- A = área da membrana
- PSM = Processo de separação por membranas
- MBAG = membrana de celulose regenerada extraída do bagaço de cana-de-açúcar
- MROD = membrana de celulose regenerada extraída da polpa de celulose Rhodia

Resumo

Em trabalhos anteriores membranas de celulose regenerada produzidas a partir da celulose extraída do bagaço de cana de açúcar foram preparadas a partir de uma adaptação do método cupramônio. Embora tenha sido possível produzir as membranas estas apresentaram elevado teor de íons Cu (II) fato que inviabilizou sua aplicação na área médica. A preparação de membranas de celulose regenerada foi reexaminada e alterações na metodologia como a remoção de uma etapa intermediária (banho alcalino) e o aumento no tempo no banho ácido de regeneração foram propostas como forma de diminuir o teor de íons Cu(II). Duas membranas foram produzidas: MBAG (usando celulose extraída do bagaço de cana-de-açúcar) e MROD (usando uma polpa celulósica da Rodhia produzida a partir da madeira de Pinnus). Com as alterações na metodologia, a porcentagem de cobre (II) na membrana de celulose regenerada do bagaço (0,0236%) apresentou uma diminuição de cerca de 15 vezes em relação as membranas produzidas em trabalhos anteriores (0,3634%). Os dados de viabilidade celular, obtidos a partir da técnica de incorporação de corantes vitais mostraram que as membranas MBAG e MROD não apresentam toxicidade às culturas celulares estudadas. Estes resultados mostram uma evolução na produção de membranas de celulose regenerada a partir do bagaço de cana de açúcar devido principalmente a diminuição no teor de íons Cu(II) mostrando possibilidades de aplicação destes sistemas com a melhora do processamento das membranas.

Abstract

In previous work regenerated cellulose membranes produced from the cellulose extracted from sugar cane bagasse were prepared from an adaptation of the Cuprammonium method. Although it has been possible to produce the membranes, it showed high levels of Cu (II) ions, fact that can impossible their application in medical field. In this work, the preparation of these membranes was realized through changes in the methodology as the removal of an intermediate stage (alkaline bath) and the increase in time in the acid bath for cellulose regeneration. Two membranes were produced: MBAG (using cellulose extracted from sugar cane bagasse) and MROD (using cellulose from Pinnus pulp supplied by Rhodia). With the changes in methodology, the copper (II) percentage on the membrane of MBAG (0.0236%) showed a decrease of about 15 times for the membranes produced in previous works (0.3634%). The cell viability data obtained by the technique of incorporation of vital dyes showed that the membranes MBAG and MROD have no toxicity to cell cultures studied. These results indicate a positive way in order to reuse the sugar cane bagasse cellulose for production of devices used in medicine as membranes for hemodialysis therapy.

I. Introdução

Membranas de celulose regenerada são utilizadas comercialmente em vários processos de separação devido às marcantes propriedades mecânica, térmica e elevada hidrofiliçidade, além disto, estas membranas podem ser amplamente utilizadas em processos biológicos uma vez que são biocompatíveis. Um exemplo de processo biológico de elevada importância é a hemodiálise. O aspecto que torna as membranas de celulose regenerada ainda atrativas no emprego como rim artificial é seu baixo custo em comparação a membranas sintéticas como poliacrilamida e polisulfonas e semi-sintéticas como o hemophan (celulose modificada por substituição de parte dos grupos hidroxilas por grupos dietilamonoetil) [1, 2]. Em geral, o algodão é a fonte celulósica mais empregada para a produção destas membranas devido a sua elevada pureza cerca de 94,0% e elevada massa molar [3]. Polpas celulósicas produzidas com elevada porcentagem de α -celulose são adequadas a produção destas membranas, fato que permite a utilização de fontes lignocelulósicas alternativas como bagaço de cana-de-açúcar para obtenção de celulose e seu uso na preparação de materiais com aplicação industrial como membranas de separação e em processos como a hemodiálise.

Em trabalhos anteriores realizados pelo Grupo de Reciclagem de Polímeros IQUFU, membranas de celulose regenerada foram produzidas com sucesso a partir da celulose extraída do bagaço de cana-de-açúcar. As membranas foram preparadas a partir da dissolução da celulose em dois solventes típicos: o hidróxido de tetramincobre (II) [4, 5] e hidróxido de bis(etilenodiamino)cobre(II) [5]. As membranas apresentaram boa trabalhabilidade no que se refere à manipulação e propriedade mecânica. Entretanto, foi observada a retenção de um elevado teor de íons cobre (II) na estrutura das membranas, 6,18% [4]. Em trabalho posterior observou-se uma redução do teor de íons cobre (II): 0,4468 e 0,3634% para as membranas produzidas a partir da dissolução em hidróxido de tetramincobre(II) e hidróxido de bis(etilenodiamino)cobre (II) respectivamente [5].

Dois fatores estão relacionados a elevada retenção de íons cobre (II) observada nos trabalhos anteriores:

- i) A presença de resíduos dos processos de purificação (fragmentos de lignina, por exemplo) que podem estar adsorvidos sob a estrutura da celulose purificada uma vez que as amostras usadas como padrão (papel de filtro Whatman 4 e fibras de algodão) apresentam sempre um teor de cobre (II)

inferior. Este fato foi ainda confirmado quando o processo de purificação da celulose do bagaço de cana-de-açúcar foi modificado para reduzir a quantidade de lignina, observando com este procedimento uma diminuição no teor de Cu(II) com o aumento no tempo de purificação [5];

- ii) Devido ao processamento, uma vez que mesmo as membranas preparadas a partir das fontes mais puras de celulose apresentam teores de cobre elevados frente ao valor observado para as membranas comerciais (2mg Cu(II)/m² cerca de 0,010%) [6]. Embora tenha sido observado uma diminuição nos teores de íons Cu(II) nas membranas produzidas anteriormente, os valores foram ainda muito altos mesmo para a realização de ensaios de citotoxicidade e biocompatibilidade.

Neste trabalho a produção de membranas de celulose regenerada a partir da celulose extraída do bagaço de cana-de-açúcar foi retomada visando melhorar o processo de produção das membranas principalmente em relação a diminuição da porcentagem de íons cobre (II) e a realização dos ensaios de citotoxicidade, primeiro passo para a avaliação biológica do material. As membranas produzidas foram caracterizadas através das técnicas espectroscopia na região do infravermelho, análise termogravimétrica e microscopia eletrônica de varredura.

II. Revisão bibliográfica

II.1. Materiais lignocelulósicos – principais fontes, importância e composição.

Na obtenção de celulose para a produção de derivados celulósicos são utilizados freqüentemente o algodão e a madeira como fonte de material lignocelulósico devido a necessidade de se trabalhar com polpas celulósicas de elevada pureza cerca de 85,0% de α -celulose [7]. Entretanto, em principio qualquer material lignocelulósico pode ser empregado para o mesmo fim, bastando neste caso encontrar formas viáveis de se extrair a celulose para a obtenção de polpas adequadas. Na tabela 1, são apresentados alguns materiais lignocelulósicos e o conteúdo aproximado de celulose encontrado em cada um deles.

Tabela 1. Algumas fontes para obtenção de celulose [3].

Fonte	(%) celulose
Algodão	94
Cânhamo	77
Linho	75
Sumaúma	75
Sisal	75
Rami	73
Juta	63
Madeira	50
Bambu	40 - 50
Palha	40 - 50

Os dados apresentados na tabela 1 mostram a existência de um número expressivo de fontes celulósicas que apresentam elevado conteúdo de celulose e que podem ser empregadas para a produção de polpa celulósica. A produção mundial de polpa celulósica da madeira em 2003 foi estimada em 170.358.000 toneladas enquanto a produção de polpas celulósicas produzidas a partir de fontes alternativas atingiu cerca de 1.869.500 tons. Mesmo com esta diferença, os números indicam um amplo crescimento no aproveitamento de outras fontes celulósicas [8].

Outras fontes alternativas de celulose são os resíduos agroindustriais lignocelulósicos. Resíduos lignocelulósicos tais como bagaço de cana-de-açúcar, palha

de arroz, casca de aveia, resíduos de frutas e resíduos florestais representam fontes abundantes e não dispendiosas de carboidratos (celulose e hemicelulose) com potencial aplicação na produção de polpa celulósica ou conversão química ou microbiana em produtos de interesse comercial como os biocombustíveis. A composição percentual de alguns resíduos agroindustriais está resumida na tabela 2.

Tabela 2. Composição percentual de resíduos agroindustriais [9].

Fonte	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)
Farelo de Cevada	25	33	24
Sabugo de milho	31	34	20
Folhas do milho	38	34	13
Bagaço de cana-de-açúcar	40	26	25
Palha de arroz	43	22	17
Palha de trigo	34	32	20
Palha de sorgo	34	44	20

O bagaço de cana-de-açúcar é um dos resíduos agroindustriais mais estudados do ponto de vista de sua aplicação na produção de polpas celulósicas assim como a produção de biocombustíveis a partir da celulose. Um dos aspectos que contribuem para este fato é a elevada geração destes resíduos pelas indústrias de açúcar e álcool e o elevado conteúdo de celulose neste material. O Brasil é o maior produtor de cana-de-açúcar do mundo, seguido pela Índia e Austrália. Em média, 55% da cana-de-açúcar brasileira é utilizada na produção de álcool e 45% para a produção de açúcar. No Brasil, a produção de cana-de-açúcar no ano de 2007 foi de 514,1 milhões de toneladas e a produção de 2008 foi de 561,8 milhões de toneladas, uma safra 9,3% superior a obtida em 2007 [10]. Para cada tonelada de cana-de-açúcar empregada na produção de açúcar e álcool são produzidos como resíduo cerca de 280 kg de bagaço de cana-de-açúcar. Embora as próprias usinas utilizem de 60% a 90% deste resíduo como fonte energética (substitui o óleo combustível no processo de aquecimento das caldeiras) e para a geração de energia elétrica, ainda existe um excedente que pode ser utilizado. Merece destaque seu emprego como matéria-prima na indústria de papel e papelão, na fabricação de aglomerados, na construção civil, como ração animal entre outros.

Os materiais lignocelulósicos são fontes renováveis para possíveis rotas de química verde, neste sentido os 3 principais componentes podem ser aproveitados para a produção de substâncias de importância comercial considerando o conceito de valorização da biomassa. Neste caso, celulose, hemicelulose e lignina podem sofrer processos químicos que levem a produção de biomateriais, biocombustíveis e substâncias intermediárias na produção de polímeros, solventes entre outras substâncias. A figura 1 apresenta de forma resumida os caminhos para o aproveitamento destes componentes majoritários da biomassa.

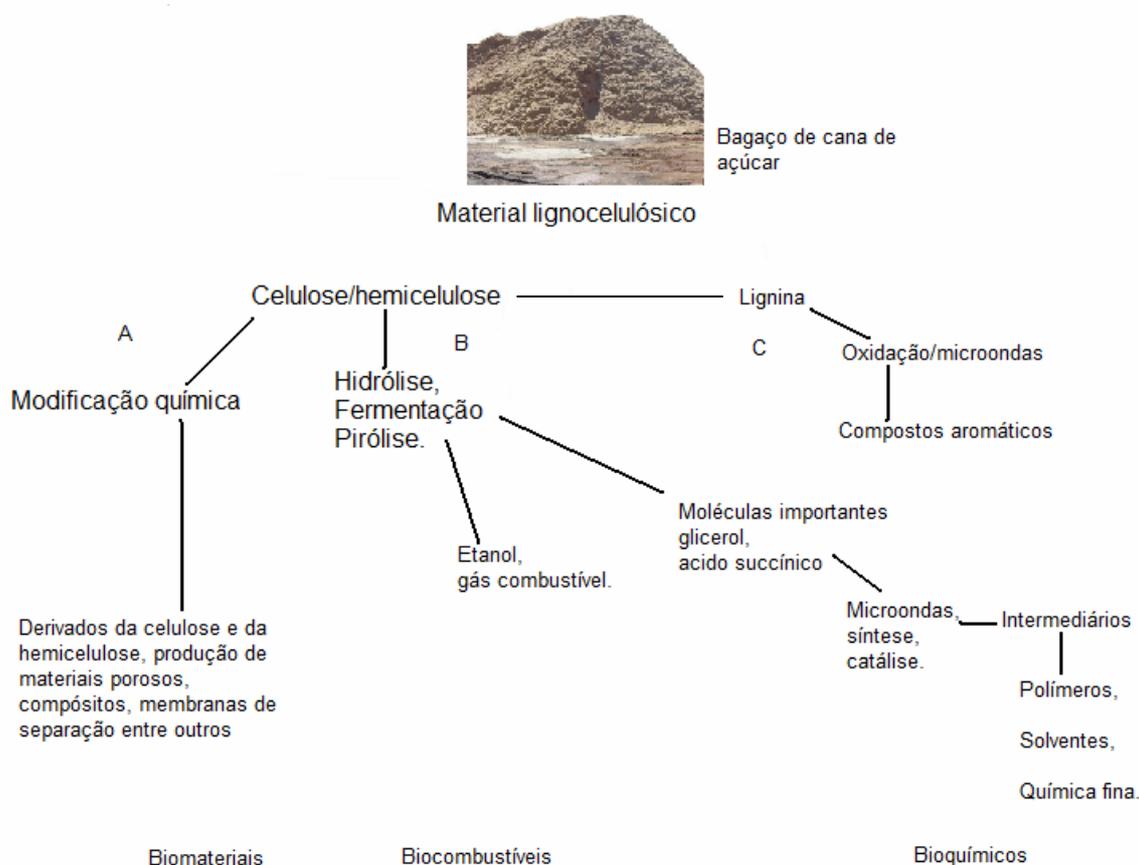


Figura 1. Representação esquemática do aproveitamento dos principais componentes da biomassa.

Neste trabalho a celulose obtida do bagaço de cana-de-açúcar foi convertida em membranas de celulose regenerada, seguindo a linha A de aproveitamento da biomassa, apresentada na figura 1 para a preparação de biomateriais.

II.2. Propriedades químicas e estruturais dos principais componentes da biomassa.

II.2.1. Celulose

Anselme Payen sugeriu em 1838 que a parede celular de qualquer planta é constituída a partir da mesma substância. Apenas no século XX que a estrutura desta substância chamada celulose foi elucidada, a partir dos trabalhos pioneiros de Hermann e Staudinger. Através de reações de acetilação e desacetilação, Staudinger reconheceu que a estrutura da celulose não era formada por agregados de unidades de glicose, e sim por longas cadeias formadas pela ligação covalente entre as unidades de glicose. Este fato, associado à pesquisa realizada com outras moléculas ligadas em cadeia marca a descoberta do estado polimérico das moléculas e de reações correspondentes a estas macromoléculas que são únicas e representam a origem da ciência de polímeros [11, 12].

A celulose é um homopolímero linear formado por unidades de glicose ligada entre si através da posição 1 de uma das unidades e da posição 4 da outra unidade formando ligações $\beta(1\rightarrow4)$. O dímero, celobiose apresentado na figura 2, é a unidade repetitiva da celulose. É importante salientar, no entanto que o grau de polimerização, que fornece o tamanho da cadeia polimérica, é calculado em relação ao número de unidades de glicose presentes no polímero [12].

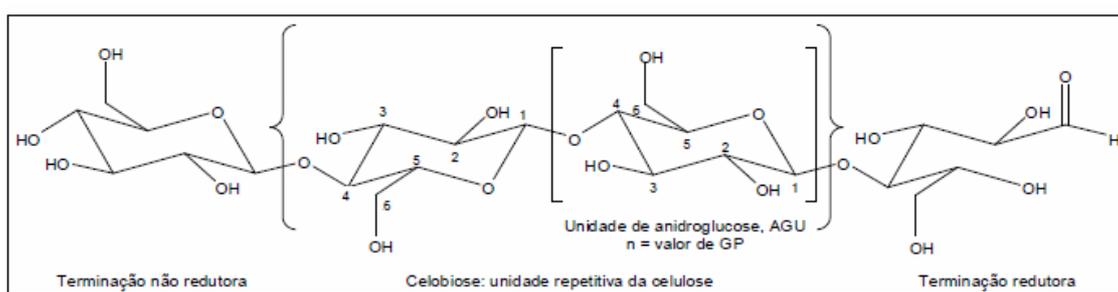


Figura 2- Estrutura molecular da celulose.

A glicose é um açúcar redutor, pois a posição 1 do anel glicosídico referente ao carbono anomérico, está em equilíbrio com a estrutura aberta cuja função química é um aldeído. Considerando que a celulose é formada a partir da ligação entre as unidades de

glicose na posição 1 e 4, as cadeias do polímero apresentam diferenças quanto a reatividade química nas extremidades pois em um dos finais a unidade de glicose terá um grupo C4-OH livre, uma extremidade não redutora, e na outra extremidade existirá um grupo C1-OH livre, uma extremidade redutora. Do ponto de vista químico a celulose pode ainda apresentar outros grupos funcionais dependendo da forma com que foi isolada, no processo de polpação e branqueamento da madeira, neste caso a celulose pode apresentar grupos carboxílicos e carbonílicos como resultado das reações [11, 12].

Devido à presença de um elevado número de grupos hidroxila, a celulose é um polímero altamente hidrofílico, sem, contudo ser solúvel em água. A insolubilidade da celulose em água e solventes comuns está relacionado a organização das estruturas em relação as ligações de hidrogênio realizadas pelas hidroxilas presentes nas unidades de glicose. Devido a este intrincado sistema de ligações de hidrogênio intra e intermoleculares a celulose apresenta uma estrutura fibrosa e semicristalina.

Considerando as ligações de hidrogênio intra e inter cadeias na celulose, o material apresenta ordenamento e consequentemente cristalinidade. A estrutura cristalina da celulose é complexa apresentando 4 diferentes formas polimórficas dependendo do tipo de tratamento que a celulose sofra. Estas estruturas são conhecidas como celulose I, II, III e IV. A celulose I é a estrutura encontrada na celulose nativa sendo ainda formada por 2 alomorfos I_{α} e I_{β} . A celulose II é obtida por tratamento químico da celulose I em dois caminhos: i) no processo de dissolução da celulose e reprecipitação ou regeneração das fibras ou dos filmes, e ii) no processo de mercerização da celulose, processo no qual as fibras celulósicas são inchadas em meio alcalino visando aumentar a acessibilidade da fibra a agentes químicos em processos de modificação química, um exemplo, de processo desta natureza ocorre durante a produção da metilcelulose [13, 14]. Entre as duas estruturas citadas a celulose II é a mais estável termodinamicamente e, portanto sua conversão é favorável e o produto estável (fibras, filmes de celulose regenerada ou polímeros modificados como a metilcelulose). A celulose III é obtida a partir do tratamento da celulose I e II com amônia líquida e a celulose IV é obtida pelo tratamento térmico da celulose III [11, 12].

Considerando o objetivo deste trabalho, preparação e caracterização de membranas de celulose regenerada, a conversão de celulose I para celulose II é o

processo de maior relevância uma vez que a dissolução e subsequente precipitação/regeneração da celulose leva a formação de fibras bem orientadas e/ou de filmes de celulose regenerada dependendo do processamento. Esta conversão será eficiente se o processo de dissolução da celulose for efetivo.

A figura 3 apresenta a distinção da celulose I e II a partir da projeção da cela unitária dos cristais ao longo do plano a – b(a) e a partir do sistema de ligações de hidrogênio predominante em cada estrutura.

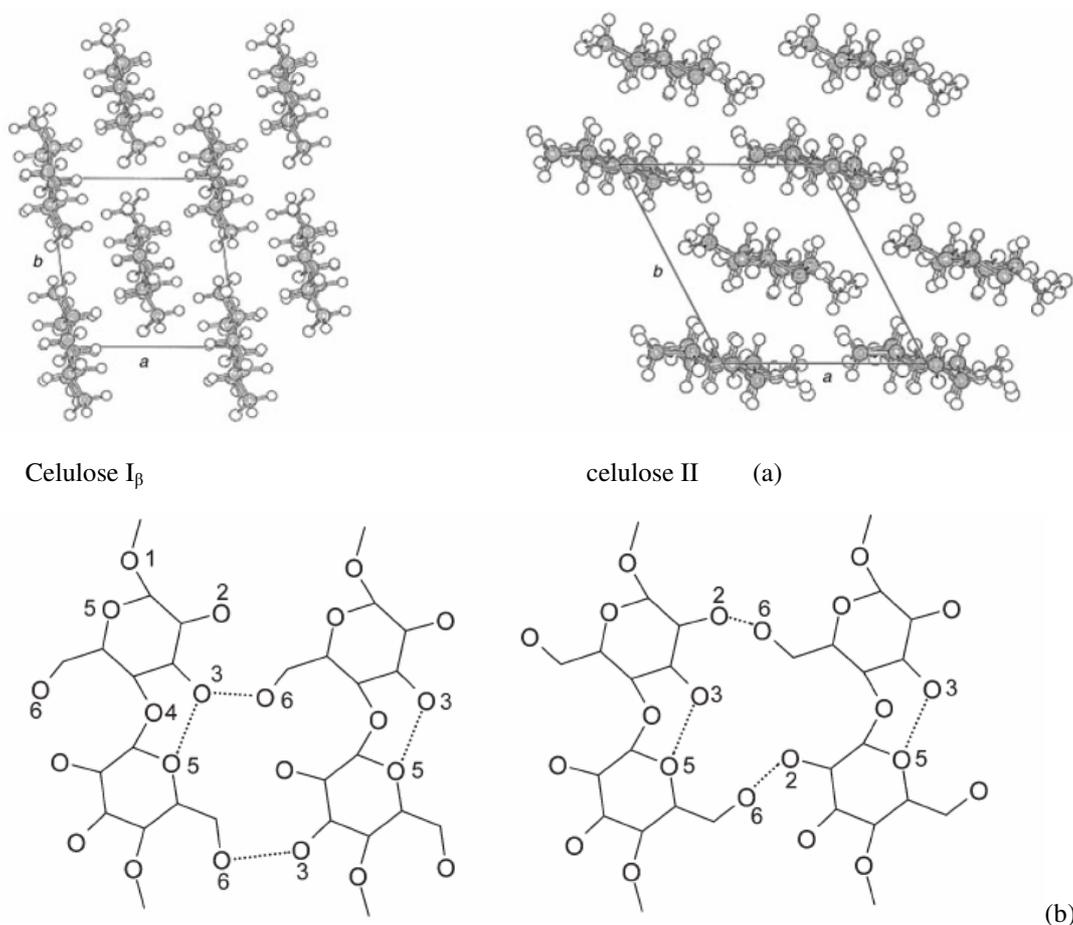


Figura 3. Estrutura dos cristais de celulose I e celulose II – (a) Projeção da cela unitária ao longo do plano a – b, (b) distinção entre celulose I e II a partir do padrão de ligações de hidrogênio [11, 12].

Ambas as estruturas observadas na figura 3b apresentam ligações de hidrogênio intra-cadeias dominantes na posição O3-H...O5. Estas ligações de hidrogênio dão a celulose a rigidez e linearidade da cadeia. A grande diferença entre a celulose I e II

surge em relação às ligações de hidrogênio inter-cadeias. Na figura 3b observa-se que a celulose I apresenta predominantemente as ligações de hidrogênio em relação à posição O6-H...O3 e na celulose II o conjunto dominante se refere a posição O6-H...O2. Este fato tem influencia direta na estrutura do retículo cristalino como pode ser observado na figura 3a, com a existência de duas formas polimórficas mais comuns para a celulose.

II.2.2. Hemicelulose

A hemicelulose é um heteropolissacarídeo encontrado nas paredes celulares das plantas. Enquanto a celulose, como substância química, tem como unidade fundamental exclusivamente a β -D-glucose, nas hemiceluloses os açúcares que estão presentes com maior frequência são a β -D-glucose, β -D-xilose, β -D-manose, α -D-arabinose e a α -D-galactose, conforme as estruturas apresentadas na figura 4.

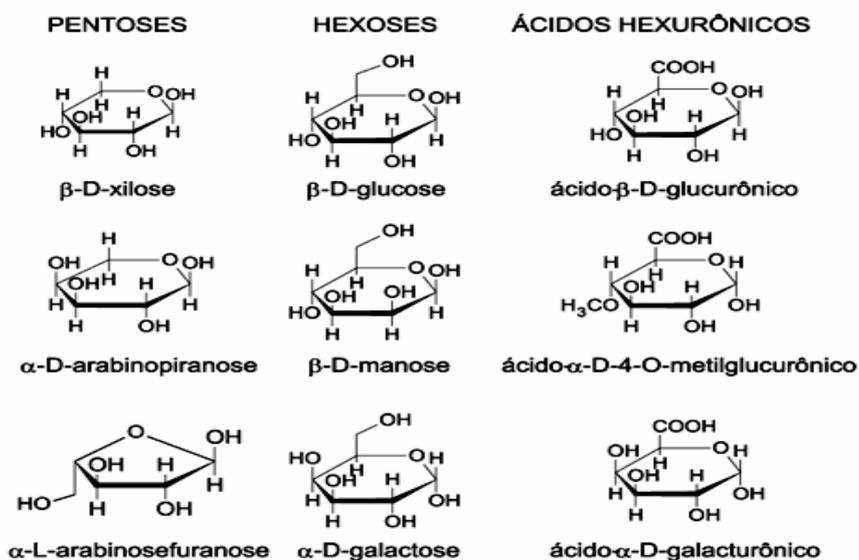


Figura 4. Açúcares presentes nas hemiceluloses [15].

Enquanto a celulose apresenta elevada cristalinidade, resistência mecânica e resistência a hidrólise ácida ou alcalina, as hemicelulose apresentam estrutura aleatória, amorfa, pequena resistência mecânica e são facilmente hidrolisadas com ácidos ou bases diluídas. As diferenças observadas entre a celulose e as hemiceluloses estão associadas

a estrutura química. As hemiceluloses são formadas a partir de vários açúcares apresentando diversas ramificações que se ligam as microfibrilas de celulose. A baixa cristalinidade pode estar relacionada à estrutura ramificada e aleatória das hemiceluloses. Em comparação à celulose as hemiceluloses apresentam cadeias poliméricas menores e, portanto, menor massa molar.

Esses açúcares possuem 5 ou 6 átomos de carbono, sendo, portanto denominados pentoses e hexoses, respectivamente. Os polímeros formados por estas unidades são denominados pentosanas e hexosanas, respectivamente. Essas cadeias podem ainda conter em pequenas quantidades ácidos derivados de monossacarídeos como o ácido β -D glucorônico, β -D-galactourônico e ácido α -D-4-O-metilglucourônico [15]. Isoladas da madeira, essas macromoléculas apresentam-se como misturas complexas de polissacarídeos, dessa forma, o termo hemiceluloses não se refere a um composto químico, mas sim a um conjunto de polímeros [15].

II.2.3. Lignina

Entre os três componentes principais da biomassa a celulose e a lignina são as fontes naturais renováveis mais abundantes. A lignina é uma macromolécula polifenólica presente na parede celular das plantas conferindo rigidez. Sua função é “cimentar” as fibras celulósicas agindo como uma barreira à degradação enzimática da parede celular. Bioquimicamente a lignina é produzida a partir da polimerização enzimática de 3 monômeros: o álcool coniferílico, o álcool sinapílico e o álcool p-cumarílico, que levam as unidades guaiacila (G), siringila (S) e p-hidroxipropano (p-H) conforme destacado na figura 5a. A macromolécula de lignina tem estrutura tridimensional ramificada e suas unidades de repetição não são regulares ou ordenadas, a complexidade estrutural pode ser observada na figura 5 b, uma representação esquemática da estrutura da lignina proposta por Adler [16].

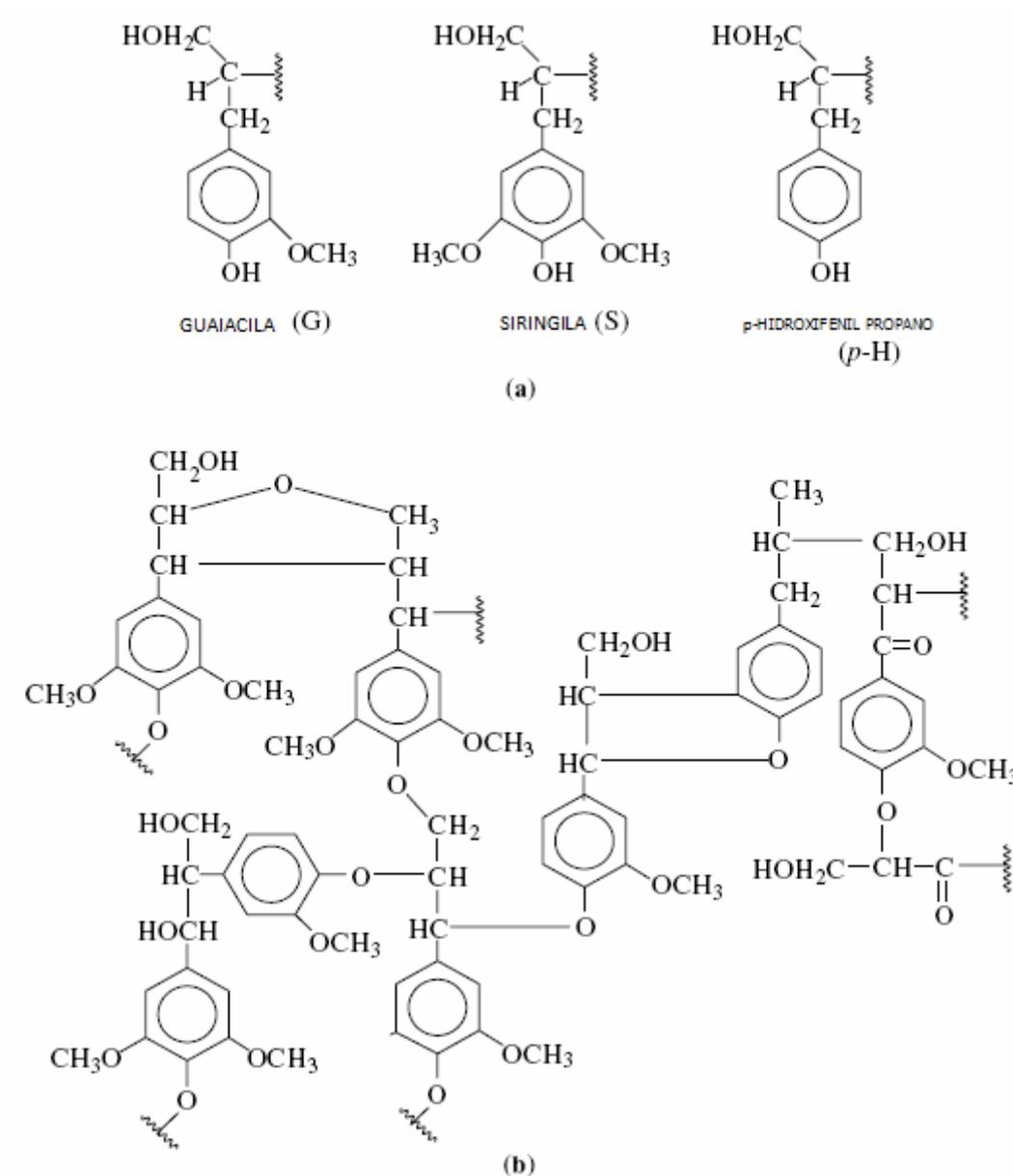


Figura 5. Representação esquemática das (a) unidades estruturais da lignina , (b) estrutura da lignina proposta por Adler [16].

Os detalhes sub-estruturais das ligninas diferem de uma fonte para outra, sendo que as madeiras duras ou angiospermas, como as do gênero *Eucalyptus*, são geralmente formadas por unidades guaiacil e siringilpropanóides, enquanto que em madeiras moles ou gimnospermas, como as do gênero *Pinus*, têm suas ligninas formadas principalmente por unidades guaiacilpropanóides [15].

O tipo de lignina predominante em determinado resíduo agroindustrial pode ser classificado de acordo com a abundância relativa entre as unidade G, S e H de acordo

com Tejado et al. [16]. O bagaço de cana-de-açúcar apresenta estrutura típica de lignina HGS de gramíneas, ou seja, elevado conteúdo de unidades p-H (p-hidroxiopropanóides) [17].

Devido às alterações que as ligninas sofrem durante seu processo de isolamento, sua estrutura química não é totalmente conhecida.

Para a produção de polpa e papel, a lignina é removida por meio de processos mecânicos e químicos. Os processos químicos se baseiam na solubilização da lignina por meio da hidrólise de suas ligações éter e da adição de grupos hidrofílicos como os grupos sulfito que se ligam aos anéis aromáticos. Geralmente, quando a lignina é submetida a ataque ácido em meio a solventes orgânicos, têm-se como produtos solúveis as ligninas denominadas organossolúveis. Outra classe se refere aos produtos das reações da lignina com reagentes inorgânicos sendo os produtos as tioligninas, ligninas alcalinas e lignossulfatos. Os licores escuros produzidos podem servir de fonte para outros produtos químicos como, por exemplo, os lignosulfonatos usados como aditivos na indústria de construção civil.

II.3. Dissolução da celulose e produção de membranas de celulose regenerada.

Embora a celulose não seja solúvel em solventes orgânicos comuns, existem vários métodos alternativos usados para dissolvê-la para a subsequente produção de fibras ou membranas por regeneração da celulose em um banho ácido. A tecnologia mais antiga para produção de celulose regenerada é o processo Viscose que foi desenvolvido a cerca de 100 anos atrás [1, 18]. Este método consiste no tratamento da celulose com hidróxido de sódio para produção do álcali – celulose e subsequente reação com dissulfeto de carbono (CS_2) cujo produto é uma solução de xantato de celulose. As fibras de celulose regenerada são produzidas por extrusão contínua da solução em um banho ácido. O que torna este processo um sucesso até os dias de hoje é o baixo custo e boas propriedades mecânicas das fibras produzidas, utilizadas principalmente na indústria têxtil. Entretanto, um dos aspectos negativos associados a este processo industrial são os subprodutos gerados (CS_2 , H_2S e metais pesados) que são ambientalmente indesejáveis. Um método alternativo para a produção de fibras celulósicas (Cupro silk) e membranas de celulose regenerada (Cuprofan) é o método Cuproamônio. Neste processo a celulose em meio alcalino é dissolvida por meio da reação das hidroxilas das unidades de glicose com o complexo tetramincobre(II). Este método é utilizado para produção do Cuprofan, uma membrana com boa resistência mecânica e biocompatibilidade usada no processo de hemodiálise [6].

Vários sistemas solventes para a celulose vêm sendo desenvolvidos e testados com o intuito de minimizar os efeitos ambientais em relação aos métodos mais antigos discutidos acima, uma destas tentativas é o desenvolvimento do sistema Liocel, cujo solvente é o N-óxido de N-metilmorfolina. Este método tem como vantagem a geração de menor quantidade de subprodutos indesejáveis, entretanto a fibra produzida ainda tem problemas em comparação às produzidas por métodos tradicionais, como a tendência a fibrilar no estado molhado. Recentemente outros sistemas solventes vêm sendo propostos alguns ambientalmente mais amigáveis como os sistemas NaOH/uréia e NaOH/tiouréia [18] e os líquidos iônicos como o 1-butil-3-metilimidazólio [19].

Os dois primeiros vem sendo usados na produção de membranas de celulose regenerada, entretanto o principal problema ainda a ser resolvido são as características finais dos filmes produzidos, uma vez que a dissolução da celulose nestes solventes ainda é limitada a fontes de baixa massa molar fato que pode levar a uma má formação do filme ou membrana.

Os líquidos iônicos são um campo promissor em desenvolvimento sendo utilizados com sucesso em processos de dissolução da celulose para síntese posterior [19].

O sistema mais antigo utilizado com sucesso, chamado Cuoxam foi reportado por Schweizer como um poderoso solvente capaz de solubilizar a celulose. O mecanismo de dissolução proposto para o sistema celulose solvente hidróxido de tetramincobre(II) está baseado na realização de ligações coordenadas entre os íons cobre e os grupos hidroxilas desprotonados nas posições C2 e C3 das unidades de glicose, conforme o apresentado esquematicamente na figura 6 [20].

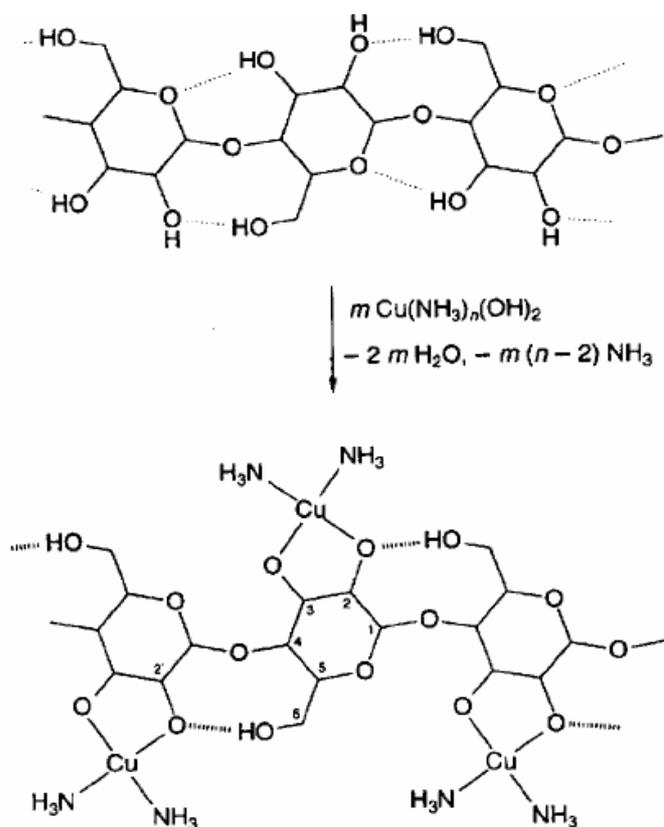


Figura 6. Parte do sistema de ligações de hidrogênio na celulose nativa e sua mudança após a coordenação com íons cobre (II) presentes no cuoxam [20].

A hidroxila na posição C3 participa de forma ativa das ligações de hidrogênio intercadeias como pode ser observado na figura 3b. O fato do cobre se ligar a esta hidroxila afasta as cadeias celulósicas e promove a dissolução do polímero.

Embora este solvente seja extremamente eficiente neste trabalho se optou pelo solvente comercial Cuen (hidróxido de bis(etilenodiamino)cobre (II)) utilizado de forma eficiente na dissolução da celulose para medidas de viscosidade de polpas. O processo de dissolução também envolve a desprotonação das hidroxilas nas posições C2 e C3 entretanto, não ocorre ligação coordenada com o cobre e a solvatação ocorre provavelmente devido a interações coulombicas entre as cargas negativas dos anéis glicosídicos e a separação entre cadeias promovida pela interação com os íons positivos cobre (II) [20]. Este fato pode diminuir a retenção de cobre na membrana uma vez que estes íons não são ligados por coordenação e possivelmente podem ser removidos com maior facilidade. Este aspecto é importante na produção de membranas para aplicação na área médica, objetivo deste trabalho.

II.4. Diálise e hemodiálise

Diálise é um processo de separação que emprega uma membrana semipermeável para separar espécies por difusão devido as suas diferenças de mobilidade através da membrana. A força motriz do processo é a diferença de concentração entre as soluções colocadas em ambos os lados da membrana. Estas membranas geralmente apresentam poros pequenos de forma que apenas solutos de baixa massa molar e íons passarão através da membrana retendo do outro lado macromoléculas. A figura 7 apresenta de forma resumida o processo de diálise: em um dos lados da membrana é colocada a solução que se deseja purificar ou remover solutos de baixa massa molar, do outro lado é adicionado um solvente ou uma solução de diálise. O transporte de solutos através da membrana ocorre por difusão devido a uma diferença de concentração do soluto entre as duas interfaces da membrana, sendo a difusão controlada pela mobilidade do soluto e o tamanho dos poros do lado do soluto e do solvente. O desempenho do processo é diminuído se o solvente ou solução de diálise atravessar a membrana em sentido oposto diluindo assim a solução que está sendo purificada.

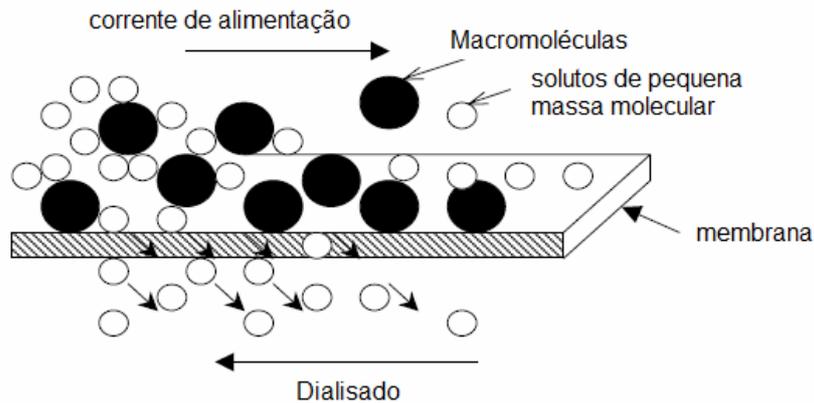


Figura 7. Representação esquemática do processo de diálise.

A diálise é uma técnica empregada na indústria no processo de recuperação de substâncias de importância comercial. No entanto, pode-se dizer com certeza que a mais importante aplicação da diálise é o tratamento de paciente com falha renal. Neste tratamento emprega-se uma membrana de separação como filtro para remover toxinas, íons e água que se acumulam nestes pacientes.

Esta técnica é chamada hemodiálise e é empregada para separar solutos de baixa massa molar como a uréia e a creatina do sangue de pacientes com uremia crônica.

A figura 8 apresenta um esquema da técnica de hemodiálise, onde o sangue do paciente conectado a máquina de diálise por uma artéria e uma veia do braço passa através de um filtro onde estão colocadas as membranas de separação. Durante a passagem do sangue, solutos de baixa massa molar passam através da membrana em direção a solução de diálise que é adicionada em fluxo contrário ao sangue levando consigo as toxinas removidas durante o tratamento.

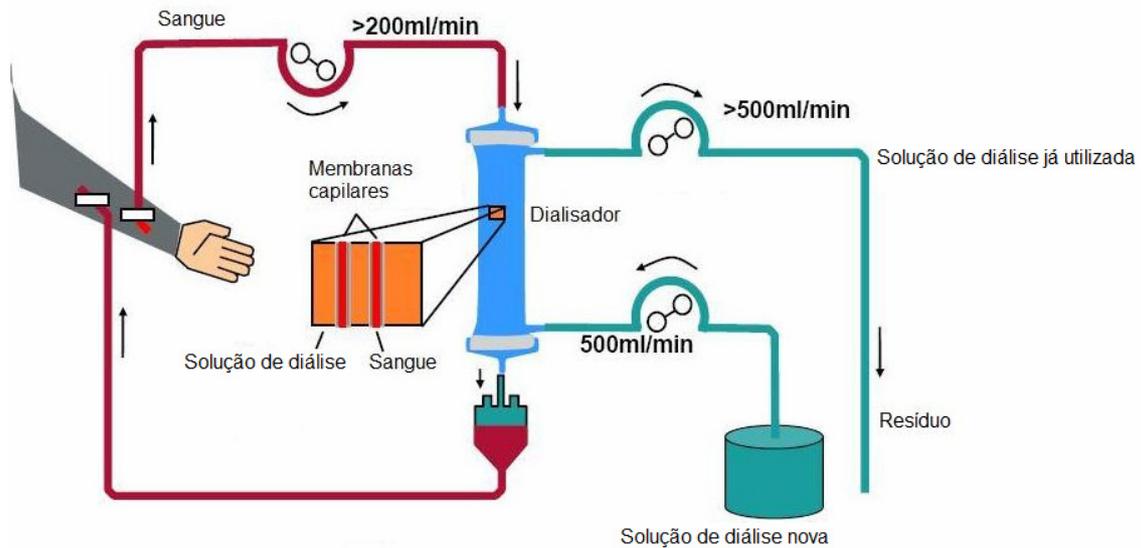


Figura 8. Representação esquemática do processo de hemodiálise.

Existe uma série de membranas de hemodiálise manufaturadas a partir da celulose ou de polímeros sintéticos. Mesmo com o avanço em relação a preparação destes materiais, ainda clinicamente as membranas de celulose regenerada são as empregadas com maior frequência. Os fatores que influem nesta decisão são o custo relativamente baixo destas membranas de celulose regenerada em relação às membranas sintéticas como as produzidas a partir do copolímero de poliácridonitrila, hemophan e as polissulfonas, a elevada permeação de água e a extensiva experiência no tratamento de pacientes usando estas membranas [6]. A desvantagem em relação a estas membranas é a baixa biocompatibilidade observada.

Mesmo com este fator, membranas de celulose regenerada vêm ainda hoje sendo muito empregadas na terapia de hemodiálise devido ao seu bom coeficiente custo/desempenho. O Cuprofané manufaturado pela AKZO Nobel (Wuppertal, Germany) é uma membrana de celulose regenerada produzida a partir da dissolução da celulose em hidróxido de tetraamim cobre II e re-precipitação/regeneração da celulose em uma solução ácida diluída. O processamento permite a produção de um material com boa resistência mecânica e elevada permeabilidade com água, qualidades essenciais ao processo de hemodiálise. Entretanto, a presença de íons cobre (II) na estrutura precisa ser bem controlada, pois a acumulação deste pode levar a desequilíbrios sérios no organismo.

Para evitar efeitos adversos recomenda-se que o teor de cobre presente na solução de diálise seja inferior a 1,6 μ M. As membranas comerciais de Cuprofone tem um teor de cobre de aproximadamente 2 mg/m² [6], sendo a área empregada em geral de 1m². Estes valores indicam que as membranas comerciais dever ter uma porcentagem de cobre inferior a 0,015%.

II.5. Ensaio de citotoxicidade

Por aproximadamente dez anos o Comitê Técnico 194 da International Organization for Standardization (ISO) e vários outros grupos desenvolveram um documento conhecido como ISO 10993, o qual é composto por uma série de normas e padrões que organizam a avaliação biológica de dispositivos médicos, esta é dividida em até 16 partes, observando-se sua interação, desde a fabricação, esterilização, caracterização e sua resposta biológica local sistêmica [21].

Uma das primeiras considerações sobre a avaliação dos dispositivos médicos é a caracterização dos mesmos, quanto às propriedades físico-químicas, toxicológicas, elétricas, morfológicas e mecânicas. Dessa forma a caracterização dos biomateriais é claramente identificada como o primeiro passo da sua avaliação. Neste processo são avaliados o tipo de material, presença de resíduos, aditivos e contaminantes, substâncias nocivas, produtos de degradação e característica final do produto.

Várias técnicas são utilizadas na caracterização dos materiais, os quais podem ser avaliados diretamente sobre as amostras ou através de extratos preparados sob condições especiais. A análise por espectroscopia no infravermelho, análise térmica diferencial, calorimetria exploratória diferencial e microscopia eletrônica de varredura são alguns testes usados para a caracterização dos materiais.

Após a realização o teste de citotoxicidade *in vitro* (ISO10993-5) deve ser realizado para a observação dos efeitos biológicos adversos agudos provenientes dos materiais. Normalmente para este teste são usadas células cultivadas sob condições padrões e submetidas à ação do material. Os testes podem ser realizados com extrato dos materiais, que são colocados na cultura de células. Uma alternativa para este método é o cultivo em um meio nutritivo semi-sólido, como ágar, onde o material é colocado em íntimo contato com as células.

O teste de citotoxicidade é um método rápido, padronizado, sensível e com baixo custo para determinar a existência de extratos biologicamente nocivos.

Com o controle cada vez mais rigoroso em relação ao uso de animais de laboratório, há necessidade de desenvolver e padronizar testes *in vitro* que possam detectar a toxicidade de dispositivos para uso em seres humanos, principalmente àqueles de aplicação clínica, como os biomateriais. Vários métodos *in vitro* para avaliar a toxicidade de biomateriais foram padronizados utilizando-se culturas celulares. Esses testes de citotoxicidade consistem em colocar o material direta ou indiretamente em contato com uma cultura de células de mamíferos, verificando-se as alterações celulares por diferentes mecanismos, entre os quais a incorporação de corantes ou a inibição da formação de colônias celulares.

O parâmetro mais utilizado para avaliar a toxicidade é a viabilidade celular, que pode ser evidenciada com o auxílio de corantes vitais como o vermelho neutro, solúvel em água e que passa através da membrana celular, concentrando-se nos lisossomos, fixando-se por ligações eletrostáticas hidrofóbicas em sítios aniônicos na matriz lisossomal. Muitas substâncias danificam as membranas, resultando no decréscimo de captura e ligação do vermelho neutro. Portanto é possível distinguir entre células vivas e danificadas ou mortas, pela medida de intensidade de cor da cultura celular.

O teste de efeitos locais após implantação (ISO 10993-6) é realizado com a implantação do material no organismo do animal de laboratório e avaliam-se, posteriormente, os efeitos no tecido vivo adjacente. Observa-se o efeito celular local que ocorre em resposta à presença do material que pode ser quase inerte, com pouquíssima mobilização celular, até uma resposta celular aguda severa com necrose prolongada por semanas. A norma ISO 10993-6 menciona o uso de ratos, camundongos, porquinhos da índia e coelhos devidos ao tamanho reduzido e ao fácil manuseio. Normalmente utiliza-se o leito subcutâneo como sitio cirúrgico, mas também podem ser utilizados tecidos específicos como osso, músculo, tecido nervoso, etc.

Após intervalo de tempo variável de dias a meses, o material e o tecido adjacente é biopsiado e uma avaliação histológica é realizada para a observação da resposta tecidual frente ao material com presença de macrófagos, linfócitos, neutrófilos, lasmócitos, cápsulas fibrosa, vasos sanguíneos e lise celular, entre outros.

Considerando os aspectos discutidos, neste trabalho membranas de celulose regenerada foram produzidas a partir da celulose extraída do bagaço de cana-de-açúcar usando uma modificação da metodologia empregada em trabalhos anteriores, onde o banho básico foi removido e o tempo em banho ácido aumentado. Neste trabalho foi usada uma solução comercial de hidróxido de bis(etilenodiamino)cobre(II), Cu(en)_2 , e a dissolução realizada em atmosfera inerte de N_2 . Para efeito de comparação em relação ao processamento, membranas de celulose regenerada foram produzidas usando a polpa celulósica da Rodhia (originada da madeira Pinus) como padrão. As membranas foram caracterizadas por espectroscopia na região do infravermelho, análise termogravimétrica, espectroscopia de absorção atômica, microscopia eletrônica de varredura e ensaios de citotoxicidade.

III. Parte Experimental

III.1. Obtenção da celulose a partir do bagaço de cana-de-açúcar.

O bagaço de cana-de-açúcar proveniente da usina Caeté localizada no município de Delta MG, foi inicialmente lavado e tratado com uma solução de hidróxido de sódio $0,25 \text{ mol.L}^{-1}$, por 18hs, à temperatura ambiente. O material lavado e filtrado foi seco à temperatura ambiente e tratado em refluxo com uma solução 20% (v/v) de ácido nítrico /etanol, por 3 horas, com mudança da mistura a cada intervalo de 1 hora. Depois disso, o material resultante foi lavado com água destilada, e seco por mais 3h [21, 22].

III.2. Caracterização do bagaço de cana-de-açúcar e da celulose purificada.

III.2.1- Lignina Klason [13]

1,0000 g de bagaço, sem extrativos, foram transferidos para um balão onde foram adicionados 30,00 mL de ácido sulfúrico (72%), lentamente e sob agitação. A amostra foi então mantida durante 2 horas em um banho à temperatura ambiente (25 °C) sob agitação. Ao conteúdo do balão foram então adicionados 560,00 mL de água destilada. O sistema foi colocado sob refluxo a uma temperatura de 100 °C, para que não ocorresse perda de água por evaporação, e conseqüentemente, alteração na concentração da solução de ácido. Após 4 horas, o sistema foi deixado em repouso para a sedimentação do material insolúvel. Este material foi filtrado em funil de placa porosa, previamente tarado, e lavado com 500,00 mL de água destilada quente. Em seguida, foi seco em estufa a 105 °C, por 12 horas, e pesado para quantificação do resíduo insolúvel e determinação da lignina Klason.

III.2.2- Obtenção da holocelulose [13]

5,0000 g de bagaço, livre de extrativos, foram colocados em um balão e adicionou-se 100,00 mL de água destilada. O balão foi colocado em banho-maria, a 75 °C e adicionou-se 0,50 mL de ácido acético e 0,7500 g de clorito de sódio, nesta ordem, tampando o balão para não ocorrer a perda do gás produzido na reação. Após 1 hora, adicionou-se novamente 0,50 mL de ácido acético e 0,7500 g de clorito de sódio.

Esse processo foi repetido por mais duas vezes. A mistura foi então resfriada a 10 °C, filtrada em funil de placa porosa, previamente tarado, e lavada com água

destilada a 5 °C até que o resíduo fibroso apresentasse coloração esbranquiçada. O funil com o resíduo fibroso foi então seco em estufa a 105 °C por 6 horas, resfriado em dessecador e pesado para se quantificar o rendimento da holocelulose.

III.2.3- Obtenção da celulose [13]

Transferiu-se 3,0000 g de holocelulose para um erlenmeyer de 250 mL, adicionou-se 100 mL de solução de KOH (5%) e fez-se uma atmosfera inerte pela passagem de gás nitrogênio, durante os cinco minutos iniciais da extração para evitar a oxidação da celulose. O erlenmeyer foi vedado, e mantido em agitação constante por 2 horas. A mistura foi então filtrada em funil de placa porosa, lavada com 50 mL de solução de KOH (5%) e em seguida com 100 mL de água destilada. O filtrado foi então recolhido em um erlenmeyer de 1L e precipitado com uma solução de partes iguais de ácido acético e etanol (completando-se o volume do erlenmeyer), obtendo-se assim a hemicelulose A.

Para a obtenção da hemicelulose B, o resíduo fibroso retido no funil foi transferido novamente para o Erlenmeyer de 250 mL. O mesmo procedimento para a obtenção da hemicelulose A foi repetido utilizando solução de KOH (24 %). Para lavagem do resíduo fibroso retido no funil, utilizou-se 25 mL de solução de KOH (24%), 50 mL de água destilada, 25 mL de ácido acético (10%) e 100 mL de água destilada, respectivamente. O filtrado recolhido em erlenmeyer de 1L foi precipitado com uma solução de partes iguais de ácido acético e etanol (completando-se o volume do erlenmeyer), obtendo-se assim a hemicelulose B.

Após a extração dos componentes solúveis em soluções aquosas de hidróxido de potássio, o resíduo fibroso foi lavado com água destilada até que o filtrado apresentasse pH neutro. O resíduo foi então lavado com 50 mL de acetona, seco a 105 °C e pesado. Esse resíduo é denominado celulose purificada.

III.3. Preparação das membranas de celulose regenerada

Preparou-se uma mistura utilizando-se 1,500g de celulose purificada extraída do bagaço de cana-de-açúcar e 30mL de água destilada. Homogeneizou-se a mistura por 5 minutos, utilizando-se um agitador magnético. Em seguida, filtrou-se em funil de placa porosa e o sólido obtido foi colocado em um erlenmeyer de 150mL e adicionou-se 21mL de Hidróxido de bis(etilenediamino)cobre (II) (nome comercial Cuproetilenodiamina) e 7,1 mL de água destilada, tampou-se o erlenmeyer com filme plástico e a solução foi agitada mecanicamente por 10 minutos. Após a agitação, o produto viscoso de coloração azul obtido foi purgado com gás nitrogênio por 20 minutos. A solução foi vedada com filme plástico e submetida á agitação magnética por 2 horas, seguida de repouso por 24 horas. Após este período, a solução foi colocada sobre placas de vidro de 20cm X 20cm e distribuída com um extensor modelo TKB Erkchsen, ajustado com uma abertura de 330 μ m. As placas com as membranas foram mantidas á temperatura de 26°C por 24 horas. A placa com a membrana foi colocada em um banho com uma solução de ácido clorídrico 2,0 mol.L⁻¹ até a perda da coloração azul da mesma, mantido por 10 minutos; as membranas foram lavadas 6 vezes com água destilada em uma bandeja; após este processo as membranas foram secas ao ar por 24 horas. O mesmo procedimento foi realizado para as membranas da Rhodia.

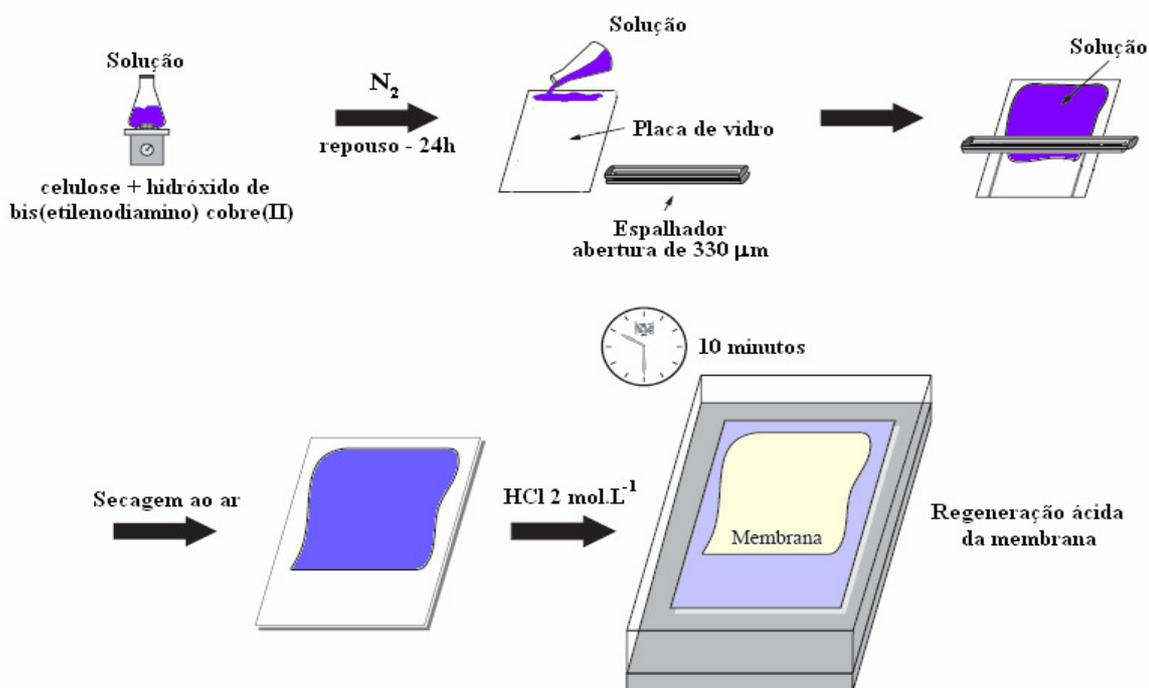


Figura 9: Esquematização da produção de membrana de celulose regenerada.

III.4. Caracterização dos materiais

III.4.1 Espectroscopia na região do infravermelho (FTIR).

As modificações estruturais e químicas nas amostras originais, bagaço de cana-de-açúcar, celulose do bagaço de cana-de-açúcar purificada e celulose da Rhodia foram avaliadas através da análise dos espectros na região do infravermelho usando um equipamento de FTIR (Infravermelho com transformada de Fourier) Shimadzu IR Prestige-21 FTIR Spectrophotometer. Pastilhas com KBr foram produzidas com as amostras em uma proporção de 1:100 amostra:KBr (m/m). As membranas foram analisadas com o auxílio de um suporte apropriado. Todos os ensaios foram feitos com uma resolução de 4 cm^{-1} e 28 varreduras.

III.4.2. Análise termogravimétrica

A análise termogravimétrica das membranas de celulose regenerada foi realizada em um equipamento termogravimétrico Shimadzu modelo DTG-60H. O experimento foi realizado da temperatura ambiente, 25°C a 600°C em atmosfera inerte de N_2 com uma taxa de aquecimento de $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$.

III.4.3. Espectroscopia de Absorção atômica

Utilizou-se cerca de 0,2500g de membrana devidamente seccionada em pequenas áreas e colocadas num béquer de 100 mL com posterior adição de 20 mL de Ácido Clorídrico P.A., adicionados de 5 em 5mL e aquecido em uma chapa elétrica por 20 minutos após o resfriamento a solução foi filtrada em placa sinterizada e o filtrado submetido á um balão volumétrico de 100mL que foi completado com água destilada até seu valor volumétrico efetivo. Todo este material do balão volumétrico foi enviado para análise de cobre em absorção atômica e analisado para posteriores comparações com níveis de cobre da membrana comercial Cuprofane. Foi utilizado para análise de cobre um espectrofotômetro de absorção atômica modelo AA905 e utilizou-se os seguintes parâmetros : comprimento de onda de 324,7 nm, largura da fenda de 0,5 nm, corrente da lâmpada de 3,0 mA, sensibilidade de $0,025\text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ e faixa de trabalho de $1\text{-}5\text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$. Utilizando Ar/ Acetileno como combustível. Realizado no laboratório multiuso do Instituto de Química UFU.

III.4.4. Microscopia eletrônica de Varredura

As microscopias das membranas após a metalização usando um equipamento Bal-Tec modelo SCD, foram realizadas em um Microscópio eletrônico de varredura Marca Zeiss Modelo: EVO 50 sistema de vácuo da ordem de 10^{-5} torr. Realizado na USP Ribeirão Preto SP.

III.4.5. Determinação da viscosidade intrínseca - Determinação da viscosidade em soluções de hidróxido de bis(etilenodiamino)cobre (II) (CUEN) com viscosímetro capilar.

1. Preparação da solução de celulose em hidróxido de bis(etilenodiamino)cobre (II).

Pesou-se $0,2500 \pm 0,0005$ g de celulose triturada e secou-se em estufa (105 ± 2) °C. Transferiu-se para um erlenmeyer a celulose pesada anteriormente e adicionou-se 25,0 mL de água destilada. Tampou-se o frasco e agitou-se continuamente até a pasta estar completamente dispersa. Deixou-se descansar por 2 minutos. Transferiu-se 25,0 mL da solução de cuproetilenodiamina e purgou-se com N_2 por 2 minutos. Fechou-se o frasco e agitou-se por um período de 30 minutos, ou até que se observou-se completa dissolução.

2. Determinação do tempo de fluxo.

O equipamento usado é um viscosímetro capilar de Ostwald (número 150) que foi colocado em um banho termostatzado a $(25,0 \pm 0,1)$ °C. Inicialmente o viscosímetro foi preenchido com a solução usada para dissolver a celulose (preparou-se anteriormente 25,0 mL de solução 0,5 M de cuproetilenodiamina pela adição de 12,5 mL de cuproetilenodiamina comercial e 12,5 mL de água). Transferiu-se um volume fixo de solvente para o viscosímetro (10,0 a 15,0 mL). Manteve-se o solvente pelo menos 5 minutos para entrar em equilíbrio térmico. Drenou-se o solvente no viscosímetro usando um pipetador de 3 vias ou outro aparato para levar o solvente acima da marca superior de medição. Deixou-se o solvente escoar livremente e acionou-se o cronômetro assim que este passe pela primeira marca e finalizou-se a medida quando este alcançou a última marca. Repetiu-se as medidas pelo menos 5 vezes. (os resultados entre duas determinações devem concordar em $\pm 0,2$ s).

Repetiu-se o mesmo procedimento com a solução de celulose em cuproetilenodiamina. A viscosidade intrínseca foi calculada a partir da equação 1.

$$\eta_{int} = \sqrt{(2 \cdot (\eta_{sp} - \ln \eta_{rel}))} / 0,005 \quad (1)$$

Onde η_{int} é a viscosidade intrínseca, η_{sp} a viscosidade específica e η_{rel} a viscosidade relativa obtida através das relações abaixo:

$\eta_{rel} = \text{Tempo de escoamento da solução, } t_{\text{solução}} / \text{Tempo de escoamento do solvente, } t_s$

$$\eta_{sp} = \eta_{rel} - 1$$

O grau de polimerização e a massa molar viscosimétrica média foram obtidos a partir das relações abaixo:

$$DP^{0,905} = 0,75 \cdot n_{int} \quad (2)$$

$$M_v = 162 \cdot DP \quad (3)$$

III.5. Ensaios de citotoxicidade [23].

Os ensaios de citotoxicidade foram conduzidos com a exposição de 929 células do clone NCTC ao extrato obtido de uma amostra da membrana mantido em contato por 24 horas em um meio de cultura MEM (mininum Eagle's medium, Sigma Co, São Paulo, Brazil) na temperatura de 37°C. O efeito citotóxico foi avaliado usando o método de ganho de vermelho neutro. As células foram mantidas em MEM contendo 10% de soro bovino fetal (soro amplamente empregado na cultura de células eucariontes) e 1% de aminoácidos não essenciais (MEM – FFCS) em uma incubadora umidificada na presença de 5% de CO₂ a 37°C. As células, na concentração de 2,5 x 10⁵ células/mL, foram semeadas em uma microplaca com 96 poços e foram incubadas em uma estufa umidificada na presença de CO₂ por 24 horas a 37°C. Após esse período, o meio foi descartado e substituído por 0,2 mL do extrato diluído (50, 25, 12,5, 6,25%). Controle da cultura celular foi substituído com MEM-FCS. No mesmo ensaio as amostras do controle positivo (0,02% Fenol solução) e o controle negativo (estanho não tóxico estabilizado com cloreto de polivinila), foram executados. As amostras e os

controles foram testadas em triplicata. A placa foi incubada novamente por 24 h nas mesmas condições. Após o período de incubação, o meio e os extratos foram descartados e substituídos por 0,2 mL de solução de vermelho neutro (50µg/mL) diluído 1:100 em MEM-FCS. Após a incubação a 37 ° C por 3h, o corante foi descartado e as microplacas foram lavadas por duas vezes com solução salina tamponada de fosfato. As células foram lavadas com uma solução 1% de Cloreto de cálcio e 0,5% de formaldeído. A ruptura das células e a liberação do vermelho neutro foi obtida por adição de 0,2 mL/poço de solução de extração contendo 50% de etanol em 1% acético ácido. Absorbância foi lida em um espectrofotômetro para microplacas Organon no comprimento de onda de 540 nm. A densidade óptica média foi calculada após a subtração do branco. Realizado pelo Instituto de Pesquisas Energéticas e Tecnológicas (IPEN) São Paulo SP, em colaboração com o grupo de reciclagem de polímeros IQUFU.

IV. Resultados e Discussão

IV. 1. Caracterização da celulose de partida.

O bagaço de cana-de-açúcar e a celulose purificada usada como matéria prima para a produção das membranas de celulose regenerada foram caracterizados em relação ao conteúdo de celulose, lignina e hemicelulose, os resultados estão resumidos na tabela 3.

Tabela 3. Caracterização do bagaço de cana-de-açúcar bruto e da celulose após a extração.

Componentes	Bagaço de cana-de-açúcar bruto	Celulose do bagaço de cana-de-açúcar purificada
Hemicelulose A	31,98%	13,07%
Hemicelulose B	9,38%	9,03%
Celulose	44,98%	74,19%
Lignina	24,72%	3,82%

Os dados apresentados na tabela 3 mostram que o bagaço de cana-de-açúcar utilizado como fonte de celulose neste trabalho apresenta um teor de celulose de cerca de 45%, um valor próximo ao esperado para fontes celulósicas tradicionais como a madeira. Este resultado, semelhante ao que é descrito na literatura [9] aponta o bagaço de cana-de-açúcar como uma fonte valiosa de celulose e outros componentes de elevado valor comercial.

A purificação da celulose do bagaço de cana-de-açúcar pelo método ácido nítrico / etanol utilizado neste trabalho permite a produção de uma polpa celulósica com um teor de α -celulose de 74,19% e um teor de lignina de 3,82%. A redução do teor de lignina é um requisito fundamental para a aplicação da celulose extraída do bagaço de cana-de-açúcar na produção de dispositivos empregados na área médica uma vez que seus resíduos podem interagir fortemente com íons cobre (II) provenientes do processo de dissolução da celulose. Substratos lignocelulósicos exibem 2 tipos de sítios para ligação: grupos carboxílicos e grupos fenólicos que possuem elevada afinidade com íons cobre (II) [24].

A celulose da Rhodia foi utilizada como padrão visando avaliar a retenção de cobre quanto composição da amostra e em relação a massa molar média do polímero relacionada a qualidade da membrana formada. Na tabela 4, são apresentados os dados de composição da pasta celulósica comercial fornecida pela Rhodia. Os valores apresentados mostram uma elevada porcentagem de α -celulose e um teor de lignina de 4,1 %. Este valor é semelhante ao obtido na polpação do bagaço de cana-de-açúcar, mostrando que o processo de purificação empregado removeu a lignina de forma tão eficiente quanto os processos tradicionais de polpação, evitando assim a adsorção significativa de cobre na membrana devido a interação com fragmentos de lignina adsorvidos junto a celulose.

O teor de hemicelulose é elevado na celulose do bagaço de cana-de-açúcar comparativamente a polpa da Rhodia. Este fator poderia ser atribuído a diferenças relativas a absorção de íons cobre nas duas membranas uma vez que as unidades de açúcares das hemiceluloses também podem adsorver íons cobre (II). Entretanto como será observada adiante, esta diferença não influi no teor de íons cobre adsorvidos nas membranas.

Tabela 4. Composição dos 3 principais componentes da pasta celulósica da Rhodia usada como padrão.

Componentes da pasta da Rhodia	Composição (%)
Celulose	93,0
Polioses	2,9
Lignina	4,1

Além do teor de hemicelulose, outra diferença pode ser observada entre as duas fontes celulósicas avaliadas, os valores de massa molar viscosimétrica média, apresentados na tabela 5.

Tabela 5. Massa molar média obtida por viscosimetria capilar.

Amostra	Massa molar viscosimétrica média, g.mol ⁻¹
Celulose Bagaço de cana-de-açúcar	108.000
Celulose Rhodia	160.000

Embora ambas as amostras apresentem massa molar moderada é nítida a diferença entre os valores obtidos. A celulose obtida a partir da polpação da madeira de Pinus (Rhodia) apresenta uma massa molar mais elevada que a celulose do bagaço de cana-de-açúcar. Além das diferenças da estrutura das fibras entre estas duas fontes de celulose, um fator que pode influenciar de forma decisiva no tamanho das cadeias poliméricas e conseqüentemente na massa molar é o processo de isolamento da celulose. Embora este processo tenha como finalidade principal remover a lignina isto não é conseguido sem alterações na cadeia polimérica da celulose. Degradação pode ocorrer levando a hidrólise das ligações entre as unidades de celulose e diminuindo a massa molar do polímero. Este fator é acentuado nas reações de polpação em meio ácido e ocorre em menor grau em reações em meios alcalino. A celulose isolada a partir bagaço de cana-de-açúcar por emprego do método ácido nítrico / etanol sofre hidrólise durante o tratamento. Este fato está diretamente relacionado ao valor de massa molar da celulose do bagaço de cana-de-açúcar uma vez que dependendo do tipo de polpação, a massa molar da celulose pode chegar a $177000 \text{ g.mol}^{-1}$ (Grau de polimerização igual a 1097) [7]. Entretanto como pode ser observado na figura 10, o menor valor de massa molar da celulose do bagaço de cana-de-açúcar parece ser pouco significativa em relação a habilidade de produzir membranas.

Na figura 10 observam-se as etapas de processamento dos materiais estudados desde a polpação até a preparação das membranas. As membranas de celulose regenerada da celulose do bagaço de cana (MBAG) e da celulose da Rodhia (MROD) secas apresentam boa trabalhabilidade no que se refere a manipulação, são ligeiramente opacas quando comparadas ao material comercial.

<p>Bagaço de Cana-de-açúcar <i>in natura</i></p>	<p>Madeira pinus <i>in natura</i></p>
	
<p>Celulose extraída do bagaço de cana-de-açúcar</p>	<p>Celulose extraída da madeira pinus (Rhodia)</p>
	
<p>Membrana de celulose regenerada extraída do bagaço de cana-de-açúcar</p>	<p>Membrana de celulose regenerada extraída da celulose da madeira de Pinus (Rhodia)</p>
	

Figura 10. Imagens de várias etapas da produção de membranas(MBAG e MROD).

Na etapa de re-precipitação / regeneração, as membranas produzidas apresentam uma matriz inchada e altamente gelatinosa. Em presença de água a matriz absorve elevadas quantidades mantendo o aspecto gelatinoso. Este aspecto é semelhante ao observado em membranas de celulose regenerada comerciais. Devido ao elevado caráter hidrofílico estas membranas absorvem entre 75 a 100% de água [25].

As fibras celulósicas são preparadas, industrialmente, através da extrusão de uma solução por rolos dentro de um banho coagulante. O processo de preparação de celulose regenerada envolve a reorganização das macromoléculas, que podem ser regeneradas na forma de fios (rayons) ou membranas (Celofane® ou Cuprofane®). Nos fios, as macromoléculas estão orientadas, predominantemente ao longo do comprimento da fibra, já nas membranas as macromoléculas tendem a se arranjar mais desordenadamente [26]. Neste tipo de organização, as membranas apresentam menor grau de ordem e conseqüentemente menor índice de cristalinidade que as fibras, sendo por isto mais adequada a processos de separação que envolve o transporte de solutos de baixa massa molar. Um dos aspectos do emprego destas membranas na hemodiálise é justamente a elevada quantidade de água e a estrutura que esta forma na membrana que facilita a dissolução dos solutos para sua separação posterior [1]. A organização das membranas produzidas implica em uma mudança na estrutura da celulose quando esta é dissolvida uma vez que durante a formação do complexo entre os íons metálicos (Cu (II)) e os grupos hidroxilas da celulose ocorre a ruptura das ligações de hidrogênio entre as cadeias de celulose. No processo de regeneração da membrana, as ligações de hidrogênio são novamente formadas e a organização retomada é normalmente diferente daquela existente na celulose original, neste processo ocorre a conversão da celulose I para celulose II. O que implica em mudanças estruturais como diminuição no índice de cristalinidade e aumento no potencial para absorção de água [26]. Estes aspectos são importantes indicadores para a qualidade das membranas produzidas e serão avaliados através da espectroscopia na região do infravermelho, apresentada no tópico a seguir.

IV.2. Espectroscopia na região do infravermelho.

Como o bagaço de cana-de-açúcar é um material lignocelulósico composto em sua maior parte por celulose, lignina e hemiceluloses, um dos objetivos da análise dos espectros de infravermelho é avaliar o processo de remoção principalmente da lignina para o emprego de uma celulose mais pura na produção das membranas.

Considerando as propriedades visuais observadas no item anterior, esta técnica permite além de caracterizar o polímero em relação à presença de grupos funcionais característicos e identificar a presença de resíduos que podem apresentar alguma reação citotóxica em relação à membrana estudada, avaliarem as modificações estruturais ocorridas na preparação das membranas quanto à conversão de celulose I para celulose II. Estas informações são importantes, pois tem implicação direta na qualidade da membrana quanto ao conteúdo de água absorvido, transporte de solutos e conseqüentemente seu aproveitamento em processos de separação como a hemodiálise.

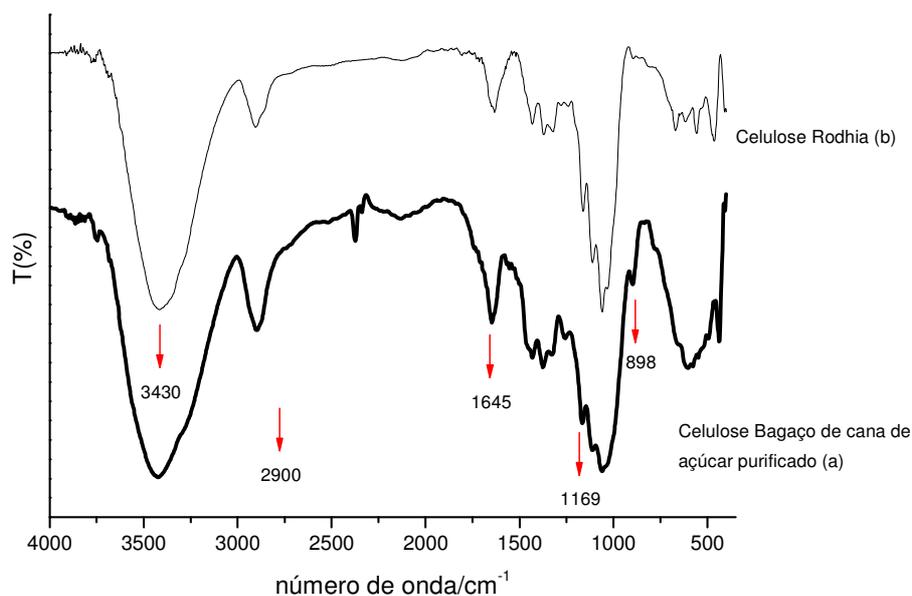


Figura 11: Espectros na região do infravermelho para: (a) celulose purificada do bagaço de cana-de-açúcar e (b) celulose da Rodhia usada como padrão.

O perfil dos espectros apresentados na figura 11 é típico de materiais celulósicos sendo que as principais bandas observadas são a banda em 3430 cm⁻¹ atribuída ao estiramento da ligação O – H, 2900 cm⁻¹ atribuída ao estiramento do grupo C – H, 1645

cm^{-1} atribuída a deformação angular das moléculas de água que estão absorvidas na estrutura da celulose, 1169 cm^{-1} atribuída ao estiramento assimétrico da ligação ($\text{C}_1 - \text{O} - \text{C}_5$) e 898 cm^{-1} atribuída ao estiramento da ligação glicosídica ($\text{C}_1 - \text{O} - \text{C}_4$) [27]. A tabela 6 apresenta de forma mais detalhada as atribuições das bandas para as amostras de celulose usadas na produção das membranas.

Tabela 6. Principais atribuições das bandas de absorção dos espectros na região do infravermelho para a celulose purificada do bagaço de cana-de-açúcar (A) e da celulose da Rodhia (B)

A	B	Atribuições
cm^{-1}		
3377	3350	Estiramento da ligação O - H
2898	2900	Estiramento da ligação C - H
1641	1643	Deformação angular da molécula de água
1428	1415	Deformação angular CH_2 /deformação O - H
1370	1368	Deformação C - H
1340	1331	Deformação da ligação O - H
1313	1313	“wagging” balanço grupo CH_2
1250	1260	Deformação da ligação O - H / estiramento simétrico C-O-C
1165	1160	Estiramento assimétrico ($\text{C}_5\text{-O-C}_1$)
1072	1065	Estiramento O - H/C - O
897	897	Estiramento ($\text{C}_1\text{-O-C}_4$) da ligação glicosídica

As principais bandas na região do infravermelho associadas à presença de lignina nos materiais estão atribuídas na tabela 7.

A ausência das bandas localizadas em 1510 cm^{-1} (ν C-C de anéis aromáticos) e 1250 cm^{-1} (ν C-O de anéis guaiacila), presentes em espectros do bagaço de cana-de-açúcar sem modificação, confirma os resultados de teor de lignina indicando que a esta foi em sua maior parte removida. É importante salientar que a porcentagem de lignina encontrada na celulose purificada pelo método empregado (HNO_3 /Etanol) é de 3,84% [13], o que está muito próximo das polpas celulósicas comerciais.

Tabela 7. Principais bandas de absorção de ligninas [28, 29].

Número de onda (cm^{-1})	Atribuição
~1700	Estiramento da ligação C = O de grupos carboxílicos alifáticos ou ésteres arílicos ou insaturados.
1610 – 1595	Estiramento das ligações C = C dos anéis aromáticos em ligninas
1510	Estiramento das ligações C = C dos anéis aromáticos em ligninas
1315	Deformação do anel siringila associada ao estiramento C-O
1250	Deformação do anel guaiacila associada ao estiramento C-O
~1200	Deformação angular O-H, com caráter de estiramento do anel aromático.

A figura 12 apresenta os espectros na região do infravermelho para as membranas de celulose regenerada produzidas a partir do bagaço de cana-de-açúcar (MBAG) e para as membranas produzidas com a celulose da Rodhia (MROD).

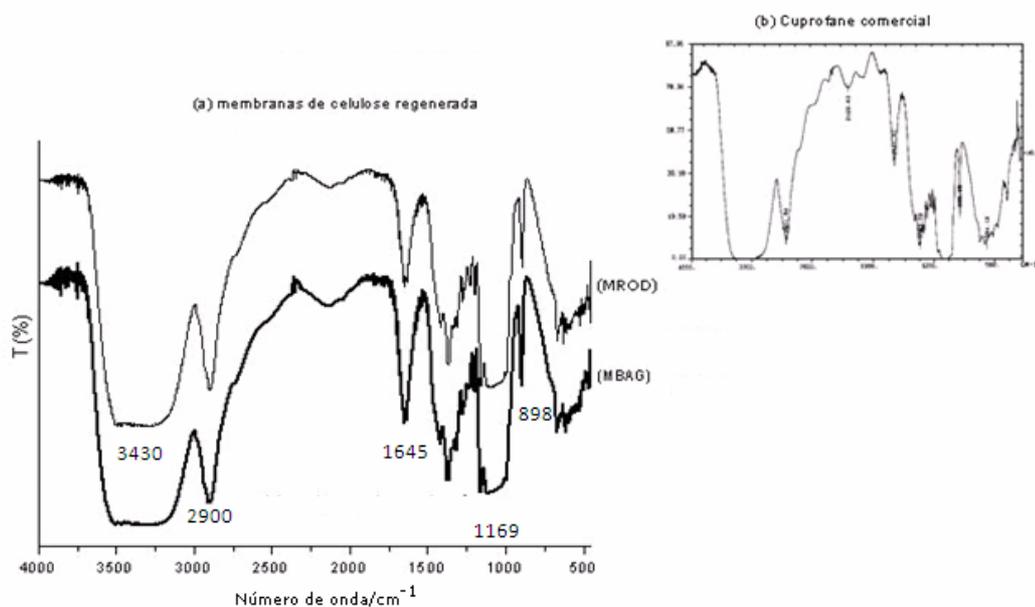


Figura 12: Espectros na região do infravermelho para as membranas de celulose regenerada (a) e para Cuprofan comercial (b) [25].

Os espectros apresentados na figura 12 são muito semelhantes à membrana comercial (Cuprofan) ressaltada na figura 12 (b) em detalhe. Este resultado mostra que o processo empregado na produção das membranas permite produzir um material quimicamente e estruturalmente semelhante ao Cuprofan comercial, o que pode ser confirmado por inspeção da região entre 1700 a 500 cm^{-1} , apresentada na figura 13.

A figura 13 apresenta em destaque a região entre 1700 a 500 cm^{-1} . Nesta região são observadas as principais alterações dos espectros das membranas de celulose regenerada em relação a celulose não modificada. As bandas entre 1500 e 1150 cm^{-1} são bem definidas e finas, indicando uma mudança de padrão em relação à celulose original que apresenta apenas algumas bandas nesta região com menor definição. Este aspecto é típico da organização obtida nos filmes devido à transição do padrão das ligações de hidrogênio reformadas durante a regeneração levando a celulose original (celulose I – padrão típico de celulose nativa) à celulose II (que é formada após o processo de interação com reagentes altamente alcalinos como o solvente usado no processo de dissolução da celulose).

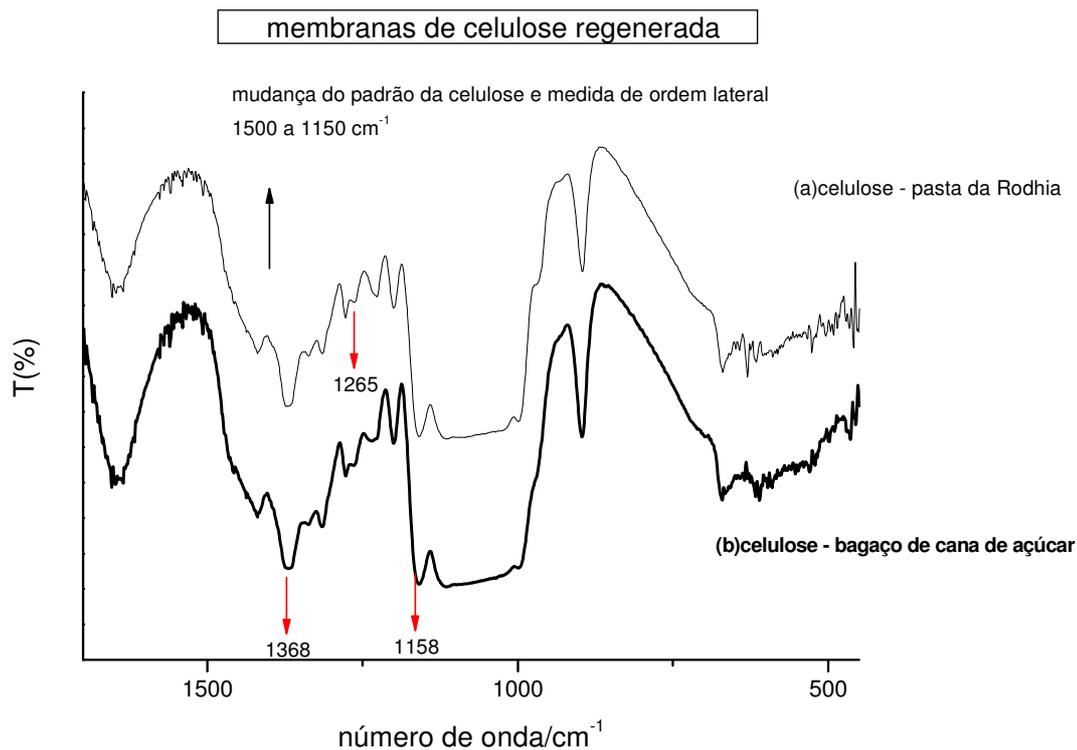


Figura 13. Espectros na região do infravermelho para as membranas de celulose regenerada – região de 1700 a 500 cm^{-1} .

Segundo Reddy et alli [29], em celuloses tratadas em meios fortemente alcalino ocorre o aparecimento de 2 picos de absorção próximos a 1265 e a 1225 cm^{-1} , que confirmam a modificação estrutural de celulose I para celulose II. A origem destas absorções não é muito clara, mas assume-se que estas são devido ao estiramento da ligação C-O-C e deformações no plano OH na estrutura da celulose II. Na celulose nativa esta região é pouco definida, onde apenas uma banda de pequena intensidade é observada em 1230 cm^{-1} [30], na celulose purificada esta região apresenta algumas bandas de baixa intensidade e mal resolvidas ou que indica um padrão típico de celulose I.

A proporção entre regiões amorfas e cristalinas na celulose é um importante parâmetro do ponto de vista das aplicações quanto a acessibilidade e reatividade de polpas, como propriedades mecânicas e capacidade de absorção de água e transporte de íons em membranas. Considerando este aspecto os espectros na região do infravermelho

foram empregados para obter relações quantitativas associadas ao grau de ordem dos materiais de partida e das membranas produzidas. Esta técnica é baseada no fato que o espectro de infravermelho de materiais apresenta uma série de informações relativas a regiões moleculares que são influenciadas pelo grau e tipo de ordem. Algumas bandas de absorção na celulose são modificadas com um aumento ou diminuição do grau de ordem da celulose podendo ser consideradas quantitativamente como um fator ou razão proporcional ao aumento da cristalinidade. Um exemplo clássico é a razão entre as intensidades das bandas em 1370 e 2900 cm^{-1} . Esta razão aumenta de forma linear com o aumento do grau de cristalinidade conforme pode ser observado na figura 14.

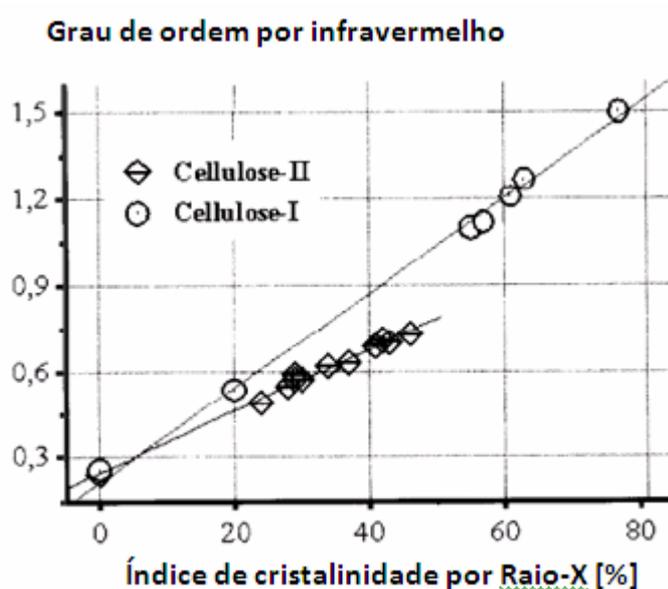


Figura 14. Razão entre a intensidade das bandas em 1370 e 2900 cm^{-1} e o grau de cristalinidade das amostras obtida pela técnica de difração de raios – X [31].

Na tabela 8 estão resumidos os resultados do cálculo das razões entre as intensidades das bandas em 1370 e 2900 cm^{-1} para a celulose sem modificação e para as membranas de celulose regenerada [31, 32]. Esta razão aumenta linearmente com o aumento da cristalinidade da amostra e reflete as mudanças observadas no processamento da celulose regenerada. Na figura 15, está apresentado como as intensidades foram medidas e o corte da linha de base no espectro de infravermelho.

Tabela 8. Grau de ordem obtido por espectroscopia na região do infravermelho

Amostra	$R_{A1370/A2900 \text{ cm}^{-1}}$
Celulose Rodhia	1,12
Celulose bagaço	1,22
MROD	0,83
MBAG	0,78

Os valores maiores encontrados para razão $R_{A1370/A2900 \text{ cm}^{-1}}$ estão de acordo com o esperado uma vez que as amostras de celulose originais, não modificadas apresentam maior cristalinidade frente as membranas de celulose regenerada. Este fato é esperado pois o processo de dissolução e re-precipitação/regeneração modifica a estrutura morfológica das fibras celulósicas considerando um novo rearranjo no filme, para que isto ocorra as fibras inicialmente sofrem um inchamento drástico que leva a ruptura parcial de algumas regiões cristalinas para uma posterior reorganização em uma estrutura polimórfica diferente, no entanto mais estável.

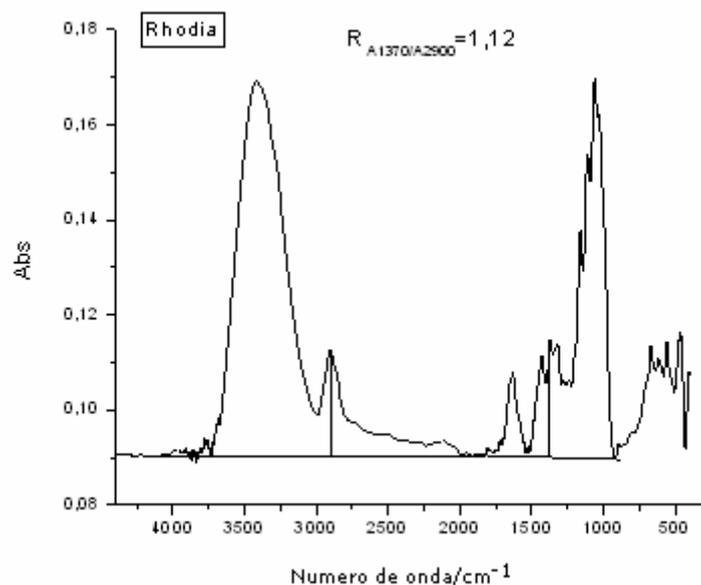


Figura 15. Modelo para o corte das linhas de base e da intensidade referente as bandas analisadas.

IV.3. Análise termogravimétrica.

A figura 16 apresenta a curva de perda de massa para as membranas de celulose regenerada em função da temperatura. Observam-se três estágios nítidos de perda de massa sendo o primeiro estágio atribuído a dessorção de água da estrutura do polissacarídeo. As membranas secas têm cerca de 10% de água adsorvida.

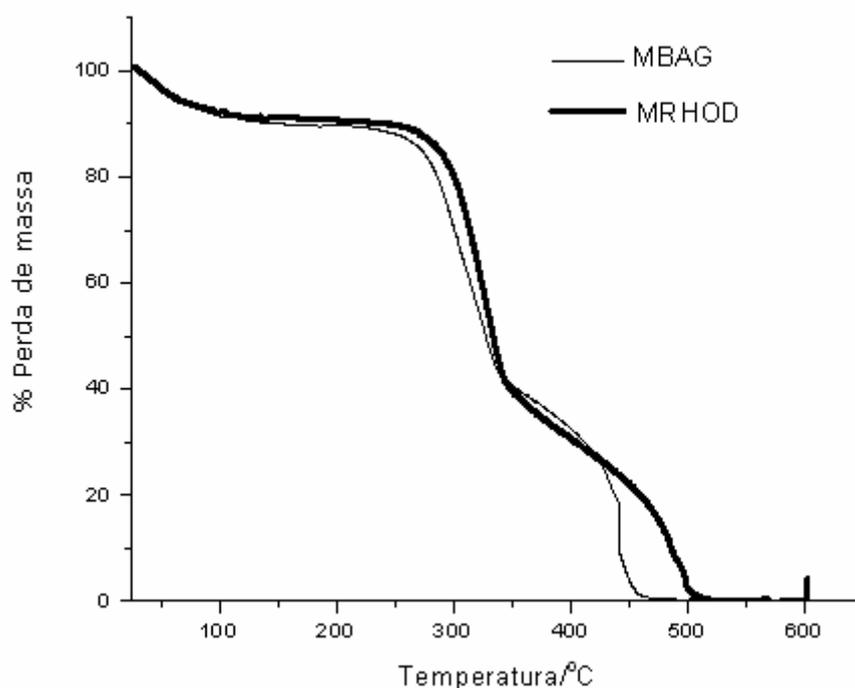


Figura 16. Curva termogravimétrica para as membranas de celulose regenerada

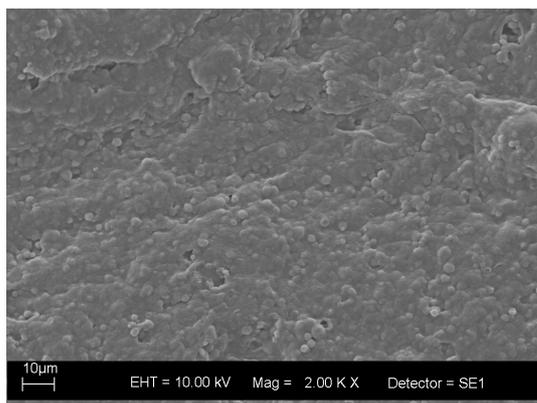
O segundo estágio é também aquele em que se observa a maior perda de massa dos materiais iniciando com o material desidratado seguido por despolimerização térmica. Finalmente o material sofre uma decomposição pirolítica completa. Ambas as membranas apresentam praticamente o mesmo perfil de perda de massa, entretanto existe uma pequena diferença de estabilidade térmica entre as duas sendo aquela produzida com a celulose da Rhodia mais estável. Este fato pode estar associado a maior massa molar deste material já observada nos resultados de viscosidade intrínseca. Embora se observe maior estabilidade da membrana MROD, o material produzido com a celulose do bagaço de cana-de-açúcar apresenta boa estabilidade térmica compatível ao fim que se propõe a hemodiálise. As diferenças entre as curvas também podem estar

relacionadas a diferença de composição particularmente em relação a hemicelulose. O processo de decomposição, o segundo estágio na membrana de celulose regenerada do bagaço é iniciado aproximadamente na temperatura de 216⁰C, temperaturas próximas a decomposição de hemiceluloses [33].

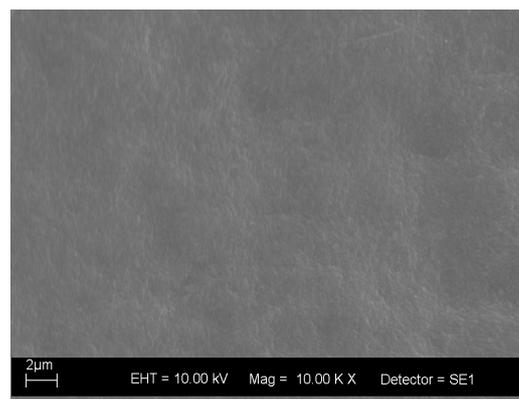
IV.4. Microscopia eletrônica de varredura.

Outra forma de avaliar a morfologia das membranas é o uso da microscopia eletrônica de varredura (MEV), que permite identificar o tipo de membrana produzida (densa ou assimétrica) e a existência de estruturas como poros estáticos [34].

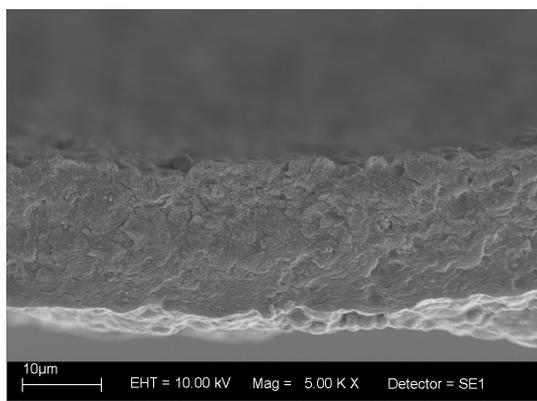
Na figura 17 estão apresentadas as micrografias das membranas MBAG e MRHOD superfície e corte transversal (espessura).



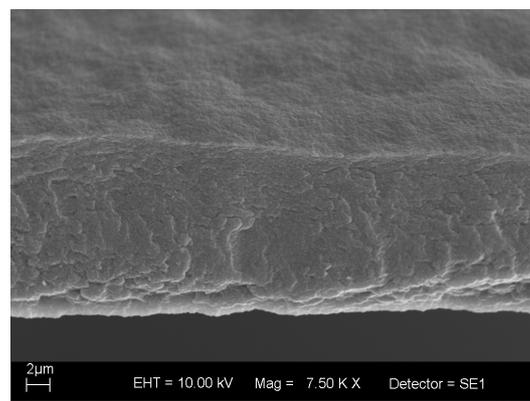
(a) MBAG (superfície)



(b) MRHOD (superfície)



(c) MBAG (CT)



(d) MRHOD (CT)

Figura 17. Microscopia eletrônica de varredura para as membranas de celulose regenerada.

Embora as membranas apresentem praticamente a mesma estrutura quanto à cristalinidade e ordenamento, observados através dos dados de espectroscopia na região do infravermelho, este fato não se repete quanto a morfologia que é observada mais diretamente através da microscopia eletrônica de varredura. A superfície da MBAG apresenta uma morfologia mais heterogênea com a formação de pequenos aglomerados, diferente da morfologia da MROD que é mais homogênea. Dois fatores podem estar relacionados as estruturas observadas:

- i) A diferença entre as massas molares médias das celuloses utilizadas como matéria prima, uma vez que a pasta de celulose da Rhodia apresenta uma massa molar viscosimétrica média maior que aquela da preparada a partir do bagaço de cana (tabela 5). Este fator está relacionado a qualidade do filme formado quanto a reorganização das cadeias poliméricas,
- ii) A existência de um elevado conteúdo de hemicelulose na polpa produzida a partir do bagaço de cana-de-açúcar. Estes fragmentos de baixa massa molar podem interferir no processo de formação da membrana devido a produção de uma solução de baixa qualidade, com a precipitação de pequenos aglomerados. Estes aglomerados interferem durante a formação da membrana com a produção de um material mais heterogêneo.

Embora existam estas diferenças superficiais, ambas as membranas apresentam uma estrutura densa que pode ser observada nos cortes transversais, com a ausência de poros estáticos característicos.

IV.5. Espectroscopia de absorção atômica.

Um dos aspectos mais importantes neste trabalho foi a tentativa de diminuir o teor de íons Cu(II) nas membranas de celulose regenerada, visando a realização dos ensaios de citotoxicidade e a previsão relativa a possível aplicação deste material em processos biológicos como a terapia de hemodiálise. Na tabela 9, são apresentados os teores de íons cobre (II) das membranas produzidas neste trabalho e aquelas avaliadas em trabalho anterior [5].

Tabela 9. Teor de íons Cu(II)

Amostras	Teor de Cobre (II) (%)
MCR – Bag ¹ [5]	0,4468
MCR – Bag ² [5]	0,3634
MCR – Bag	0,0248
MCR – pasta Rodhia	0,0236
Cuprofane comercial ³	0,0130
Cuprofane comercial ⁴	0,0050

¹ membrana produzida com hidróxido de tetramincobre (II)

² membrana produzida com hidróxido de bis(etilenodiamino)cobre (II)

³Material comercial – ref. [6]

⁴Material comercial – ref. [4, 5]

Os resultados apresentados na tabela 9 mostram que as membranas produzidas a partir da celulose extraída do bagaço de cana-de-açúcar apresentaram uma redução na porcentagem de íons Cu(II) de cerca de 15 vezes em relação as membranas produzidas em trabalho anterior. As alterações no procedimento foram responsáveis pela melhora do processo, principalmente relacionado a remoção da etapa em meio alcalino observada nos outros trabalhos e o aumento do tempo no banho ácido (10 minutos) que provavelmente remove a parte do cobre da estrutura com maior eficiência. Embora os valores obtidos ainda sejam cerca de 4 a 2 vezes superiores aos encontrados nas membranas comerciais (Cuprofane), a redução de Cu(II) observada para as membranas produzidas neste trabalho permitem a realização dos ensaios de citotoxicidade para avaliar a resposta de sistemas biológicos ao contato com as membranas.

IV.6. Ensaios de citotoxicidade.

Nos ensaios de citotoxicidade o material em estudo foi colocado diretamente em contato com uma cultura de células de mamíferos onde alterações celulares são observadas através de diversos mecanismos sendo que um deles consiste na incorporação de corantes vitais, como o realizado neste trabalho. O corante é solúvel em água e atravessa a membrana celular concentrando-se nos lisossomos. Danos causados a membrana celular devido a presença de substâncias tóxicas resultam na diminuição da adsorção do corante pela célula. Neste caso, células vivas podem ser distinguidas de

células mortas pela intensidade da cor do meio de cultura [23, 35]. O resultado do ensaio foi registrado em relação à porcentagem de viabilidade celular em função da concentração do extrato produzido a partir das membranas analisadas, como apresentado na figura 18.

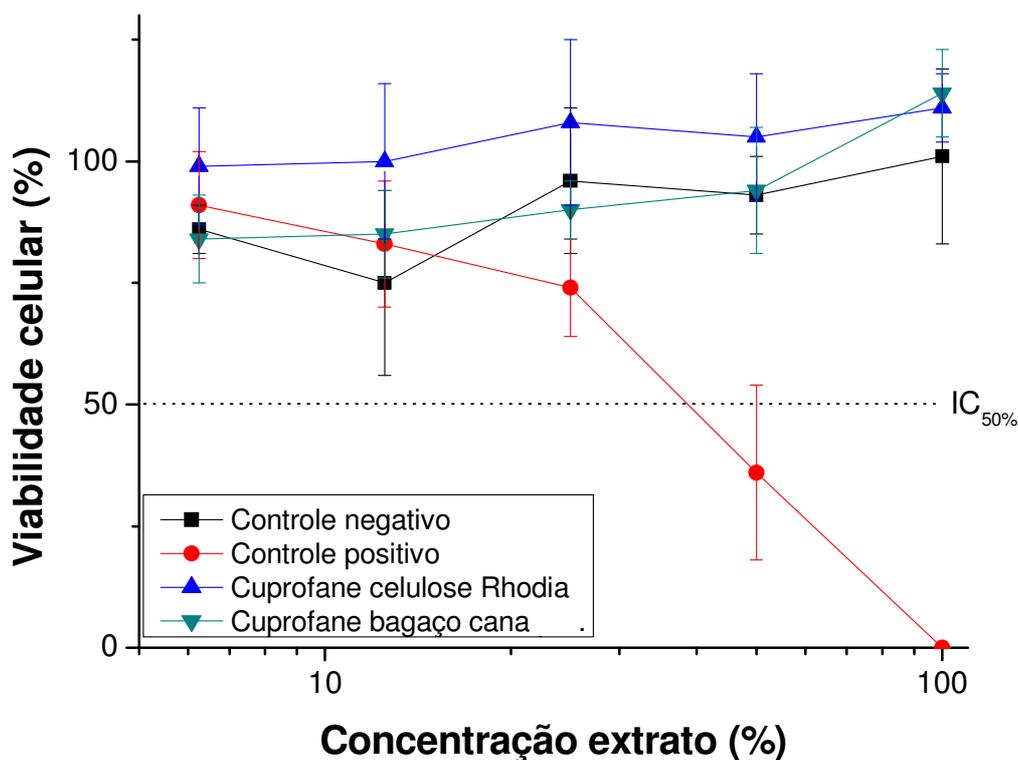


Figura 18. Resultado dos testes de citotoxicidade. Curvas de viabilidade celular usando a absorção do corante vermelho neutro.

Os resultados apresentados na figura 18 mostram que as culturas celulares expostas ao extrato das membranas não apresentam toxicidade, mesmo na presença de 100% do material. Tanto o material padrão (MROD) como a membrana produzida com o bagaço de cana-de-açúcar (MBAG) não apresentam reações adversas às culturas celulares, o que indica que as membranas produzidas a partir da celulose do bagaço de cana-de-açúcar através de uma adaptação do método Cupramônio, usando como solvente o hidróxido de bis(etilenodiamino)cobre (II) podem, segunda esta primeira análise biológica, ser usadas na confecção de materiais para área médica.

V. Conclusão

Os resultados apresentados neste trabalho mostraram a viabilidade de produzir membranas de celulose regenerada com potencial de aplicação na área médica a partir da celulose extraída do bagaço de cana-de-açúcar. Este material apresentou 74% de celulose, 22% de hemiceluloses e 4% de lignina em comparação com a celulose de madeira “pinus” Rhodia que apresentou 93% de celulose, 2,9% de hemiceluloses e 4% de lignina. A potencial para aplicação deste sistema na área médica foi observado a partir dos resultados de citotoxicidade onde extratos das membranas não apresentaram citotoxicidade mesmo em elevadas concentrações do extrato. A membrana de celulose regenerada do bagaço de cana-de-açúcar apresentou uma diminuição de cerca de 15,0 vezes na porcentagem de Cu(II) (Teor de incorporado na estrutura em comparação as membranas produzidas em trabalhos anteriores. Este fato foi atribuído a melhora do processamento com a retirada de um banho alcalino intermediário que visava melhorar a estrutura da membrana, mas que pode ser responsável por fixar o Cu(II) na estrutura mesmo depois do banho ácido. O tempo em banho ácido também foi alterado de 8 para 10 minutos o que garante a regeneração da celulose e a remoção mais eficiente dos íons Cu (II). Estas mudanças melhoraram de forma significativa a qualidade das membranas que apresentou boa estabilidade térmica, massa molar viscosimétrica de $108000 \text{ g.mol}^{-1}$ e grau de ordem de 1,22 para celulose I e 0,78 para a celulose II sem modificar o reordenamento com a produção de celulose regenerada, menos cristalina que a celulose original e, portanto com maior capacidade de absorção de água, uma qualidade essencial no transporte de solutos.

VI. Trabalhos futuros

ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE E ATIVIDADE INFLAMATÓRIA
(BIOCOMPATIBILIDADE) DAS MEMBRANAS DE CELULOSE REGENERADA
DO BAGAÇO DE CANA-DE- AÇÚCAR

1- ANIMAIS

Deverão ser utilizados camundongos Swiss fêmeas, adultos pesando 20-50g, obtidos do laboratório de experimentação animal da UFU. Os animais são mantidos em gaiolas adequadas com fornecimento *adi libitum* de água e ração.

2- OBTENÇÃO DOS MACRÓFAGOS

Estas células serão obtidas a partir do lavado intraperitoneal de camundongos eutanasiados por meio de deslocamento cervical. Injetar-se-á na cavidade peritoneal 3 a 5 mL de solução salina a 4°C, e massagear-se-á o peritônio para obtenção do exsudato celular. A predominância de macrófagos (maior que 90%) será confirmada por características morfológicas das células coradas com Giemsa.

3- ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE

A suspensão celular obtida da cavidade peritoneal dos camundongos, será permitida aderir nas membranas em análise por 30 – 60 minutos à 37°C. A viabilidade celular será estimada pelo teste de exclusão do azul de Tripán, a quantificação será realizada por microscopia óptica, através da contagem da % de células vivas e mortas (azuis) em uma população de 200 células.

4- ENSAIO DE ATIVIDADE INFLAMATÓRIA

Para esta finalidade será feito um macerado em salina da membrana de celulose regenerada do bagaço de cana-de-açúcar e após esterelização em autoclave, 1mL da suspensão será injetado no peritônio dos animais. Após 4 dias, obter-se-á o exsudato peritoneal e avaliar-se-á a população de leucócitos presentes.

VII. Referências Bibliográficas

1. Klein, E., Smith, J.K., Holland, F.F. Permeability Studies with Hemodialysis Membranes. in... Holpfenberg, H.B. (eds), Polymer Science and Technology V6- Permeability of Plastic Films and Coatings to gases, vapors and liquids. Plenum Press, New York, 1974.
2. <http://pt.wikipedia.org/wiki/Hemodialise> data de acesso 06/02/2009.
3. Mark, J. E. Polymer Handbook, Oxford University Press, 1999.
4. Rodrigues Filho, G., Assunção, R.M.N., Application of the Cuprammonium Process (process for the production of regenerated cellulose membranes for hemodialysis) to sugar-cane bagasse. *Journal of Membrane Science*, 82, 43, 1993.
5. Rodrigues Filho, G., Leal, D.A., Peres, D.S., Ruggiero, R., Alternatives for the reduction of Cu (II) ion levels in hemodialysis membranes produced from sugar cane bagasse. *Journal of membrane Science*, 111, 143, 1996.
6. Morgan, C.J.; Gelfand, M.; Atreya, C.; Miranker, A.D. Kidney dialysis – associated amyloidosis: A molecular role for copper in fiber formation. *J. Mol. Biol.* 309, 339, 2001.
7. Caraschi, J.C.; Campanha, S.P.; Curvelo, A.A.S. Preparação e caracterização de polpas para dissolução obtidas a partir do bagaço de cana-de-açúcar. *Polímeros: Ciência e Tecnologia.* 24, 1996.
8. Alejandro Rodríguez, Ana Moral, Luis Serrano, Jalel Labidi, Luis Jiménez. Rice straw pulp obtained by using various methods. *Bioresource Technology.* 99, 2881, 2008.
9. Tamanini, C.; Haully, M.C.O. Resíduos agroindustriais para a produção biotecnológica do Xilitol. Semina: *Ciências Agrárias, Londrina.* 25, 315, 2004.
10. <http://www.ibge.gov.br>, acessado em 16 de janeiro de 2008.

11. Klem, D.; Heublein, B.; Fink, Hans-Peter; Bohn, A. Cellulose: Fascinating Biopolymer and Sustainable raw material. Reviews – *Polymer Science. Angew. Chem. Int.* 44, 3358, 2005.
12. Kontturi, E.; Tammelin, T.; Osterberg, M.; Cellulose – model films and fundamental approach. *Chem. Soc. Rev.* 35, 1287, 2006.
13. Vieira, R..G.P., Rodrigues Filho, G., Assunção, R.M.N. Meireles, C.S., Vieira, J.G., Oliveira, G.S. Synthesis and characterization of methylcellulose from sugar cane bagasse cellulose. *Carbohydr Polym* 67, 182, 2007.
14. Rodrigues Filho, G., Assunção, R.M.N., Vieira, J.G., Meireles, C.S., Cerqueira, D.A., Barud, H.S., Ribeiro, S.J.L., Messaddeq, Y. Characterization of methylcellulose produced from sugar cane bagasse cellulose: Crystallinity and thermal properties. *Polymer Degradation Stability.* 92, 205, 2007.
15. Ott, E....(ed.), High Polymers - Cellulose and Cellulose Derivatives, V5. Interscience Publishers, inc., New York, 1943.
16. Tejado, A.; Peña, C.; Labidi, J.; Echeverria, J.M.; Mondragon, I. Physico-chemistry characterization of lignins from different sources for use in phenol-formaldehyde resin synthesis. *Bioresource Technology*, 98, 1655, 2007.
17. Hoareau, W.; Trindade, W.G.; Siegmund, B.; Castellan, A.; Frollini, E. Sugar Cane Bagasse and Curaua lignins oxidized by chlorine dioxide and reacted with furfuryl alcohol: characterization and stability. *Polymer degradation and stability*, 86, 567, 2004.
18. Chen, X., Burger, C., Fang, D., Ruan, D., Zhang, L., Hsiao, B.S., Chu, B. X – ray studies of regenerated cellulose fibers wet spun from cotton linter pulp in NaOH/thiourea aqueous solution. *Polymer*, 47, 2839, 2006.
19. Liu, C.F.; Sun, R.C.; Zhang, A.P.; Ren, J.L.; Geng, Z.C. Structural and thermal characterization of sugarcane bagasse cellulose succinates prepared in ionic liquid. *Polymer Degradation and Stability.* 91, 3040, 2006.

20. Saalwächter, K.; Burchard, W.; Klüfers, P.; Kettenbach, G.; Mayer, P.; Klemm, D.; Dugarmaa, S. Cellulose solutions in water containing metal complexes. *Macromolecules*. 33, 4094, 2000.
21. Cerqueira, D.A., Rodrigues Filho, G., Meireles, C.S. Optimization of sugarcane bagasse cellulose acetylation. *Carbohydrate Polymers*. 69, 579, 2007.
22. Rodrigues Filho, G., Toledo, L.C., Cerqueira, D.A., Assunção, R.M.N., Meireles, C.S., Otaguro, H., Rogero, S.O., Lugão, A.B. Water flux, DSC and cytotoxicity characterization of membranes fo cellulose acetate produced from sugar cane bagasse using PEG 600. *Polymer Bulletin*. 59, 73, 2007.
23. Rogero, S.O., Malmonge, S.M., Lugão, A.B., Ikeda, T.I., Miyamaru, L., Cruz, A.S. Biocompatibility Study of Polymeric Biomaterials. *Artif Organs*. 27, 424, 2003.
24. Merdy, P. Guillon, E., Aplincourt, M.; Dumonceau, J.; Vezin, H. Copper sorption on a straw lignin: Experiments and EPR characterization. *Journal of colloid and interface science*. 245, 24, 2002.
25. Assunção, R.M.N. Caracterização físico – química e medidas de transporte iônico em filmes de celulose regenerada. *Dissertação de mestrado. Programa de Pós – graduação em Química: Departamento de Química – UFSCar, São Carlos. 1995.*
26. Gadd, K.F. Cellulose Films: A Student Project 1 - The Cuprammonium Process. *Chemical Education*. 21,15, 1984.
27. Adebajo, M.O., Frost, R. L. Infrared and ¹³C MAS nuclear magnetic ressonante spectroscopy study of acetylation of cotton. *Spectrochimica Acta Par A*. 60, 449, 2004.
28. Colom, X., Carrilho, F., Nogués, F., Garriga, P. Structural analysis of photodegraded wood by means of FTIR spectroscopy. *Polymer Degradation and Stability*, 80, 543, 2003.
29. Sousa, M. de F. B. Separação e Identificação dos Constituintes do Bagaço de cana-de-açúcar e sua Conversão em Insumos Químico pelo Processo “Organosolv”. *Dissertação de Mestrado, Unicamp-Instituto de química, 1984.*

30. Reddy, S.S., Bhaduri, S.K., Sen, S.K. Infrared Spectra of Alkali treated Jute Stick. *J. Appl. Polym. Sci.* 41, 329, 1990.
31. Baldinger, T.; Moosbauer, J.; Sixta, H. Supermolecular structure of cellulosic materials by Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) calibrated by WAXS and ¹³CNMR. *AUSGABE.* 79, 2000.
32. Uesu, N.Y.; Pineda, E.A.G.; Hechenleitner, A.A.W. Microcrystalline cellulose from soybean husk: effects of solvent treatments on its properties as acetylsalicylic acid carrier. *International Journal of Pharmaceutics.* 206, 85, 2000.
33. Yang, H.; Yan, R.; Chen, H.; Lee, D.H., Zheng, C. Characteristics of hemicelluloses, cellulose and lignin pyrolysis. *Fuel*, 2007, *in press*.
34. Kesting, R.E., Synthetic Polymeric Membranes - A Structural Perspective. 2 ed. *John Wiley and Sons*, 1985.
35. Amaral, M.B. Citotoxicidade in vitro e biocompatibilidade in vivo de compósitos a base de hidroxiapatita, colágeno e quitosana. Dissertação de mestrado. Programa de Pós – graduação das interunidades: *Escola de engenharia de São Carlos/ Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/ Instituto de Química de São Paulo/ USP. São Carlos*, 2006.