Juliana Rodrigues de Souza

Estudo da desacetilação da quitosana e obtenção de suas nanopartículas para aplicação em Engenharia de Tecidos

São Paulo

2017

Juliana Rodrigues de Souza

Estudo da desacetilação da quitosana e obtenção de suas nanopartículas para aplicação em Engenharia de Tecidos

Dissertação apresentada à
Escola Politécnica da
Universidade de São Paulo como
parte dos requisitos para obtenção
do título de Mestre em Ciências.

São Paulo

2017

Juliana Rodrigues de Souza

Estudo da desacetilação da quitosana e obtenção de suas nanopartículas para aplicação em Engenharia de Tecidos

Dissertação apresentada à
Escola Politécnica da
Universidade de São Paulo como
parte dos requisitos para obtenção
do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração:

Engenharia Química

Orientador:

Prof. Dr. Reinaldo Giudici

São Paulo

2017

Este exemplar foi revisado e corrigido em relação à versão original, sob responsabilidade única do autor e com a anuência de seu orientador.

São Paulo, _____ de _____ de _____

Assinatura do autor: _____

Assinatura do orientador: _____

Catálogo-na-publicação

Souza, Juliana Rodrigues de
Estudo da desacetilação da quitosana e obtenção de suas nanopartículas para aplicação em engenharia de tecidos / J. R. Souza -- versão corr. -- São Paulo, 2017.
142 p.

Dissertação (Mestrado) - Escola Politécnica da Universidade de São Paulo. Departamento de Engenharia Química.

1.Quitosana 2.Engenharia de tecidual 3.Nanopartículas I.Universidade de São Paulo. Escola Politécnica. Departamento de Engenharia Química II.t.

Dedico este projeto, ao Wagner de Souza Pereira, que, como um samba de raiz, me traz alegria, calor e vibração, e no meu dia a dia é o tempero necessário para o meu viver, me tornando mais forte em cada abraço seu envolvido com todo amor.

Agradeço primeiramente a Deus, esta força maior que a tudo rege, por me dar discernimento de fazer as escolhas certas, por me proporcionar alegria de enxergar beleza nas pequenas coisas e de me transmitir força para seguir em frente.

Agradeço ao meu melhor amigo, meu pai Raul, que é a luz da minha vida e que sempre tem uma palavra terna e de estímulo nos momentos mais difíceis.

Agradeço à minha mãe, Maria Cristina, por sempre ter sido uma referência de luta, de superação e de determinação pelo que acreditamos ser a nossa felicidade.

Agradeço aos meus irmãos Ivan e Rodrigo pelo exemplo de coragem e determinação, pela inspiração diária que representam pra mim de seriedade diante dos obstáculos da vida, me fazendo acreditar na realização de meus sonhos, e enfrentar desafios que me pareciam intransponíveis.

Agradeço ao meu querido Wagner de Souza Pereira pelo seu amor que me fortalece, pelo seu olhar terno nos dias difíceis, pelos seus abraços fortes quando achei que não iria conseguir e por me proporcionar paz em nossa casa, toda sua dedicação e compreensão foram fundamentais para minha concentração no desenvolvimento deste projeto.

Agradeço ao meu orientador, o professor Dr. Reinaldo Giudici pela oportunidade, por acreditar em meu potencial e por me orientar em todos os momentos desde o início deste trabalho.

Agradeço à Capes pela bolsa de estudos, que em muito contribuiu para que este estudo se concretizasse.

Agradeço aos colegas e amigos da USP que me incentivaram e que me auxiliaram nas dúvidas durante o estudo: Erica, Esmar, Altanajara, Maria Giuliana, Thiago, Vinicius, Thamara, Katia, Camila e Aninha.

Agradeço aos amigos que muito me motivaram, em especial minha querida irmãzinha de alma Elizangela, sempre com suas palavras de carinho e incentivo.

Agradeço aos professores doutores que foram importantíssimos nos esclarecimentos de muitas dúvidas no decorrer deste estudo, são eles: Alberto Ramos, Mauro Cesar Terence, Antônio Brant, Martha Simões, Dr. David, Carmen e Martin Schmal.

Agradeço a todos os técnicos do laboratório de engenharia de materiais, da Universidade Presbiteriana Mackenzie, pelas dúvidas esclarecidas e por me fazer me sentir em casa como uma eterna mackenzista.

“A vida é uma peça de teatro que não permite ensaios. Por isso, cante, chore, dance, ria e viva intensamente, antes que a cortina se feche e a peça termine sem aplausos.”

Charles Chaplin

RESUMO

Estima-se, que, no Brasil, ocorram cerca de um milhão de vítimas de queimaduras por ano, e mesmo com a dinâmica de inovações na área da saúde, a reparação deste tipo de lesão tecidual, permanece um grande desafio. Os queimados tendem a contrair infecções sistêmicas, as quais poderão levar a óbito, se não houver o tratamento adequado ao paciente. Desta forma, são necessários cuidados extremos nas etapas que envolvem este complexo reparo tissular. Diante das dificuldades na substituição ou regeneração de órgãos ou tecidos lesionados, surgiu um campo interdisciplinar chamado de engenharia de tecidos, com foco no estudo para o desenvolvimento de suportes tridimensionais, constituídos de materiais sintéticos ou naturais, onde são cultivadas células do próprio paciente, para posteriormente serem reinseridas reparando tecidos ou substituindo órgãos por inteiro. A quitosana é um dos biopolímeros mais utilizados hoje na área de engenharia de tecidos, devido a sua capacidade de agir de forma significativa nas três fases que envolvem a cicatrização de queimaduras, sendo elas: a fase inflamatória, a fase proliferativa e a fase reparadora, e por sua alta ação bacteriostática e fungistática. Diante das propriedades já existentes da quitosana, o objetivo desta pesquisa foi o estudo para intensificá-las, através do aumento do seu grau de desacetilação e modificando-a para uma escala nanométrica aumentando assim sua área superficial. Para isso, a quitosana foi submetida a meio altamente alcalino com variação de temperatura e variação do tempo de reação, utilizando a ferramenta estatística fatorial completo 2^3 . Após a obtenção das amostras desacetiladas, foi verificado, através dos espectros obtidos por espectroscopia na região do infravermelho, que os maiores valores de grau de desacetilação ocorreram utilizando os níveis máximos em todos os fatores envolvidos na reação. Para analisar a cinética da reação e confirmar as informações obtidas do fatorial 2^3 , foi feito um novo planejamento fatorial 2^2 , fixando o tempo de seis horas de reação, e no decorrer deste tempo foram retiradas onze alíquotas, para análise de seus graus de desacetilação (GD). O padrão de resultados dos experimentos permitiu a aplicação de um modelo matemático que representou a realidade do que ocorreu durante a reação, sendo este o modelo do núcleo não reagido. Posteriormente, a quitosana com alto grau de desacetilação foi submetida ao método de ultrassom e pelas análises do diâmetro das partículas, potencial zeta e índice de polidispersão, foi

possível verificar que a quitosana após ser submetida ao ultrassom e no pH adequado, foi possível atingir partículas em escala nanométrica.

Palavras-chave: quitosana, engenharia de tecidos, queimaduras e nanopartículas.

ABSTRACT

It is estimated that in Brazil about one million burn victims occur per year, and even with the dynamics of innovations in the health area, the repair of this type of tissue injury, remains a great challenge. Burns tend to contract systemic infections, which can lead to death if the patient is not adequately treated. In this way, extreme care is required in the steps involved in this complex tissue repair. Faced with difficulties in the replacement or regeneration of injured organs or tissues, an interdisciplinary field called tissue engineering has emerged, focusing on the study for the development of three-dimensional supports, consisting of synthetic or natural materials, where the patient's own cells are cultured, subsequently reinserted by repairing tissues or replacing whole organs. Chitosan is one of the most widely used biopolymers nowadays in the field of tissue engineering, due to its capacity to act in a significant way in the three phases that involve the healing of burns, namely: inflammatory phase, proliferative phase and repair phase, and for its high bacteriostatic and fungistatic action. In view of the existing properties of chitosan, the objective of this research was to intensify them by increasing its degree of deacetylation and modifying it to a gauge scale, thus increasing its surface area. For this, chitosan was submitted to a highly alkaline medium with temperature variation and reaction time variation, using the complete factorial statistical tool 2^3 . After obtaining the deacetylated samples, it was verified by spectroscopy in the infrared region, that the highest values of deacetylation degree occurred after using the maximum levels in all factors involved in the reaction. In order to analyze the kinetics of the reaction and to confirm the information obtained from factorial 2^3 , a new 2^2 factorial design was made, fixing the time of six hours of reaction, during which eleven aliquots were taken for analysis of their degree of desacetylation (GD). The pattern of results of the experiments allowed the application of a mathematical model that represented the reality of what occurred during the reaction, being this the model of the shrinking core model. Subsequently, the chitosan with a high degree of deacetylation was subjected to the ultrasound method and the analysis of particle diameter, zeta potential and polydispersion index allowed to verify that chitosan after being submitted to ultrasound at the appropriate pH achieved particles in nanometer scale.

Keywords: chitosan, tissue engineering, burns and nanoparticles.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Estrutura da quitina.	26
Figura 2 - Comparação entre as estruturas da celulose e da quitina.	27
Figura 3 - Estruturas polimórficas da quitina.	28
Figura 4 - Reação de desacetilação da quitina.	29
Figura 5 - Estrutura da quitosana.	31
Figura 6 - Comparação entre ácido hialurônico e quitosana.	33
Figura 7 - Tecido epitelial.	40
Figura 8 - Fibroblasto.	42
Figura 9 – Profundidade das queimaduras.....	43
Figura 10 - Etapas da Engenharia de Tecidos.	46
Figura 11 - Estratégia experimental.	51
Figura 12 – Desacetilação da quitosana.	52
Figura 13 - Reação de desacetilação no balão volumétrico e equipamentos.	54
Figura 14 - Medidor de pH de bancada.	58
Figura 15 - Equipamento ultrassônico de ponteira.	59
Figura 16 - Espectrômetro da marca Shimadzu, modelo IR Prestige - 21.	61
Figura 17 - Laminas de silício antes e depois do recobrimento de ouro.....	62
Figura 18 - Equipamento para análise de MEV.....	62
Figura 19 - Equipamento Zetasizer, modelo ZEN3600 da Malvern Instruments.	64
Figura 20 - Cubeta para potencial Zeta e para diâmetro hidrodinâmico.....	65
Figura 21 - Espectro de FTIR referente ao experimento 8 da duplicata.	67
Figura 22 - Espectros sobrepostos dos oito primeiros experimentos do fatorial 2^3	68
Figura 23 - Espectros deslocados dos oito primeiros experimentos do fatorial 2^3	69
Figura 24 - Espectros sobrepostos da duplicata genuína do fatorial 2^3	69
Figura 25 - Espectros deslocados da duplicata genuína do fatorial 2^3	70
Figura 26 - Espectros sobrepostos da triplicata genuína fatorial 2^3	70
Figura 27 – Espectros deslocados da triplicata genuína do fatorial 2^3	71
Figura 28 - Representação gráfica da triplicata do fatorial 2^3	73
Figura 29 - Cubo referente aos graus de desacetilação obtidos no fatorial 2^3	73
Figura 30 - Gráfico de probabilidade normal de análise de resíduos.	74
Figura 31 - Gráfico que demonstra ausencia de outliers.	75

Figura 32 - Análise da variância de resíduos.	75
Figura 33 - Diagrama de pareto Fatorial 2^3	76
Figura 34 - Efeitos principais fatorial 2^3	77
Figura 35 - Interações entre os fatores do fatorial 2^3	77
Figura 36 - Gráfico de contorno do Concentração de NaOH com o tempo do fatorial 2^3	78
Figura 37 - Gráfico de contorno da temperatura com a Concentração de NaOH do fatorial 2^3	79
Figura 38 - Gráfico de contorno do tempo de reação com a temperatura do fatorial 2^3	79
Figura 39 - Superfície de resposta (tempo x temperatura x GD) Fatorial completo 2^3	80
Figura 40 - Superfície de resposta (concentração de NaOH x temperatura x GD) Fatorial completo 2^3	81
Figura 41 - Superfície de resposta (tempo x Concentração de NaOH x GD) Fatorial completo 2^3	81
Figura 42 - Espectro de referência experimento 4 após 360 minutos de reação.	82
Figura 43 - Espectros sobrepostos das 11 alíquotas do experimento 1 do fatorial 2^2	84
Figura 44 - Espectros deslocados das 11 alíquotas do experimento 1 do fatorial 2^2	85
Figura 45 – Gráfico da evolução dos graus de desacetilação das 11 alíquotas do experimento 1.	85
Figura 46 - Espectros sobrepostos das 11 alíquotas do experimento 2 do fatorial 2^2	86
Figura 47 – Espectros deslocados das 11 alíquotas do experimento 2 do fatorial 2^2	87
Figura 48 – Gráfico da evolução dos graus de desacetilação das 11 alíquotas do experimento 2.	87
Figura 49 – Espectros sobrepostos das 11 alíquotas do experimento 3 do fatorial 2^2	88
Figura 50 - Espectros deslocados das 11 alíquotas do experimento 3 do fatorial 2^2	88
Figura 51 – Gráfico da evolução dos graus de desacetilação das 11 alíquotas do experimento 3.	89

Figura 52 – Espectros sobrepostos das 11 alíquotas do experimento 4 do fatorial 2^2 .	90
Figura 53 - Espectros deslocados das 11 alíquotas do experimento 4 do fatorial 2^2 .	90
Figura 54 – Gráfico da evolução dos graus de desacetilação das 11 alíquotas do experimento 4.	91
Figura 55 - Espectros sobrepostos das 11 alíquotas do experimento 5 do fatorial 2^2 .	91
Figura 56 - Espectros deslocados das 11 alíquotas do experimento 5 do fatorial 2^2 .	92
Figura 57 - Espectros sobrepostos das 11 alíquotas do experimento 6 do fatorial 2^2 .	92
Figura 58- Espectros deslocados das 11 alíquotas do experimento 6 do fatorial 2^2 .	93
Figura 59 - Espectros sobrepostos das 11 alíquotas do experimento 7 do fatorial 2^2 .	93
Figura 60 – Espectros deslocados das 11 alíquotas do experimento 7 do fatorial 2^2 .	94
Figura 61 - Gráfico da evolução dos graus de desacetilação das 11 alíquotas da triplicata.	94
Figura 62 - Gráfico dos resultados das alíquotas dos sete experimentos do fatorial 2^2 .	96
Figura 63 - Plotagem dos resultados fatorial 2^2 .	97
Figura 64 - Diagrama de pareto fatorial 2^2 .	97
Figura 65 - Interações entre os fatores do fatorial 2^2 .	98
Figura 66 - Gráfico de contorno da temperatura com a Concentração de NaOH do fatorial 2^2 .	99
Figura 67 - Superfície de resposta Fatorial completo 2^2 .	99
Figura 68 - Modelo do núcleo não reagido para reação de desacetilação da quitosana.	101
Figura 69 - Reação de desacetilação.	103
Figura 70 – Gráfico com os testes das equações (12), (13) e (14) com os dados do ensaio 1.	105
Figura 71 – Gráfico com dados experimentais de conversão (grau de desacetilação) versus tempo para o ensaio 1.	106
Figura 72 - Teste da Equação (20) para a queda da difusividade.	109
Figura 73 - Ajuste da Equação (19) para cada ensaio separadamente.	111

Figura 74 - Verificação da variação dos parâmetros ajustados K e A com a temperatura e com a concentração de NaOH.	112
Figura 75 - Ajuste da Equação (19) e (22) para todos os ensaios simultaneamente	113
Figura 76 - Resultados da triplicata do perfil de temperatura da medição em pH 4,1.	116
Figura 77 - Resultados da triplicata do perfil de temperatura da medição em pH 4,4.	117
Figura 78 - Resultados da triplicata do perfil de temperatura da medição em pH 4,7.	118
Figura 79 - Comparação de resultados dos três de pH.	122
Figura 80 - Picos referentes a quitosana inicial.	123
Figura 81 - Imagem das partículas de quitosana inicial.	123
Figura 82 - Gráfico do pico referente a quitosana após 120 segundos de ultrassom.	124
Figura 83 - Imagem de MEV das partículas de quitosana após 120 segundos de ultrassom.	124
Figura 84 - Pico referente a quitosana após 480 segundos de ultrassom.	125
Figura 85 - Imagem de MEV das partículas de quitosana após 480 segundos de ultrassom.	125
Figura 86 - Pico referente a quitosana após 900 segundos de ultrassom.	126
Figura 87 - Imagem de MEV das partículas de quitosana após 480 segundos de ultrassom.	126
Figura 88 – Medidas de Nanopartículas de quitosana após 900 segundos de ultrassom.	127
Figura 89 – Imagem de aglomerados de quitosana após 900 segundos de ultrassom.	127
Figura 90 – Imagem das nanopartículas de quitosana após 900 segundos de ultrassom.	128

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Planejamento Fatorial 2^3	53
Tabela 2 - Níveis dos fatores do planejamento fatorial 2^3	53
Tabela 3 - Planejamento Fatorial 2^2	55
Tabela 4 - Níveis dos fatores do planejamento fatorial 2^2	56
Tabela 5 - Resultados dos graus de desacetilação obtidos no fatorial 2^3	72
Tabela 6 - Resultados do planejamento experimental 2^2 com tres repetições no ponto central.	84
Tabela 7 - Resultados das 11 alíquotas do fatorial 2^2	95
Tabela 8 - Valores dos parâmetros A e K ajustados individualmente para cada ensaio.	110
Tabela 9 - Resultados da medição de temperatura pH 4,1.	116
Tabela 10 - Resultados da medição de temperatura pH 4,4.	117
Tabela 11 - Resultados da medição de temperatura pH 4,7.	118
Tabela 12 - Resultados das nanopartículas em pH 4,1.....	120
Tabela 13 - Resultados das nanopartículas em pH 4,4.....	121
Tabela 14 - Resultados das nanopartículas em pH 4,7.....	121

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
1.1	GENERALIDADES	17
1.2	MOTIVAÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	20
1.3	OBJETIVO.....	20
1.4	ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO	21
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	23
2.1	POLÍMEROS	23
2.1.1	Polímeros naturais e sintéticos	23
2.1.2	Biopolímeros	24
2.1.3	Polímeros biodegradáveis e biocompatíveis.....	24
2.1.4	Copolímeros.....	25
2.2	BIOMATERIAIS	25
2.3	POLISSACARIDEOS	26
2.4	QUITOSANA	26
2.4.1	Origem, fontes e processos de obtenção.....	27
2.4.2	Propriedades da quitosana e características de sua estrutura	30
2.4.3	Nanopartículas de quitosana	35
2.5	NANOTECNOLOGIA.....	35
2.6	SISTEMA TEGUMENTAR.....	39
2.6.1	Fibroblastos	41
2.7	QUEIMADURAS	42
2.7.1	Processo de cicatrização da pele	44
2.8	ENGENHARIA DE TECIDOS	45
2.9	CINÉTICA DAS REAÇÕES.....	47
2.10	MODELAGEM MATEMÁTICA.....	48
2.10.1	Modelo do núcleo não reagido.....	48

2.11	PLANEJAMENTO DE EXPERIMENTOS COM VÁRIOS FATORES.....	49
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	50
3.1	DESACETILAÇÃO DA QUITOSANA	52
3.2	OBTENÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA POR ULTRASSOM.....	57
3.3	CARACTERIZAÇÃO DA QUITOSANA E DAS NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA	59
3.3.1	Análise de Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) 60	
3.3.2	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	61
3.3.3	Potencial Zeta, índice de polidispersão e diâmetro hidrodinâmico	63
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	66
4.1	RESULTADOS E DISCUSSÃO REFERENTE AO FATORIAL 2^3	66
4.2	RESULTADOS E DISCUSSÃO REFERENTE AO FATORIAL 2^2	82
4.3	RESULTADOS E DISCUSSÕES DA MODELAGEM MATEMÁTICA DO NÚCLEO NÃO REAGIDO (SHRINKING CORE MODEL) PARA REAÇÃO DE DESACETILAÇÃO	100
4.4	RESULTADOS E DISCUSSÕES SOBRE AS NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA OBTIDAS APÓS O TRATAMENTO DE ULTRASSOM.....	115
5	CONCLUSÕES.....	129
	REFERÊNCIAS.....	131

1 INTRODUÇÃO

1.1 GENERALIDADES

As queimaduras são uma das enfermidades mais traumáticas que podem ocorrer ao ser humano. Anualmente no Brasil, mais de um milhão de pessoas, são vítimas destas lesões tornando este incidente um problema de saúde pública, e tendo como principais vítimas as crianças, alerta a Sociedade Brasileira de Queimaduras. Esta lesão tecidual, geralmente gera sequelas funcionais, estéticas e psicológicas que podem ser agravadas de acordo com a extensão e ou a profundidade das queimaduras pelo corpo do paciente ^{1,2}.

A queimadura, é uma lesão altamente agressiva , podendo atingir camadas mais profundas do tecido celular subcutâneo, como músculos tendões e ossos, e portanto, dependendo da gravidade, poderá causar danos irreversíveis ao paciente. As principais causas das queimaduras são, por exposição a temperaturas extremas de calor ou frio, eletricidade, radioatividade ou por contato com produtos químicos corrosivos que possivelmente levam a desnaturação das proteínas das células da pele ^{1,2,3}.

A restauração da pele, após as queimaduras, envolve a interação de células, a ação de microorganismos, processos físico-químicos e bioquímicos, para que desta forma proporcione reparação do tecido lesionado com excelência ^{4,5}. Os tratamentos de queimaduras graves (segundo grau profundas ou de terceiro grau) necessitam enxertia de pele, e independente da gravidade, durante as etapas de reparação, são necessários cuidados especiais para que não ocorra uma evolução gerando uma cicatrização patológica ^{4,5,6}.

As queimaduras, quando atingem grandes extensões do corpo de um paciente, atingindo parcialmente ou totalmente a derme, aumentam a possibilidade de infecções devido à vulnerabilidade, facilitando a invasão de bactérias, perda de volume de líquidos gerando alta desidratação, alterações metabólicas devido a um gasto energético de até 50% acima do normal, além de dor e stress psicológico ^{4,5,6}.

Desta forma, o tratamento necessita de cuidados especiais, onde os ferimentos dos pacientes devem ser recobertos rapidamente com assepsia adequada, para evitar possíveis infecções e proporcionar ao paciente uma resposta mais rápida e eficaz ao tratamento ^{4,5,6}.

Diante das dificuldades da reparação ou regeneração de tecidos, no caso de queimaduras ou de outras lesões teciduais, surgiu um campo interdisciplinar envolvendo especialistas de diversas áreas como biologia, medicina, engenharia, química e ciência dos materiais, chamado de engenharia de tecidos.

Este campo é voltado ao estudo com o foco principal no desenvolvimento de materiais e métodos que auxiliem na regeneração de órgãos e tecidos vivos através do recrutamento de tecido do próprio paciente, que são dissociados em células e cultivadas sobre matrizes dérmicas de origem natural ou sintética, conhecidos como *scaffolds* (suportes tridimensionais), para então serem reinseridos no paciente ^{7,8}.

Como mencionado anteriormente, a complexidade envolvida no tratamento de queimaduras de segundo grau mais profundas levou ao estudo na busca de outras alternativas de tratamento. Desta forma, estudos foram feitos envolvendo biomateriais naturais ou sintéticos com propriedades como: biocompatibilidade, biodegradabilidade, baixa toxicidade, e que ao mesmo tempo auxiliassem de forma significativa na restauração do tecido lesionado ^{7,8}.

Os materiais de origem natural mais utilizados hoje na área médica, que foram estudados para aplicação na engenharia de tecidos são o colágeno, a quitina, a quitosana, a queratina, a elastina e o ácido hialurônico ^{7,8,9}. Todos estes materiais, têm funções de extrema importância nas etapas de reparação de tecidos.

Dentre os materiais mais utilizados no campo da engenharia de tecidos, esta o biomaterial quitosana, por possuir excelentes propriedades que lhe garante uma grande variedade de aplicações, suas propriedades mais importantes são: sua capacidade de estimular o sistema imunológico, auxiliar e acelerar o processo de reparação de feridas e de queimaduras, atoxicidade, porosidade, alta carga superficial, biocompatibilidade, biodegradabilidade, além de ser um material bacteriostático e fungistático ^{9,10}.

A quitosana possui em sua estrutura unidades *N*-acetil-D-glicosamina e D-glicosamina unidas por ligações glicosídicas, caracterizando-o como um glicosaminoglicano, e desta forma possui grande similaridade com o ácido hialurônico, substância encontrada na matriz extracélular do tecido adiposo e capaz de contribuir de forma significativa na restauração ou regeneração de lesões teciduais ^{9,10}.

A grande semelhança da estrutura da quitosana com o ácido hialurônico permite que esse biomaterial tenha papel fundamental nas três fases da reparação de

tecidos que sofreram queimaduras; são elas: a fase inflamatória, a fase proliferativa e a fase reparadora ou fase de remodelação ^{9,10}.

Na fase inflamatória, ocorre a formação de uma barreira formada por plaquetas que se aglomeram, esta rede que se forma, tem fundamental importância contra agentes infecciosos e é ainda nesta fase que se inicia o processo para restauração da matriz extracélular. A quitosana, auxilia nesta etapa devido a sua capacidade de ativar macrófagos, que são células que surgem logo após o surgimento de uma rede de fibrina, estas células agem na defesa do organismo contra infecções ^{10,11}.

Na fase proliferativa, ocorre a movimentação de células importantes como os queratinócitos e os fibroblastos, que agem na formação do tecido de granulação, os fibroblastos tem papel fundamental na formação de uma nova matriz extracélular. A quitosana é capaz de auxiliar nesta etapa, pois em contato com o meio fisiológico, sendo um glicosaminoglicano, ela se quebra em monômeros que são biossintetizados, dando origem ao ácido hialurônico (substância que é necessária em grande quantidade nesta etapa de formação da matriz extracélular) ^{10,11}.

Na fase de remodelação do tecido ocorre uma tentativa de recuperação da estrutura tecidual normal. A quitosana age nesta fase final de reparação por ativar as células envolvidas na reparadora do tecido como, os leucócitos, macrófagos e fibroblastos, facilitando assim, a granulação e organização das células durante o processo de epitelização ^{10,11}.

A quitosana, além da ação mencionada anteriormente nas etapas de cicatrização de lesões, quanto maior a quantidade de grupos amino protonados em sua estrutura, com o aumento do seu grau de desacetilação, mais intensa é sua atividade antimicrobiana, pois seus grupos amino protonados são capazes de se ligar aos grupos aniônicos das paredes celulares de micro-organismos, inibindo o crescimento destes ^{13,14}.

Na área médica, muito se tem estudado materiais em escala manométrica. Esta escala está associada a um conjunto de conceitos, conhecimentos e ferramentas de um campo de estudo chamado de nanotecnologia, em que se utilizam estruturas no tamanho entre 1 a 100 nanômetros (nm), definido como 10^{-9} metro. Neste estudo, buscam-se métodos na produção de nanopartículas, aumentando sua área superficial, e que mesmo procurando manter a estabilidade da molécula e manutenção de sua ação biológica ^{14,15}.

Para intensificar a capacidade de auxiliar na reparação das queimaduras de pele, aumentar a interação em meio biológico, e agir contra possíveis infecções, a quitosana pode ter seu grau de desacetilação alterado para valores iguais ou maiores que 90%, e pode ser modificada para forma de nanopartículas, aumentando-se portanto sua área superficial.

1.2 MOTIVAÇÃO E JUSTIFICATIVA

O foco principal deste estudo foi obter quitosana na escala nanométrica com alto grau de desacetilação, para que, desta forma, suas propriedades já existentes, fossem intensificadas, como sua ação bacteriostática e fungistática e sua capacidade de agir de forma significativa nas fases de reparação da pele.

A obtenção de nanopartículas de quitosana com alto grau de desacetilação, poderá ser utilizada em trabalhos futuros, sendo inseridas em uma rede tridimensional. Esta rede, poderá ser feita de nanofibras de materiais sintéticos ou naturais com características biodegradáveis e biorreabsorvíveis, formando um tecido artificial que poderá ser aplicado em queimaduras graves, podendo evitar processos inflamatórios que poderiam gerar cicatrizes hipertróficas.

Até o presente momento, dentro dos estudos e das pesquisas feitas, não foi publicado ainda, nenhum trabalho utilizando nanopartículas de quitosana inseridas em uma rede tridimensional, para aplicação como um tecido artificial em queimaduras graves.

1.3 OBJETIVO

O objetivo principal deste estudo foi intensificar as propriedades já existentes da quitosana para sua futura aplicação em engenharia de tecidos, tendo como objetivos específicos:

- submeter a quitosana a reação de desacetilação para retirar os grupos acetil da estrutura;
- identificar os graus de desacetilação obtidos após as reações;
- analisar os fatores principais e suas interações durante a reação e analisar a cinética da reação de desacetilação;

- submeter a quitosana com o maior grau de desacetilação obtido ao método de ultrassom;
- analisar se foi atingida a escala nanométrica da quitosana estudada.

1.4 ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO

Este trabalho está dividido em 6 capítulos, em que o primeiro é uma introdução do tema proposto, explicando inicialmente as estatísticas atuais no Brasil em relação às queimaduras, a importância dos cuidados para as etapas de reparação para evitar a ocorrência de cicatrizações patológicas no paciente queimado, ou até mesmo levar o paciente a óbito, devido a um quadro crítico de infecções. Ainda na introdução, foram mencionados, os principais materiais utilizados na área de engenharia, dando ênfase ao material quitosana devido suas propriedades relevantes para a aplicação estudada. Por fim, é mencionado o aumento dos grupos amino protonados pela desacetilação da quitosana, e a modificação para uma escala nanométrica, permitindo acentuar suas propriedades já existentes.

O segundo capítulo se refere à revisão bibliográfica relacionada ao tema proposto, dando ênfase aos principais tópicos como: polímeros, biomateriais, polissacarídeos, quitosana, nanotecnologia, sistema tegumentar, queimaduras, engenharia de tecidos, cinética das reações, modelagem matemática e planejamento de experimentos com vários fatores. Alguns tópicos foram subdivididos em subtópicos, para melhor compreensão do assunto abordado. Ainda que, o tópico principal foi o biomaterial quitosana.

O terceiro capítulo está relacionado à metodologia do trabalho cujo título é materiais e métodos, em que são mencionados os materiais utilizados como: a quitosana, o hidróxido de sódio, o ácido acético e o acetato de sódio; os procedimentos para as reações de desacetilação, e para a obtenção das nanopartículas de quitosana e a caracterização daquelas, o detalhamento das análises do grau de desacetilação feitas através da obtenção de espectros (FTIR), também está dentro deste capítulo, assim como o uso da ferramenta estatística para analisar de forma mais aprofundada as interações e efeitos dos fatores envolvidos na reação.

O quarto capítulo se refere aos resultados e às discussões feitas em relação aos graus de desacetilação obtidos, e a viabilidade da análise da cinética mediante as

alíquotas retiradas durante a reação de desacetilação. Além disso, a escolha do modelo matemático para a reação de desacetilação, permitido devido a boa repetibilidade nos resultados dos experimentos foram propostos neste capítulo. Por fim, os resultados das nanopartículas obtidas, verificando os fatores que influenciaram para sua obtenção como o pH e o tempo de ultrassom. Deve-se salientar, que os comentários no que se refere aos resultados, foram em sua totalidade, comparados com resultados já obtidos na literatura.

O quinto e último capítulo se refere à conclusão do estudo, no que se refere a obtenção de nanopartículas de quitosana desacetiladas, assim como também o entendimento para o comportamento da cinética da reação de desacetilação da quitosana pelo tempo de seis horas. Teve como objetivo, o uso da quitosana modificada, para uma futura aplicação na engenharia de tecidos, em especial inserida em uma rede tridimensional formando um tecido artificial que poderá ser utilizado em queimaduras graves auxiliando na restauração do tecido.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 POLÍMEROS

Polímeros, são compostos de origem natural ou sintética, com massa molar na ordem de 10^4 a 10^6 g/mol, formados pela repetição das unidades químicas que são unidas por ligações covalentes, possuindo alta massa molar proveniente destas repetições de unidades que são comumente chamadas de meros. Este número de unidades que se repetem permite calcular o grau de polimerização do polímero, em que os polímeros com alto grau de polimerização são chamados de altos polímeros e que possuem baixo grau são chamados de oligômeros ^{16,17}.

A classificação dos polímeros pode ser de acordo com o tipo de reação de polimerização, e quanto ao mecanismo de reação de polimerização, de acordo com o tipo de reação, são classificados em duas categorias, sendo elas, polímeros de adição e polímeros de condensação. Os polímeros de adição, se caracterizam pela unidade de repetição ser idêntica à do monômero, enquanto que polímeros de condensação são provenientes de reações que geram subprodutos de baixo peso molar. Polímeros naturais como lã, seda, celulose, quitina e amido são classificados como polímeros de condensação pois em sua síntese ocorre eliminação de moléculas ^{16,17}.

O mecanismo de reação de polimerização classifica os polímeros em duas classes: polimerização em etapas que inclui todos os polímeros de condensação, e a polimerização em cadeia, em que um monômero se liga a outro monômero formando um dímero, o dímero que se liga a outro monômero formando um trímero e assim sucessivamente. A polimerização em cadeia necessita de um iniciador, e se divide em três etapas são elas: iniciação, propagação e terminação. A terminação pode ser por desproporcionamento ou por combinação mútua ^{18,19}.

2.1.1 Polímeros naturais e sintéticos

Os polímeros naturais, são os polímeros encontrados na natureza, são aqueles presentes nos organismos animais e vegetais. Os polímeros naturais mais utilizados extraídos de fonte animal são: colágeno, quitina, quitosana, queratina, seda e elastina. Os polímeros naturais mais comuns extraídos das plantas são: o amido, a celulose e a pectina. O uso destes polímeros naturais, mencionados anteriormente, tem sido de

vital importância nos avanços da ciência devido a facilidade de obtenção e por serem biocompatíveis e biodegradáveis. Os polímeros sintéticos são os polímeros produzidos em laboratório, muitos deles são sintetizados para imitar polímeros naturais. Os polímeros sintéticos mais utilizados hoje na área médica, são os poliésteres biorreabsorvíveis como: o copolímero PLGA poli (ácido lático-**co**-ácido glicólico), que permite grande versatilidade em sua estrutura e que são capazes de serem totalmente metabolizados pelo corpo ^{18,19}.

2.1.2 Biopolímeros

Os biopolímeros são polímeros produzidos a partir de matérias primas de fontes renováveis, como: celulose e a quitina. As fontes renováveis geralmente possuem um ciclo de vida menor, ainda assim são muito explorados em diversas áreas, pois geralmente possuem propriedades como biodegradabilidade e biocompatibilidade.

Alguns desses materiais, possuem algumas limitações em suas propriedades. Por esta razão estudos são feitos modificando-os em sua forma ou em sua estrutura química, ou então, são misturados com polímeros sintéticos para adquirir as propriedades necessárias para determinadas aplicações^{19,20,21}.

Desta forma, esses biopolímero são utilizados na forma de blendas, compósitos, nanopartículas ou microesferas. Por exemplo, a quitosana originária da quitina, por não possuir boas propriedades mecânicas, geralmente é utilizada na forma de blenda, que é uma técnica que se baseia na mistura com outro polímero, melhorando suas propriedades e aumentando seu número de aplicações; ou como nanopartículas ou microesferas intensificando suas propriedades já existentes e aumento sua interação em meio biológico. ^{19,20,21}.

2.1.3 Polímeros biodegradáveis e biocompatíveis

Polímeros biodegradáveis são materiais que possuem a capacidade de sofrer degradação por atividade biológica, em especial, por ação enzimática de microrganismos. A biodegradabilidade dos polímeros é uma propriedade explorada na modulação da liberação de fármacos, e na área médica como suturas cirúrgicas ou tecidos artificiais, uma vez que é altamente desejável que um material introduzido no organismo sofra degradação depois de cumprida sua função, sem a necessidade

de intervenções para sua retirada. Os produtos de degradação formados, podem ser metabolizados dando origem a dióxido de carbono e água, ou são eliminados na urina. Polímeros biocompatíveis se assemelham em relação às propriedades dos polímeros biodegradáveis, pois estes materiais são capazes de ser absorvidos em um determinado tempo em meio biológico, e quando aplicados na área médica, sem causar toxicidade ao paciente ^{21,22,23}.

2.1.4 Copolímeros

A polimerização simultânea de dois ou mais monômeros constitui o processo chamado de copolimerização, enquanto que a polimerização de apenas um monômero constitui uma homopolimerização. Por exemplo, ácido láctico e ácido glicólico podem ser polimerizados individualmente dando origem ao poli (ácido láctico) e ao poli (ácido glicólico), mas quando combinados em um único meio reacional se ligam de forma aleatória em uma só cadeia formando o copolímero poli (ácido láctico-co-ácido glicólico) ^{23,24}.

Existe uma grande quantidade de estruturas que podem ser formadas por meio de copolimerização, variando-se as combinações de monômeros e as proporções entre eles. A composição do copolímero resultante de um dado meio reacional, em copolimerização via radicais livres, pode ser calculada a partir da composição da carga inicial e da reatividade relativa dos monômeros (razão de reatividade) ^{22,24}.

Assim como mencionado anteriormente pelo exemplo do copolímero poli (ácido láctico-co-ácido glicólico), outro exemplo é a quitosana, que é formada por dois monômeros, *N*-acetil-D-glicosamina e D-glicosamina, em proporções que podem variar ao longo da cadeia de acordo com a aplicação desejada, permitindo, portanto, uma grande variedade de aplicações ^{22,23}.

2.2 BIOMATERIAIS

Por definição, biomaterial é uma substância, ou uma mistura de substâncias, podendo ser sintético ou natural, que pode ser utilizado em meio biológico. Sua utilização na área médica tem a função de agir por um determinado tempo tratando, reparando ou substituindo um órgão ou função do corpo. A escolha de um biomaterial envolve fatores como biocompatibilidade, biodegradabilidade, propriedades mecânicas

específicas, tempo de degradação controlado, devendo ser atóxico e ter capacidade de se decompor nos fluidos corpóreos sem desencadear processos inflamatórios ^{24,25}.

2.3 POLISSACARÍDEOS

Os mais polissacarídeos são as macromoléculas abundantes da biosfera, formados pela união de muitos monossacarídeos através de ligações glicosídicas. Geralmente são um dos principais elementos estruturais de plantas e encontrados nos exoesqueletos de animais. As ligações glicosídicas ocorrem devido à ligação covalente entre a hidroxila de um carbono ligado ao oxigênio central com a hidroxila de qualquer carbono de outro monossacarídeo, produzindo água. As moléculas se unem produzindo a ligação glicosídica (-O-) como demonstrado na Figura 1 na estrutura da quitina. A maioria dos carboidratos encontrados na natureza ocorre como polissacarídeo e são polímeros de alto peso molecular, constituídos praticamente de carbono, oxigênio e hidrogênio, podendo ter também nitrogênio em sua estrutura. Alguns exemplos de polissacarídeos encontrados na natureza são: a celulose, a quitina, amido, proteínas entre outros ²⁵.

Figura 1 - Estrutura da quitina.

Fonte: Guilbot et al., 1985.

2.4 QUITOSANA

A quitosana é um copolímero linear de origem natural que possui em sua estrutura unidades *N*-acetil-D-glicosamina e D-glicosamina, em proporções que

podem variar ao longo da cadeia, estas diferentes proporções lhe permite grande variedade de aplicações de acordo com a ação desejada. Este biomaterial, exibe atividade antimicrobiana, é biocompatível, biodegradável, atóxico, e com capacidade de auxiliar nas etapas de cicatrização de lesões teciduais, possibilitando seu uso nas áreas da medicina, da odontologia, da farmácia, entre outras. A quitosana pode ser preparada de diferentes formas como: géis, filmes, microesferas, nanoesferas, nanocascas ou membranas.

2.4.1 Origem, fontes e processos de obtenção

A quitina, material que deu origem a quitosana, foi isolada por Branconnot em 1881. Devido à falta de conhecimento sobre suas propriedades, na época, inviabilizaram seu uso, que veio a ocorrer somente no início de 1970²⁶. Nos últimos quarenta anos, o interesse neste polissacarídeo só cresceu. A quitina é o segundo biomaterial mais abundante na natureza perdendo somente para a celulose, tendo ambos os materiais uma sequência linear de açúcares monoméricos como pode ser visualizado na Figura 2²⁶.

Figura 2 - Comparação entre as estruturas da celulose e da quitina.

Fonte: Modificada Solomons, 1990.

A quitina é extraída de dentro da estrutura esquelética de invertebrados como artrópodes, anelídeos, moluscos e celenterados, em algas diatomáceas, e também está presente nas paredes celulares de alguns fungos. As quitinas extraídas da carapaça de crustáceos como do camarão, da lagosta ou do caranguejo ou dos

gládios e das plumas dos moluscos como as lulas, são as mais utilizadas nas pesquisas atualmente ^{26,27}.

A quitina, pode possuir diferentes estruturas e, por consequência, recebe diferentes nomenclaturas. Esta variabilidade está intimamente relacionada ao organismo do qual ela foi extraída. A quitina, portanto, possui três diferentes estruturas polimórficas (diferentes arranjos cristalinos no estado sólido) denominadas como: α -quitina, β -quitina e γ -quitina. A α -quitina, é extraída das estruturas rígidas e resistentes como a carapaça de crustáceos (camarões, lagostas ou caranguejos), as formas β -quitina e γ -quitina são encontradas nas estruturas flexíveis como nos gládios e plumas das lulas, embora nas lulas possam ser encontrados os três diferentes tipos de estruturas da quitina ^{26,27,28}.

As quitinas, se diferem pelas disposições de suas cadeias que ficam dispostas em camadas, chamadas de lamelas ou folhas, interferindo em sua cristalinidade. A α -quitina favorece as ligações inter e intra-cadeias com hidrogênio devido à disposição das lamelas de forma antiparalela que compõem as cadeias poliméricas. No caso a β -quitina, as lamelas que compõem a cadeia dispõem-se paralelamente, dificultando o estabelecimento de ligações hidrogênio e resultando em um material menos densamente empacotado. Na γ -quitina ocorre uma combinação dos arranjos das quitinas α e β , como pode ser visualizado na Figura 3 ^{26,27,28}.

Figura 3 - Estruturas polimórficas da quitina.

Fonte: Anitha et al., 2007.

A cristalinidade das diferentes quitinas (α -quitina, β -quitina e γ -quitina) podem ter variações de acordo com o método de extração e aos tratamentos subsequentes; no entanto a α -quitina mostra vários picos cristalinos, enquanto que a β -quitina, exibe apenas dois picos cristalinos e portanto possui uma estrutura menos ordenada do que

a da α -quitina. Dessa maneira, as quitinas podem apresentar cristalinidades diferentes, e as aplicações podem variar de acordo com a ação desejada ^{27,28}.

O polímero quitina é um material semicristalino, de baixa toxicidade, biocompatível e biodegradável. A quitina mais comercializada atualmente é a originária da carapaça de crustáceos, em que para sua extração, são feitas etapas de desmineralização, desproteínação e despigmentação, etapas essas são feitas devido ao fato de as cascas de crustáceos possuírem 15 a 20% de quitina, 25 a 40% de proteínas e de 40 a 55% de carbonato de cálcio ^{28,29}.

Após a extração, a quitina poderá dar origem à quitosana. Quando submetida ao processo de desacetilação, a quitina é adicionada em meio altamente alcalino aquoso no qual a concentração desta solução, o tempo e a temperatura de reação, variam de acordo com as propriedades que a quitosana deve adquirir para uma determinada aplicação. Os principais fatores que devem ser analisados para obtenção da quitosana a partir da quitina são: concentração da solução alcalina, temperatura de reação, tempo de reação, tamanho das partículas da quitina, atmosfera da reação e existência de impurezas ^{28,29,30}.

As condições utilizadas durante a reação de desacetilação heterogênea, da quitina influenciam na massa molar do polímero quitosana, e no seu grau de desacetilação (porcentagem de grupos amino livres existentes na estrutura após a retirada dos grupos acetil). Quando esse grau de desacetilação está acima de 50%, o polímero torna-se solúvel em soluções aquosas de ácidos fracos e passa a ser chamado de quitosana. A reação de desacetilação da quitina, pode ser vista na Figura 4 ^{30,31}.

Figura 4 - Reação de desacetilação da quitina.

Fonte: Anitha et al., 2014.

A massa molar média, o grau de desacetilação e a distribuição das unidades monoméricas da cadeia, afetam a solubilidade da quitosana. Assim, quanto maior a quantidade de grupos amino protonados em sua estrutura, maior será a repulsão eletrostática entre as cadeias, e desta forma maior será sua solubilidade. Os polimorfos (α -quitina, β -quitina e γ -quitina), que dão origem a quitosana, devido os diferentes arranjos sólidos, possuem diferentes solubilidades e diferentes capacidades de intumescimento ^{30,31}.

Devido à estrutura de a β -quitina ser um material menos densamente empacotado, permite-se uma maior acessibilidade aos sítios reativos quando comparados à da α -quitina, em que a acessibilidade das espécies ativas do hidróxido de sódio aos grupos acetamidas (sítios reativos onde estão os grupos acetil), é muito menor, dificultando o aumento do grau de desacetilação durante a reação. A cristalinidade da quitina interfere na acessibilidade aos sítios reativos, onde ocorre acesso mais fácil inicialmente nos domínios amorfos. Da parte externa dos domínios cristalinos para a parte do centro dos domínios cristalinos, vai aumentando a dificuldade para o acesso interferindo nos graus de desacetilação obtidos ^{30,31}.

Os processos para o aumento do grau de desacetilação da quitina geralmente são feitos em soluções aquosas altamente alcalinas (utilizando hidróxido de sódio ou hidróxido de potássio com água destilada), por longos períodos e com temperaturas elevadas, e em muitos casos, gerando despolimerização durante a reação. Para minimizar este efeito, pode-se utilizar uma atmosfera inerte durante a reação, sendo que muitas técnicas vêm sendo aprimoradas para que a despolimerização durante a reação possa ser evitada ^{30,31}.

2.4.2 Propriedades da quitosana e características de sua estrutura

A quitosana nos últimos trinta anos vem sendo utilizada tradicionalmente nos países orientais para o tratamento de reparação de tecidos. No Japão, já existem materiais comercialmente utilizados, com base principal em sua formulação, a quitosana, sendo empregado para uso no tratamento de lesões teciduais. A sua estrutura lhe permite aplicação no auxílio da cura em diversas enfermidades na área médica, devido a suas propriedades, tais como, biocompatibilidade, biodegradabilidade, capacidade bioadesiva, alta permeabilidade, ação na recuperação de lesões, ação na homeostasia, eficácia na redução do nível do

colesterol sanguíneo, estimula efeitos no sistema imunológico, ação analgésica, baixa toxicidade, além de ser bacteriostática e fungistática ^{32,33,34}.

Diante de propriedades da quitosana, este biomaterial vem sendo largamente utilizado na área médica e, em muitos casos em escala nanométrica, na forma de nanocascas para liberação de fármacos, encapsulando outros materiais, em suturas cirúrgicas, para reconstrução óssea, na regeneração de tecidos nervosos, como pele artificial entre outros. A grande variedade de aplicações da quitosana, se dá especialmente pela quantidade de grupos amino protonados em sua estrutura e pelas suas unidades monoméricas que a caracterizam como um glicosaminoglicano ^{33,34,35}.

A estrutura polissacarídea da quitosana é composta pelas unidades monoméricas 2-amino-2-desoxi-D-glicose e tipo β -(1 $\rightarrow$ 4)-2-acetamida- 2-desoxi-D-glicose ligadas pelas ligações glicosídicas do tipo β -(1 $\rightarrow$ 4),- como pode ser verificado na Figura 5. Este polímero natural possui uma estrutura semicristalina, sendo insolúvel em meio aquoso e na maioria dos solventes orgânicos mas, podendo alterar sua solubilidade de acordo com a quantidade de grupos amino em sua estrutura ^{34,35}.

Figura 5 - Estrutura da quitosana.

Fonte: Campana et al., 2007.

2.4.2.1 Ação antimicrobiana

A quitosana é um biomaterial que possui ação bacteriostática e fungistática. Estudos têm mostrado que a carga superficial da quitosana, tem grande importância em sua atividade antimicrobiana. As cargas se tornam positivas, quando em contato com fluidos fisiológicos, contribuindo para que estes grupos amino protonados da

quitosana possam se ligar aos grupos aniônicos das paredes celulares de micro-organismos inibindo seu crescimento ^{36,37}.

Apesar de possuir atividade antimicrobiana para uma ampla quantidade de bactérias e fungos, a quitosana, exibe uma eficiência inibitória diferente contra determinados fungos, bactérias gram-positivas e gram-negativas. A quitosana exerce um efeito antifúngico por supressão da esporulação e germinação de esporos. Que difere, em relação sua ação bacteriostática, em bactérias gram-positivas e bactérias gram-negativas, devido à superfície celular possuir diferentes características ^{36,37,38}.

De acordo com estudos anteriores, a atividade antibacteriana mais forte foi aparentemente contra bactérias gram-negativas, no entanto, muitos pesquisadores, que analisaram a ação da quitosana contra bactérias, demonstraram que não houve diferenças significativas entre as diferentes bactérias mencionadas. Sabendo que as atividades antifúngicas ou bacteriostáticas da quitosana podem ser influenciadas de acordo com o pH do meio, com a tendência de maior ação, em valores de pH mais baixos ^{37,38}.

As propriedades antimicrobianas são intensificadas quando a quitosana encontra-se na forma de nanopartículas, microesferas ou nanocascas, isso ocorre devido ao aumento da área superficial. O aumento da superfície de contato da quitosana gera um aumento da quantidade dos grupos amino protonados na sua superfície, que intensificam sua ação bacteriostática, facilitando a interação com as cargas positivas dos grupos amino com as cargas negativas da parede celular de microorganismos, inibindo seu crescimento ^{38,39,40}.

2.4.2.2 Ação nas três fases de cicatrização de lesões teciduais

A quitosana é um polissacarídeo com estrutura similar a glicosaminoglicanos, que são encontrados na matriz extracelular do tecido conjuntivo como o ácido hialurônico (polissacarídeo em forma de gel que auxilia na nutrição e locomoção das células mesenquimais). A quitosana, quando se hidrolisa, dissocia-se em monômeros que são as unidades de açúcares necessárias para biossíntese do ácido hialurônico ^{39,40,41}.

Desta forma, a quitosana tem papel importante na restauração do tecido, no que se refere na reconstrução da matriz extracelular, que é danificada após uma queimadura. Nesta matriz estão os fibroblastos, que são as principais células

mesenquimais do tecido conjuntivo, responsáveis pela produção e manutenção desta matriz. A similaridade das estruturas da quitosana e do ácido hialurônico podem ser visualizadas na Figura 6 ^{42,43,44}.

Figura 6 - Comparação entre ácido hialurônico e quitosana.

Fonte: Kong et al., 2010.

O ácido hialurônico, é encontrado em grande quantidade na pele, em especial na fase jovem das pessoas. Com o avanço da idade este ácido vai diminuindo sua quantidade e afeta de forma significativa a elasticidade da pele. Desta forma, é muito utilizado na área médica, sendo capaz de promover a restauração de tecidos lesionados por feridas e ou por queimaduras de espessura parcial, pois ele age como um lubrificante proporcionando um meio de proteção para as células. A consistência de gel do ácido hialurônico, facilita a união e o transporte das células mesenquimais ^{42,43,44}.

A quitosana possui uma estrutura capaz de favorecer o crescimento celular, a adesão das células e a proliferação, facilitando a organização dos tecidos e o fornecimento de proteínas para tratamento de lesões devido sua estrutura. Além de ação antimicrobiótica por seus grupos amino protonados, a quitosana tem ação analgésica absorvendo os fluidos provenientes da ferida e, portanto sendo capaz de

bloquear terminações nervosas, reduzindo a dor, esta ação tópica, é decorrente da captura de hidrogênios ácidos liberados no local da inflamação pela ionização do grupo amínico ^{42,43,44}.

O processo de cicatrização da pele em feridas, e também em queimaduras, se divide em três fases principais: fase inflamatória, fase proliferativa e fase reparadora ou de remodelação. A restauração da pele, necessita de um processo dinâmico o qual envolve processos celulares, moleculares, fisiológicos e biológicos. Os biopolímeros mais utilizados hoje na reparação ou regeneração de tecidos são: os alginatos, a quitosana, o ácido hialurônico, o colágeno e a elastina, onde estes três últimos são sintetizados pelos fibroblastos ^{42,43,44}.

A fase inflamatória, ocorre logo após a lesão, nesta fase as plaquetas formam uma rede de fibrina, agindo como uma rede de proteção contra microrganismos indesejáveis, e nesta fase ocorre também o surgimento de células importantes para remoção de tecidos desvitalizados, as principais células envolvidas nesta etapa são: macrófagos, neutrófilos e linfócitos. Os macrófagos são células importantes para proteção contra agentes infecciosos, e de acordo com estudos anteriores a quitosana é capaz de ativar os macrófagos. Muitas vezes as infecções, comuns em pacientes que sofrem queimaduras, tendem a ocorrer e agravar o quadro do paciente ^{42, 43,44}.

Na fase proliferativa, ocorre a formação do tecido de granulação, ela é dividida em três subfases: reepitalização, fibroplasia e angiogenese. A subfase envolvendo a reepitalização, em que ocorre a movimentação dos queratinócitos. A subfase onde ocorre a fibroplasia iniciando a proliferação dos fibroblastos que sintetizam colágeno e elastina. E a subfase que ocorre paralela a fibroplasia chamada de angiogenese, onde novos vasos darão suporte a formação da nova matriz extracélular. Nesta etapa ocorre a contração da ferida. A quitosana possui a capacidade de agir nesta etapa, pois em contato em meio biológico ela se quebra em monômeros que são biossintetizados formando glicosaminoglicanos importantes na formação da nova matriz extracélular ^{43,44}.

A fase de remodelação do tecido, ocorre substituição de tipos de colágenos gerados pelos fibroblastos, formando as fibras reticulares necessárias para uma recuperação tecidual que se assemelhe o mais próximo de um tecido normal não danificado. De acordo com estudos anteriores, a quitosana também auxilia da fase final de reparação, pois intensifica a ação das células já mencionadas nas etapas

anteriores como: os leucócitos, os macrófagos e os fibroblastos, auxiliando de forma significativa na ação destas células durante a reparação das lesões. ^{45,46,47}.

2.4.3 Nanopartículas de quitosana

A preparação de nanoesferas, é uma estratégia para incrementar a capacidade de adsorção da quitosana, em que a adsorção é a capacidade de adesão de moléculas de um fluido a uma superfície sólida, uma vez que nesta escala, possuem uma área superficial cerca de 1000 vezes maior do que a quitosana em flocos. Além disso, as nanoesferas apresentam cinéticas de adsorção mais rápidas e maior facilidade de manuseio e operação ^{48,49}.

Muitas pesquisas na área médica, foram feitas trabalhando com quitosana na forma de nanopartículas pois, além de aumentar sua ação antimicrobiana, de intensificar sua capacidade de auxiliar a cicatrização de lesões, a grande quantidade de cargas positivas em sua superfície favorece sua capacidade de se ligar a íons metálicos, entre os quais o zinco, que é de extrema importância na restauração de tecidos ^{49,50,51}.

Como mencionado anteriormente no parágrafo logo acima, o alto teor de grupos amino protonados (cargas positivas) na quitosana intensifica sua capacidade de se ligar a íons metálicos. No entanto esta capacidade de se ligar a íons metálicos, esta intimamente relacionada ao pH do meio. Essas ligações podem ser favorecidas com o aumento do pH, onde ocorre à neutralização dos grupos amino protonados favorecendo ligações com metais como: urânio, cobre chumbo ou zinco. Lembrando que o zinco é um elemento com intensa ação antimicrobiana e auxilia no processo de reparação de feridas e queimaduras ^{52,53}.

2.5 NANOTECNOLOGIA

A nanotecnologia, é um campo da ciência que envolve a obtenção de estruturas em escala molecular e a manipulação de materiais em uma escala atômica, podendo ser definida como o estudo e uso de estruturas com tamanho entre 1 e 100 nanômetros, sendo que, um nanômetro é definido como 10^{-9} m. As pesquisas envolvendo escalas “nano” envolve conhecimentos, conceitos e ferramentas da biotecnologia, engenharias, química, medicina, ciência dos materiais e biologia. Este

estudo permite um aprofundamento do estudo da matéria em toda sua complexidade^{54,55,56}.

Os materiais em proporção de nanopartículas devem possuir estabilidade da molécula, manutenção de sua atividade biológica, solubilidade desejável de acordo com sua aplicação, mantendo sua composição química, e podendo alterar propriedades mecânicas, óticas e eletrônicas ou acentuar propriedades já existentes. O físico americano Richard Feynman foi quem sugeriu a manipulação dos átomos para construção de produtos com propriedades únicas dando início à nanotecnologia^{54,55,56}.

Entre os principais motivos para o rápido desenvolvimento na utilização de nanomateriais e grande número de estudos neste campo nos dias atuais, é devido a diversidade de aplicações que podem ser feitas nesta escala, tendo a grande vantagem de não alterar a composição química do material que foi modificado para uma escala nanométrica. Em muitas situações, os materiais na forma de nanopartículas ficam com suas propriedades intensificadas como o caso da quitosana, um biomaterial que quando utilizado na forma de nanopartículas, possui sua propriedade bacteriostática mais efetiva^{56,57,58}.

Desta forma, a nanotecnologia vem sendo explorada e aplicada nas mais diversas áreas da ciência, uma vez que surgem novas possibilidades de aplicações. Em aplicações médicas e farmacêuticas, a faixa utilizada é geralmente de 5 – 1000 nm. Lembrando que uma partícula é considerada nanométrica quando apresenta um tamanho inferior a 100 nm. Desta forma na área médica as partículas muitas vezes são utilizadas na forma de microesferas^{56,57,58}.

Os materiais, quando manipulados em escala nanométrica, podem ter algumas de suas características iniciais alteradas, estas mudanças ocorrem devido os métodos empregados para modificação em uma escala nanométrica, podendo ocorrer efeitos como: fricção, combustão, alterações eletrostáticas, movimentos brownianos pelo uso de ultrassom, entre outros. Os materiais quando trabalhados em escala nanométrica tem sua área superficial muito maior e possivelmente melhorando sua interação com outras moléculas^{56,57,58}.

A mudança das propriedades de materiais em escala nanométrica ocorre muitas vezes pela fração de átomos de superfície. Na superfície de nanopartículas existe um número menor de átomos vizinhos coordenados, por consequência, esses átomos vizinhos tem um número menor de coordenação sendo menos estáveis

termodinamicamente, mas com mais energia, e desta forma favorecendo as ligações com outras substâncias ^{56,57,58}.

As nanopartículas são instáveis termodinamicamente por apresentarem alta área superficial. Para diminuir esta instabilidade elas tendem a agregar, para evitar que ocorra aglomeração é necessário o uso de um agente estabilizante que não altere suas propriedades ou pelo método de ultrassom ^{57, 58,59}.

Para intensificar ou alterar as propriedades de biomateriais nanoestruturados, deve-se ter conhecimento das possíveis aplicações e dos métodos de síntese. Estes materiais precisam apresentar pelo menos uma dimensão em escala nanométrica, sendo que as nanopartículas podem ser obtidas na forma de nanobastões, nanofios, nanotubos, filmes finos, supercristais, nanocápsulas, nanocascas ou nanoesferas ^{56,57,58}.

Existe uma diversidade de técnicas para a fabricação de nanomateriais os quais podem ser divididos em dois tipos: os métodos físicos e químicos. Os métodos físicos consistem da obtenção das nanoestruturas partindo-se do material em escala maior, sendo que este é manipulado até que se atinja a escala de tamanho desejada como o método de eletrofiação ou por ultrassom. Nos métodos químicos, os materiais são crescidos átomo a átomo, molécula a molécula e a reação é interrompida quando se atinge o tamanho desejado, como exemplo a química de coloides é a mais utilizada nos dias de hoje na obtenção de nanomateriais ⁵⁹.

A nanobiotecnologia é um ramo que envolve conhecimentos da nanotecnologia e da biotecnologia, que poderá suprir as demandas de produtos em diferentes áreas, como biomateriais usados no transporte de fármacos em escala molecular, montagem molecular modelada nos ribossomos, sistemas de detecção de biomarcadores, transporte de medicamentos, nanossensores, biochips e biopolímeros que auxiliam na restauração de lesões ⁵⁹

As nanopartículas poliméricas muito utilizadas na nanobiotecnologia, podem ser definidas como partícula sólidas preparadas a partir macromoléculas de uma escala de até 10000 nm. As macromoléculas são divididas em nanocápsulas e nanoesferas, as quais se diferem entre si segundo a composição e organização estrutural ⁵⁹.

Os biopolímeros como as proteínas, lipídeos, polissacarídeos e os poliésteres alifáticos têm sido aplicados na área médica para uso em diferentes aplicações. Entre as várias aplicações dos biomateriais, destaca-se sem o uso na escala manométrica

na engenharia de tecidos, pois muitos desses polímeros são biorreabsorvíveis; e, após serem implantados no organismo para uma determinada finalidade, são absorvidos pelo mesmo sem causar efeitos colaterais no paciente ^{59,60}.

A quitosana, assim como outros materiais, quando modificada para escala nanométrica podem alterar suas propriedades, este polissacarídeo é bacteriostático, fungistático, estimula o sistema imunológico do corpo e tem a capacidade de auxiliar e acelerar o processo de reparação de tecidos lesionados, todas estas características já mencionadas ficam intensificadas quando a quitosana está em escala nanométrica ^{60,61}.

Devido a suas propriedades, a quitosana vem sendo largamente pesquisada na área médica na forma de nanopartículas. Existem diversos mecanismos para obtenção de quitosana na forma de nanopartículas, no entanto o método por geleificação iônica é o mais utilizado nos estudos atuais, pois os grupos amino protonado podem se ligar com os ânions de tripolifosfatos dando origem as nanopartículas. Outro método que esta sendo utilizado é por efeito por ultrassom com alta energia ⁶¹.

A quitosana possui em sua estrutura uma grande quantidade de grupos amino, e desta forma grande teor de nitrogênio, que facilita sua ligação com metais. A formação de complexos entre a quitosana e metais pode ser compreendida pela relação ácido-base de Lewis, em que a quitosana se comporta como uma base, formando ligações covalentes com os íons metálicos, os quais atuam como ácidos, recebendo um par de elétrons do polissacarídeo. A quitosana desta forma se liga a metais como urânio, cobre, chumbo ou zinco ^{61,62,63}.

A adsorção de íons metálicos na quitosana é mais fortemente manifestada em pH mais elevado, pois nestas condições a quitosana não se encontra prótonada. Alguns estudos foram feitos para explicar o mecanismo de coordenação da quitosana com íons metálicos. A formação do complexo de metais com quitosana depende também do pH do meio. A capacidade da quitosana de se ligar a metais tem despertado o interesse de muitos pesquisadores para seu potencial uso na área médica ^{61,62,63}.

A quitosana tem vantagem sobre as outras nanopartículas em desenvolvimento devido à sua capacidade de controlar a liberação de agentes ativos e evitar o uso de solventes perigosos durante a preparação das nanopartículas, em virtude de sua solubilidade em solução ácida aquosa ⁶³. A quitosana na forma de nanopartícula já foi

associada ao metal zinco, pois este metal é bacteriostático e essencial no processo de reparação da pele, pois estabiliza a membrana celular e age nas etapas de cicatrização como nas fases proliferativa e de remodelação ^{63,64}.

Geralmente as nanopartículas de quitosana obtidas, independentemente do método adotado, apresentam variação dos tamanhos obtidos apresentando uma distribuição heterogênea, e o índice de polidispersão pode variar muito de acordo com o método adotado. Os métodos mais utilizados para a determinação da distribuição de tamanho das nanopartículas consistem em microscopia eletrônica de varredura, microscopia eletrônica de transmissão, ou pelo equipamento Zetasizer, que permite verificar a carga do material, seu diâmetro hidrodinâmico e seu índice de polidispersão ^{64,65}.

2.6 SISTEMA TEGUMENTAR

Os tecidos do corpo humano, são divididos em tecidos epiteliais, conjuntivos, musculares e nervosos. O tecido epitelial não possui vascularização e sua nutrição é feita por difusão por meio dos vasos sanguíneos do tecido conjuntivo, onde a membrana basal seleciona o que deve ser transportado para o epitélio. O tecido conjuntivo é formado em especial por células mesenquimais e uma matriz extracelular rica, isto é abundante ^{66,67}.

O tecido conjuntivo é ricamente vascularizado e é responsável pela homeostase do corpo, possui os fibroblastos que são células encarregadas de produzir a matriz extracelular. Esta matriz é o meio no qual as células do tecido conjuntivo estão dispostas e lhes proporciona nutrição e substrato para sua organização ^{66,67,68}.

Este tecido possui também outras células de extrema importância como os macrófagos, os mastócitos e os plasmócitos. Além das células a sua matriz extracelular, é constituída por um fluido aquoso formado de glicosaminoglicanos, proteoglicanos e glicoproteínas, além das fibras colágenas, das fibras reticulares e das fibras elásticas (fibrilina e elastina) ^{68,69,70}.

O tecido epitelial do nosso corpo tem um papel de extrema importância na termorregulação e nos protege contra atrito, perda de água, invasão de micro-organismos e a incidência dos raios ultravioleta ^{68,69,70}. As camadas de nossa pele

são classificadas de acordo com a forma das células, a localização, a distribuição e a quantidade como mostrado na Figura 7.

Figura 7 - Tecido epitelial.

Fonte: Junqueira e Carneiro, 2007

A epiderme, que é o tecido epitelial estratificado pavimentoso é queratinizado e possui uma espessura entre 1 a 2mm na maior parte do corpo, diferenciando-se somente em relação as palmas das mãos e as plantas dos pés tendo espessura com cerca de 5 mm. Ela possui quatro camadas principais: o estrato basal, o estrato espinhoso, o estrato granuloso e o estrato córneo. Nestas camadas, são encontradas as células tronco, os queratinócitos, os melanócitos, as células de Merkel, células eosinófilas, as células de Langerhans entre outras, cada uma desempenhando um papel de extrema importância na estrutura da epiderme ^{69,70}.

A derme, que também é chamada de tecido conjuntivo, tem como função principal de unir outros tecidos; é subdividida em tecido conjuntivo frouxo e tecido conjuntivo denso. Ela é altamente vascularizada possuindo em sua estrutura os vasos sanguíneos e linfáticos, os nervos e as terminações de neurônios sensoriais. O tecido conjuntivo, como mencionado anteriormente, é formado por células alongadas do mesênquima embrionário e pela matriz extracelular. As células mais importantes do

tecido conjuntivo, formadas pelo mesênquima embrionário são: os fibroblastos, os macrófagos, os mastócitos e os plasmócitos ^{70,71}.

Os fibroblastos são células que estão em crescimento ativo e são responsáveis pela sintetização da matriz extracélular (meio onde as células estão dispostas proporcionando condições para suas atuação e organização). Eles também sintetizam as proteínas como o colágeno e elastina, os glicosaminoglicanos e glicoproteínas multiadesivas. Os macrófagos protegem o tecido de agentes infecciosos. Os mastócitos agem na proteção de reações alérgicas. Os plasmócitos são importantes nos processos imunológicos produzindo os anticorpos ^{70,71}.

2.6.1 Fibroblastos

As células mesenquimais são capazes de se transformar em fibroblastos. Estes têm a função de síntese de componentes fibrilares como o colágeno e a elastina, e não fibrilares como as glicoproteínas e os glicosaminoglicanos (ácido hialurônico) da matriz extracélular do tecido conjuntivo. Os fibroblastos possuem retículo endoplasmático rugoso e o complexo de Golgi bem desenvolvidos, pois sintetizam os componentes da matriz extracélular: as fibras colágenas, as fibras reticulares, as fibras elásticas e a substância fundamental para remodelação tecidual ⁷².

Quando localizados na derme reticular, apresentam-se em tramas paralelas à superfície e possuem formas estreladas mantendo íntima relação com as células vizinhas, conferindo-lhes resistência as forças mecânicas que atuam sobre a pele, enquanto quando em menor atividade, ficam com aspecto de filamento e recebe o nome de fibrócito.

Durante o processo de recuperação de lesões, os fibroblastos migram para as áreas afetadas auxiliando na produção de matriz celular e cicatrização da lesão, em algumas situações os fibroblastos podem sofrer uma desregulação na atividade de síntese de matriz extracélular e aumentar a produção principalmente de colágeno, acarretando na deformação dos órgãos afetados, a este processo dá-se o nome de fibrose. Na Figura 8 esta representada a estrutura do fibroblasto e suas organelas, e a representação do fibroblasto ativo e inativo (fibrócito) ⁷³.

Figura 8 - Fibroblasto.

Fonte: Junqueira e Carneiro , 2007

2.7 QUEIMADURAS

Estima-se que atualmente no Brasil ocorram cerca de 1000000 de casos de queimaduras por ano, de acordo com dados fornecidos pela Sociedade Brasileira de Queimaduras (SBQ), e esta enfermidade contribui para quase 60% do total de mortalidade entre crianças e adolescentes de até 19 anos. Deste um milhão de casos, 2500 irão a óbito em decorrência da gravidade destas lesões.

Queimaduras são lesões na pele provocadas geralmente pelo calor excessivo, mas também podem ser causadas pelo frio excessivo, pela eletricidade, por contato com produtos químicos corrosivos e por radiações. As lesões podem atingir as camadas da pele parcialmente ou totalmente, podendo chegar a atingir músculos e ossos. A gravidade das queimaduras pode ser intensificada pelos fatores como: idade do paciente, duração e intensidade da exposição ao agente agressor, profundidade e extensão da área que foi atingida. ^{74,75}.

As queimaduras podem acarretar deformidades graves, deficiências limitantes e sérios problemas psicológicos ao paciente. No tratamento, inicial da queimadura, podem ocorrer falhas, geralmente no estágio inicial do tratamento, estas falhas são

ocasionadas por infecções ou falta de controle na hidratação do paciente, levando à diminuição dos elementos celulares e alterações na síntese de colágeno durante as fases de cicatrização, podendo provocar sequelas funcionais ou até mesmo levar o paciente a óbito ⁷⁶.

Para se identificar a classificação das queimaduras, são feitas duas considerações: a profundidade e a extensão da lesão. Quanto à profundidade queimadura se divide em graus onde atingi camadas da epiderme, da derme e da hipoderme, como pode ser verificado na Figura 9. Na identificação das queimaduras os pacientes passam por uma avaliação inicial e após cerca de quarenta e oito horas são reavaliados para uma precisão da gravidade da queimadura proporcionando adEquação para o tratamento ⁷⁷.

Figura 9 – Profundidade das queimaduras.

Fonte: Junqueira e Carneiro, 2007.

As queimaduras de primeiro grau, ocorrem na camada mais externa da pele, a epiderme, e o tempo de cicatrização varia de cinco a sete dias. Clinicamente a lesão é hiperemiada, úmida, com edema e muito dolorida. As queimaduras de segundo grau superficial costumam cicatrizar entre duas a três semanas, passam a epiderme e atingem uma porção da derme mantendo grande quantidade de folículos pilosos e glândulas sudoríparas, caracterizando-se pelo surgimento de bolhas, eritemas e dor aguda. Nas queimaduras de segundo grau profundas a reparação ocorre no tempo médio de cinco semanas, atingindo a derme totalmente, apresentando coloração pálida e muita dor ^{78,79}.

Ao atingir tecidos subcutâneos, dentre eles músculos, e até osso, essa lesão é mais grave, e considerada queimadura de terceiro grau. Do ponto de vista médico tem aspecto esbranquiçado e tende a perda significativa de elasticidade, onde o tempo de tratamento, varia muito para cada paciente, essa queimadura tem aspecto esbranquiçado e necessita de enxertia^{78,79}. As reparações das queimaduras graves implicam não somente em cirurgias de enxertia de pele precoces, mas também em controlar e orientar a regeneração ou restauração cicatricial, que tende a ocorrer de forma anárquica e com potencial de sequelas e infecções.

2.7.1 Processo de cicatrização da pele

O processo de cicatrização da pele, após uma queimadura que afeta sua integridade além da derme, se divide em três fases principais: fase inflamatória, fase proliferativa e fase reparadora ou de remodelação. A restauração da pele necessita da interação de células estromais e circulatórias, fragmentos de célula, matriz celular, alterações físico-químicas e ação de micro-organismos sendo portanto um processo dinâmico envolvendo processos celulares, moleculares, fisiológicos e biológicos^{80,81}.

A fase inflamatória, tem início logo após a lesão podendo durar até cinco dias, ocorrendo a agregação das plaquetas, e formação da rede de fibrina, formando um coagulo sobre a lesão, formando um trombo rico em plaquetas infiltrado rapidamente pela fibrina. Ao mesmo tempo ocorre a migração de linfócitos, neutrófilos e os macrófagos sobre a rede da fibrina com o objetivo de remover tecidos desvitalizados. Esta etapa é de fundamental importância para o processo de cura, envolvendo sinais inflamatórios como dor, aumento do fluxo sanguíneo e edema^{81,82}.

A fase proliferativa pode durar até três semanas, é responsável pela formação do tecido de granulação, divide-se em três fases: reepitelização, fibroplasia e angiogênese. Na reepitelização ocorre a migração de queratinócitos das bordas e anexos remanescentes, na fibroplasia ocorre a proliferação de fibroblastos e produção de colágeno, elastina e outras proteínas; na angiogênese ocorre ao mesmo tempo em que a fibroplasia, nesta fase a vascularização é refeita possibilitando o fluxo de nutrientes, desenvolvendo o tecido de granulação e novos vasos capilares que dará suporte à formação de uma nova matriz extracelular^{82,83}.

A fase de remodelação, também chamada de fase de maturação, se inicia na terceira semana e pode durar até dois anos. Nela ocorre a substituição do tipo de

colágeno tipo 3 para o tipo 2. O colágeno tipo 2 aparece na cartilagem, e o colágeno tipo 3 constitui as fibras reticulares de muitos órgãos como: fígado, útero, coração, pulmões, músculos, entre outros ^{82,83,84}.

2.8 ENGENHARIA DE TECIDOS

A engenharia de tecidos é um campo interdisciplinar que envolve conhecimentos na área da engenharia, ciência dos materiais e das ciências da saúde, tendo como objetivo criar, reparar, ou substituir tecidos e órgãos lesionados. Com isso, é fundamental o uso de três ferramentas básicas: biomateriais, células e fatores de crescimento ⁸⁵.

As células são responsáveis pela secreção da matriz para formação de um novo tecido, enquanto que o biomaterial tem função de fornecer suporte e ambiente adequado para as células. Já as moléculas biologicamente ativas podem ser adicionadas ao conjunto a fim de auxiliar e estimular as células na reparação tecidual ⁸⁵. O biomaterial utilizado deve ser submetido ao processo de eletrofiação para formar fibras que possam mimetizar fisicamente, a matriz tridimensional, proporcionando um ambiente favorável ao desenvolvimento celular. As células que serão semeadas, nesta matriz tridimensional, devem ocupar uniformemente toda a unidade para proporcionar a completa formação do tecido ^{85,86,87}.

O campo interdisciplinar da engenharia de tecidos envolve a reparação ou regeneração de órgãos ou tecidos vivos, pelo recrutamento dos tecidos do próprio paciente. As células extraídas do paciente, são cultivadas sobre suportes tridimensionais feitos de materiais sintéticos ou naturais, para sua completa adesão e proliferação, para que com segurança, sejam reeinseridas no paciente. As etapas que envolvem a engenharia de tecido são sequencialmente: extrair as células do paciente, criar um meio fisiológico para seu crescimento, inseri-las na rede tridimensional, verificar sua proliferação e adesão e para por fim fazer testes em animais com maior similaridade com o tecido humano. Esta sequência de etapas está ilustrada na Figura 10 ^{88,89}.

Figura 10 - Etapas da Engenharia de Tecidos.

Fonte: Barbanti et al., 2005.

Os polímeros biorreabsorvíveis, são muito utilizados no campo da engenharia de tecidos nos dias de hoje, pois possuem características como biocompatibilidade e bioabsorção quando aplicados em sistemas biológicos. Estes materiais biodegradáveis, podem se dissolver em fluidos corpóreos e geralmente eles são degradados por hidrólise ^{89,90}.

Os materiais poliméricos para aplicações biomédicas são capazes de substituir e permitir o crescimento e regeneração dos tecidos do corpo, de modo permanente, sem efeitos tóxicos. Em aplicações específicas, estes materiais são desenvolvidos para manter um equilíbrio entre as propriedades biomecânicas dos tecidos substituídos e os efeitos bioquímicos e biológicos da interação entre o material e o tecido reparado ^{89,90}.

2.9 CINÉTICA DAS REAÇÕES

A cinética química, assim como também o projeto de reatores, é a chave para a produção de todos os produtos químicos em escala industrial. A cinética das reações é uma medida da rapidez com que são consumidos os reagentes e são formados os produtos da reação. Esta rapidez depende não só da natureza das substâncias envolvidas na reação, mas também das condições em que as reações ocorrem, para tal, exige-se um estudo profundo das variáveis que influenciam nesta velocidade ^{91,92}.

Durante a reação química estudada, é necessário analisar as espécies químicas que entram no sistema e as que saem. Este sistema é chamado de contábil e é feito pelos balanços molares globais das espécies químicas individuais envolvidas na reação. A espécie química é determinada pelo tipo, número e configuração dos átomos da espécie ^{93,94,95}.

A reação química envolvida em um fenômeno, é compreendida através de sua cinética, em que um número predeterminado de moléculas iniciais perdem sua identidade mudando o tipo ou número de átomos. Existem três formas que esta reação pode ocorrer: por decomposição, por combinação ou por isomerização, no entanto, muitos fatores podem influenciá-la ^{96,97}.

A velocidade na qual uma dada reação química ocorre pode ser calculada pela velocidade de desaparecimento de reagentes ou pela velocidade de formação dos produtos. A representação para velocidade de formação pode ser dada por número de mols por unidade de tempo ou por unidade de massa por unidade de tempo ou por número de mols de uma espécie gerado por unidade de volume por unidade de tempo ⁹⁷.

As reações ocorrem dentro de reatores, sendo os principais são: de batelada (onde não ocorre entrada nem saída de reagentes, chamado de mistura perfeita); reator tanque agitado contínuo (operando continuamente em relação à entrada e saída de reagentes em regime estacionário); reator tubular (operando em fluxo contínuo e tubular, de leito recheado ou fluidizado envolvendo reações heterogêneas) ^{97,98}.

Desta forma, a cinética das reações analisa e caracteriza a velocidade da reação, com todas as variáveis que possam influenciar a reação estudada, e identifica qual delas é a mais relevante. Onde a natureza da reação pode ser homogênea, existe somente uma fase na reação ou heterogênea, existindo mais de uma fase ⁹⁸.

No caso de reações homogêneas, fatores como temperatura, pressão e a composição podem influenciar na velocidade com que ocorre a reação, enquanto para reações heterogêneas, além destes fatores mencionados para reações homogêneas, podem ser influenciadas por fenômenos de transporte como massa e calor ⁹⁸.

2.10 MODELAGEM MATEMATICA

A modelagem matemática envolve o estudo para descrever por meio de cálculos matemáticos, um fenômeno seja ele físico, químico ou biológico. Para o progresso, viabilizando produções em escala industrial, todo modelo conceitual deve possuir uma representação matemática. Para isso ele deve representar, sem muita complexidade de equações, o mais próximo do que ocorre na realidade. Para se ter um modelo cinético que represente uma reação, é necessário conhecimento aprofundando dos fenômenos envolvidos e da intensidade da influência destes ^{99,100,101}.

2.10.1 Modelo do núcleo não reagido

O modelo do núcleo não reagido foi desenvolvido pela primeira vez por Yagi e Kunii entre os anos de 1955 e 1961. Este modelo parte do princípio de que a reação se inicia na parte externa do sólido e vai-se movendo até o centro, podendo deixar uma camada para trás de material totalmente convertido e material inerte ^{102,103,104}.

Este modelo é usado para partículas esféricas de tamanho constante e para partículas esféricas que diminuem de tamanho. Para as partículas esféricas de tamanho constante em uma reação heterogênea (fluido e sólido) ocorrem três fenômenos principais durante a reação, que são as etapas controladoras da reação (etapas lentas), sendo portanto os fenômenos envolvidos: ^{105,106}:

controle pela reação química, que ocorre na interface entre o sólido não reagido e a camada de produto reagido, seguindo a Equação 1:

$$kt = 1 - (1 - X_B)^{1/3} \quad \text{Equação (1)}$$

controle pela difusão na camada reagida, nesta etapa ocorre o processo de difusão do fluido reagente através da camada já reagida, que circunda a partícula sólida de acordo com a Equação 2:

$$kt = 1 - 3(1 - X_B)^{\frac{2}{3}} + 2(1 - X_B) \quad \text{Equação (2)}$$

controle pelo transporte de massa externo, de acordo com a Equação 3:

$$kt = X_B \quad \text{Equação (3)}$$

O modelo matemático representativo que envolve as três equações seguem de acordo com, X_B sendo a fração reagida do sólido, k a constante cinética e t o tempo de reação.

É importante ressaltar, como mencionado nos tópicos de cinética das reações e modelagem matemática, muitos fatores podem influenciar na determinação de quais reações são as controladoras (reações mais lentas). No caso das reações heterogêneas, os possíveis determinantes para a fase controladora, dentre eles estão: a temperatura, a pressão, a porosidade do material, a estrutura do material, os diferentes arranjos no estado sólido, a área exposta, a formação de camada de material reagido que dificulta acesso aos sítios reativos pelas espécies ativas, entre outros fatores ^{105,106,107}.

2.11 PLANEJAMENTO DE EXPERIMENTOS COM VÁRIOS FATORES

Um planejamento fatorial é uma ferramenta estatística de extrema importância para engenheiros e cientistas que pretendam melhorar o desempenho de um processo ou compreender, de forma rápida e eficiente, novos processos e o desenvolvimento de novos produtos. Quando queremos analisar vários fatores envolvidos em um processo, o planejamento fatorial permite analisar todas as combinações possíveis dos níveis e fatores envolvidos. Esta técnica permite, direcionar a pesquisa, indicar o tamanho da amostra a ser selecionada, fazer múltiplas comparações e, desta forma, analisar o experimento em relação as interações dos fatores, otimizando o tempo para análise de resposta de experimentos. O tipo mais simples de planejamento fatorial é planejamento com dois níveis, que permite analisar diversos fatores representados pela letra k , sendo portanto o fatorial de dois níveis representado por 2^k . Este modelo é especialmente útil na etapa exploratória de uma pesquisa, permitindo estudar fatores qualitativos ou quantitativos ^{108,109}.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo, consta a metodologia para obtenção de nanopartículas de quitosana com alto grau de desacetilação para intensificar as propriedades já existentes neste biopolímero, possibilitando seu uso futuro no auxílio das etapas de cicatrização de queimaduras graves (de segundo grau profundas ou de terceiro grau). O estudo, durante a reação da desacetilação da quitosana, permitiu uma análise da cinética da reação verificando de acordo com os graus de desacetilação obtidos ao longo do tempo a modelagem matemática mais próxima da resposta real do experimento.

A quitosana, obtida pela Sigma-Aldrich® com alta massa molar (310000 - 375000 Da), originária da carapaça de crustáceos e com grau de pureza de 99%, de acordo com as informações fornecidas pela empresa Sigma-Aldrich® ®, tendo portanto, uma estrutura de cadeias antiparalelas conforme o material α -quitina, seu grau de desacetilação (GD) de acordo com os dados de sua ficha técnica, era de 75%, e esta na forma de flocos com coloração amarelo claro. Para obtenção do aumento do grau de desacetilação, a quitosana foi submetida a reação em meio altamente alcalino com hidróxido de sódio com 98% de pureza na forma de pélets, fornecido também pela empresa Sigma-Aldrich®.

As reações de desacetilação da quitosana, foram feitas com o auxílio da ferramenta estatística experimental completo de dois níveis 2^3 , em que foram verificados os efeitos e as interações dos três fatores: concentração de NaOH, o tempo e temperatura. As análises para verificação dos graus de desacetilação obtidos foram feitos através de seus espectros obtidos por análise de espectroscopia na região do infravermelho (FTIR),

Após a obtenção da quitosana com maior grau de desacetilação, um novo experimental completo 2^2 com três repetições no ponto central foi feito retirando 11 alíquotas no decorrer de seis horas de reação, variando a temperatura e a concentração de NaOH, para verificar o aumento do grau de desacetilação com o tempo, permitindo assim uma análise da cinética da reação heterogênea de desacetilação.

Para a definição da modelagem matemática, foi necessário um estudo dos fatores envolvidos durante a reação heterogênea da desacetilação da quitosana como: concentração de reagentes, porosidade do material, cristalinidade do material,

acessibilidade aos sítios reativos, fenômeno difusivo, transferência de massa e a reação na interface entre o líquido que circunda o material. O modelo cinético definido foi adaptado para que se aproximasse do comportamento real para uma reação envolvendo a solução de hidróxido de sódio e as partículas porosas da quitosana.

Após a verificação dos graus de desacetilação obtidos, as amostras com maior grau de desacetilação foram modificadas da forma de flocos finos para nanopartículas, pelo método de ultrassom. A quitosana para ser submetida ao ultrassom em diferentes tempos, foi colocada em solução tampão com acetato de sódio e ácido acético glacial, ambos fornecidos pela empresa Sigma-Aldrich® e submetidas a diferentes tempos.

A caracterização das nanopartículas de quitosana, foram feitas utilizando as análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV), para verificar o diâmetro das partículas e a ocorrência de agregação, pelo equipamento Zetasizer que permitiu verificar o potencial zeta (a carga das nanopartículas), o índice de polidispersão (uniformidade dos tamanhos das moléculas) e o diâmetro hidrodinâmico (tamanho médio das partículas), para três pHs diferentes.

A estratégia experimental resumida para obtenção das nanopartículas de quitosana altamente desacetiladas, para uso futuro em queimaduras graves, que possam futuramente auxiliar de forma significativa nas etapas de cicatrização e evitar possíveis infecções. Seguem na Figura 10 as etapas principais envolvidas durante a etapa experimental:

Figura 11 - Estratégia experimental.

3.1 DESACETILAÇÃO DA QUITOSANA

Para aumentar o grau de desacetilação da quitosana, utilizou-se a quitosana inicial com grau de desacetilação de 75%. Nas reações, foram utilizadas soluções de NaOH preparadas com água destilada e mantidas em repouso por 24 horas antes do uso, para sua total dissolução^{110,111,112}. As reações de desacetilação de quitosana, ocorreram para aumentar o grau de desacetilação para valores próximos ou iguais a 90%, em que, durante a reação ocorre a perda dos grupos acetil da acetamida da estrutura da quitosana em meio a solução aquosa de NaOH, e assim deixando somente os grupos amino para tras como representado na Figura 12.

Figura 12 – Desacetilação da quitosana.

Fonte: Rinaudo et al., 2006.

Em que :

quitosana inicial + solução aquosa de NaOH = quitosana final + água (Equação 4)

Os experimentos para a desacetilação da quitosana foram feitos em triplicata em sequencia aleatória utilizando o planejamento fatorial completo 2³. Como pode ser verificado na Tabela 1. Os níveis utilizados de cada fator (temperatura, tempo de reação e concentração de NaOH) pode ser visualizado na Tabela 2, a reação heterogênea de desacetilação da quitosana seguiu uma ordem aleatória para maior confiabilidade nos resultados obtidos.

Tabela 1 - Planejamento fatorial 2³

Experimentos	Temperatura (°C)	Concentração de NaOH (%)	Tempo (horas)
1	-	-	-
2	+	-	-
3	-	+	-
4	+	+	-
5	-	-	+
6	+	-	+
7	-	+	+
8	+	+	+

Tabela 2 - Níveis dos fatores do planejamento fatorial 2³

Fatores	Níveis	
	-	+
Temperatura (°C)	80	110
Concentração de NaOH	20	60
Tempo (horas)	1	6

Para os 24 experimentos realizados, a quantidade de 125 mL da solução de hidróxido de sódio (m/v), previamente aquecida, foi colocada em balão volumétrico de fundo redondo de 500 mL, do qual uma alíquota de 10 mL foi retirada e adicionada em um béquer que continha 2,5 g de quitosana. O início da reação ocorreu ao devolver a alíquota retirada misturada com a quitosana ao balão volumétrico ^{112,113,114}.

O balão volumétrico de fundo redondo, onde ocorreu a reação de desacetilação da quitosana, foi previamente equipado com um termômetro, condensador de refluxo, entrada de nitrogênio, envolto por fluido térmico dentro de um béquer sob chapa aquecedora e utilizando agitador magnético dentro da solução de NaOH e quitosana. O uso do béquer com fluido térmico sob a chapa aquecedora, permitiram que as soluções atingissem as temperaturas desejadas em cada reação de acordo com o experimental 2³ na Figura 13, que mostra a forma como foram dipostos os equipamentos ao redor do balão volumétrico ^{114,115,116}.

Figura 13 - Reação de desacetilação no balão volumétrico e equipamentos.

Fonte: Autoria própria.

Após o tempo determinado, de acordo com cada experimento feito do fatorial 2^3 , a solução foi imediatamente filtrada a vácuo para interromper a reação. A quitosana, de cada experimento que ficou retida no filtro, foi lavada com água destilada até atingir pH neutro. Os filtros de todos os 24 experimentos, com a quitosana retida foram colocados em placa de Petri e submetidos à estufa por 48 h na temperatura de 40°C ^{117,118,119}.

As amostras de quitosana obtidas foram, separadamente, trituradas utilizando-se um pistilo e um almofariz. O grau de desacetilação foi calculado após obtenção dos espectros, por espectroscopia na região do infravermelho, a partir das absorbância das bandas no infravermelho, nas frequências de 1655 cm^{-1} e da amida I do grupo acetil, e 3450 cm^{-1} do grupo hidroxila, calculadas após correção da linha de base e a normalização dos espectros obtidos, usando a Equação 5 proposta por Domszy e Roberts ^{118,119,120}.

$$\text{GD \%} = 100 - [(A_{1655}/A_{3450}) \cdot 75.2]$$

Equação (5)

Para verificação dos graus de desacetilação obtidos, cerca de 1,5 mg de cada amostra de quitosana obtida após a reação de desacetilação foi dispersada em KBr devidamente seco e limpo. As amostras foram maceradas e posteriormente prensadas até adquirir a forma de uma pastilha para, então, serem submetidas à análise no espectômetro da marca SHIMADZU, modelo IRPRESTIGE-21, operado com média de 32 varreduras e resolução de 2 cm^{-1} na região de $4000 - 700\text{ cm}^{-1}$ 118,119,120

Após os resultados do planejamento experimental 2³, foi feito um planejamento experimental 2² com três repetições no ponto central, de acordo com a Tabela 3, para verificar o aumento do grau de desacetilação no decorrer do tempo de seis horas. Nestes ensaios, foram retiradas 11 alíquotas para verificar a cinética da reação de desacetilação da quitosana, e posteriormente inserir uma modelagem matemática adequada que mais se assemelhasse ao comportamento dos experimentos 108,109,110.

A modelagem matemática é uma representação por meio de equações, que possam se aproximar ao máximo do comportamento real do fenômeno estudado. No caso da reação heterogênea de quitosana, em que muitos fatores estão influenciando nos resultados obtidos, e é necessário um conhecimento mais detalhado a respeito da estrutura do material e como se comporta durante esta reação. Para isso, foi feito um estudo da estrutura da quitosana baseando-se no que já existe na literatura, sobre a cinética de desacetilação para a adEquação da modelagem utilizada.

Tabela 3 - Planejamento fatorial 2².

Experimentos	Temperatura (°C)	Concentração de NaOH (%)
1	-	-
2	+	-
3	-	+
4	+	+
5	0	0
6	0	0
7	0	0

Desta forma, utilizou-se quitosana com alta massa molar e com grau de desacetilação inicial de 75%, onde as reações de desacetilação foram feitas com

soluções de NaOH, preparadas com água destilada e mantidas em repouso por 24 horas antes do uso, para sua total dissolução. Os experimentos foram planejados no tempo de seis horas com variações dos dois fatores envolvidos: concentração de NaOH e temperatura, com os níveis de acordo com a Tabela 4 ^{118,119,120}

Tabela 4 - Níveis dos fatores do planejamento fatorial 2²

Fatores	Níveis		
	-	0	+
Temperatura (°C)	80	95	110
Concentração de NaOH (%)	20	40	60

Para cada experimento do experimental 2², foi preparada uma solução com 350 mL de hidróxido de sódio (m/v), pré-aquecido, em balão volumétrico de fundo redondo de 500 mL onde uma alíquota de 10 mL foi retirada e adicionada ao béquer com que continha 7.0 g de quitosana. Em seguida, a mistura foi devolvida ao balão volumétrico, dando início a reação ^{118,119,120}.

O balão volumétrico de fundo redondo, onde ocorreu a reação de desacetilação da quitosana, foi previamente equipado com um termômetro, um condensador de refluxo, entrada de nitrogênio, envolto por fluido térmico dentro de um béquer sob chapa aquecedora e utilizando agitador magnético dentro da solução de NaOH e quitosana. O uso do béquer com fluido térmico sob a chapa aquecedora, permitiram que as soluções atingissem as temperaturas desejadas em cada reação como foi planejado no fatorial 2³ ^{118,119,120}.

Durante a reação, onze alíquotas de 20 mL foram retiradas após os tempos de: 2 minutos, 4 minutos, 8 minutos, 10 minutos, 20 minutos, 40 minutos, 60 minutos, 120 minutos, 180 minutos, 240 minutos e 300 minutos. E por fim, quando atingiu os 360 minutos, o material restante retido no balão volumétrico foi imediatamente filtrado. Todas as alíquotas retiradas antes do tempo de 360 minutos, foram imediatamente filtradas a vácuo para interromper a reação ^{118,119,120,121}.

As quitosanas retidas nos filtros, foram lavadas com água destilada até atingir pH neutro. Os 11 filtros com as amostras com a quitosana retida foram colocados separadamente em placas de Petri e levados à estufa por 48 h na temperatura de

40°C. Por fim, as quitosanas obtidas foram trituradas utilizando-se um pistilo e almofariz ^{120,121}. O grau de desacetilação foi medido por espectroscopia na região do infravermelho, usando os picos de absorção da amida I do grupo acetil a 1655 cm⁻¹ e do grupo hidroxil a 3450 cm⁻¹, calculadas após correção da linha de base, usando a Equação. 5 proposta por Domszy e Roberts.

Para verificação dos graus de desacetilação obtidos, cerca de 1,5 mg de cada amostra de quitosana obtida após a reação de desacetilação, foi dispersa em KBr devidamente seco e limpo, as amostras foram maceradas e posteriormente prensadas até adquirir a forma de uma pastilha, para então serem submetidas a análise no espectômetro da marca SHIMADZU, modelo IR-PRESTIGE-21, operado com uma média de 32 varreduras e resolução de 2 cm⁻¹ na região de 4000 – 700 cm⁻¹ ^{120,121}.

3.2 OBTENÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA POR ULTRASSOM

O uso do equipamento de Ultrassom, é um método comum para a preparação e processamento de nanopartículas poliméricas. Este método permite uma ação eficaz, rápida e simples, na quebra de agregados, para obtenção de nanopartículas, e age significativamente na diminuição da polidispersão das partículas do polímero estudado. Isso ocorre devido as ondas sonoras com vibrações de alta frequência produzidas sob o material em suspensão ^{122,123}.

O ultrassom de alta potência, quando utilizado em solução em partículas em suspensão, emite ondas sonoras sobre o fluido, que se propagam em alternância de ciclos de baixa e alta pressão, portanto, desencadeia energia mecânica em ondas de compressão e descompressão. Essas ondas geram bolhas de vácuo ou vazios líquidos, quando elas atingem o limite de absorção de energia desfazem-se abruptamente no ciclo de alta pressão. Este fenômeno recebe o nome de cavitação ¹²⁴.

No fenômeno de cavitação, em que a implosão violenta das bolhas geram micro turbulências, ocorre colisões das partículas tendo como consequência, redução do tamanho, ou pela própria cavitação na superfície das partículas, reduz seu tamanho. É importante mencionar que durante o processo de ultrassom pode ocorrer quebra na cadeia da quitosana interferindo na massa molar final ^{125,126}.

A quitosana com maior grau de desacetilação obtida nos experimentos do planejamento fatorial, foi colocada em solução tampão de ácido acético glacial e

acetato de sódio, variando o pH em três valores entre (4,0 e 5,0); e as concentrações de soluções tampão com quitosana variaram de 1,0 a 2,0 mg/mL^{125,126,127}. As medições do pH das soluções tampão, foram feitas com o uso do medidor de pH de bancada, da marca TECNAL, modelo Tec-3MP mostrado na Figura 14.

Figura 14 - Medidor de pH de bancada.

Fonte: Autoria própria.

Após a medição de pH, uma quantidade de 5 mL da solução tampão com a amostra de quitosana foi colocada em um béquer de 10 mL e submetida a diferentes tempos no ultrassom, de 120 até 900 segundos. As soluções foram submetidas ao equipamento ultrassônico de ponteira da marca UNIQUE, modelo S500, com ponteira de titânio mostrado na Figura 15, operando na frequência de 20 kHz e na potência de 500 W. Segue a imagem do sonicador ultrassônico^{125,126,127}.

Figura 15 - Equipamento ultrassônico de ponteira.

Fonte: Autoria própria.

3.3 CARACTERIZAÇÃO DA QUITOSANA E DAS NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA

As amostras de quitosana após a desacetilação foram submetidas à análise por espectroscopia na região do infravermelho (FTIR), para verificar os graus de desacetilação obtidos, através da análise quantitativa e qualitativa dos espectros. Logo após a verificação do maior grau obtido, a amostra foi submetida ao ultrassom e em seguida, foram verificadas as dimensões das nanopartículas obtidas e a estabilidade das mesmas por microscopia eletrônica de varredura (MEV), e pelo seu potencial zeta, diâmetro hidrodinâmico e índice de polidispersão utilizando o equipamento Zetasizer Nano.

3.3.1 Análise de Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

A análise de espectroscopia na região do infravermelho é um método que permite analisar qualitativamente e quantitativamente a estrutura de materiais, pela interação da radiação eletromagnética que incide sob os átomos e moléculas em constante movimentação. A condição necessária para que ocorra absorção desta radiação é que haja variação do momento de dipolo elétrico da molécula, como consequência de seu movimento vibracional ou rotacional.^{128,129}

O campo elétrico alternante da radiação incidente, interage com a molécula em movimento, originando os espectros. De outra forma, pode-se dizer que o espectro de absorção no infravermelho tem origem quando a radiação eletromagnética incidente tem um componente com frequência correspondente a uma transição entre dois níveis vibracionais^{130,131}.

A vibração dos átomos no interior de uma molécula, apresenta energia coerente com a região do espectro eletromagnético correspondente ao infravermelho (100 a 10000 cm^{-1}). Os átomos em uma molécula nunca estão parados, onde as vibrações moleculares podem ser classificadas de acordo com suas vibrações em :deformação axial ou estiramento e deformação angular, onde as deformações angulares podem ser simétricas ou assimétricas^{131,132}.

A espectroscopia no infravermelho é considerada uma das técnicas analíticas mais importantes para análise de biopolímeros. Esta técnica, nos permite identificar compostos orgânicos e inorgânicos. Os espectros das amostras foram obtidos em um espectrômetro da marca SHIMADZU, modelo IR Prestige-21 representado na Figura 16.

As amostras de quitosana foram preparadas de acordo com o item 3.1 de desacetilação da quitosana, em que menciona que as amostras foram separadamente misturadas com uma quantidade de $1,5\text{ mg}$ de KBr seco e limpo, cada mistura foi macerada e prensada para adquirir a forma de uma pastilha. O espectro foi registrado no espectrômetro com a média de 32 scans com resolução de 2 cm^{-1} na região de $4000 - 400\text{ cm}^{-1}$ ^{133,134,135}.

Figura 16 - Espectrômetro da marca Shimadzu, modelo IR Prestige - 21.

Fonte: Autoria própria.

3.3.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

O método de microscopia eletrônica de varredura (MEV) é utilizado para observar a morfologia interna de materiais nanoestruturados, em que é possível verificar o tamanho das partículas obtidas e sobretudo verificar se partículas estão agregadas. A imagem obtida é formada pela incidência de um feixe de elétrons promovendo a emissão de elétrons secundários, representando o mapeamento e a contagem de elétrons secundários e retroespalhados emitidos pelo material ^{136,137,138}.

O MEV é um aparelho que pode fornecer de forma rápida, o diâmetro dos materiais nanoestruturados estudados e identificar os elementos químicos que compõem o material em estudo. Este equipamento, garante uma imagem de alta resolução para materiais com valores de até 1 nanômetro de diâmetro, suas imagens permitem grande profundidade de foco com aparência tridimensional ^{137,138,139}.

Para analisar as nanopartículas de quitosana pelo método de microscopia eletrônica de varredura, o filamento de tungstênio foi operado em uma faixa de tensão de operação de 20 kV, as soluções tampão com as nanopartículas de quitosana foram separadamente gotejadas em lâminas de silício logo após serem submetidas ao tempo determinado de ultrassom, e colocadas sobre placa de Petri para sua completa secagem em uma estufa a vácuo, temperatura de 40°C, durante 24 horas como representada na Figura 17 na imagem A e B. Pouco tempo antes de ser analisada, as amostras foram recobertas com uma fina camada de ouro possibilitando a análise de suas estruturas ^{139,140,141}.

Figura 17 - Lâminas de silício antes na imagem A e depois do recobrimento de ouro na imagem B.

Fonte: Autoria própria.

Para as análises foi utilizado o equipamento NanoSEM400 da marca FEI Company mostrado na Figura 18. Utilizado no laboratório da Engenharia Elétrica da Escola Politécnica com o auxílio do Doutor Adir José Moreira. As placas de silício utilizadas foram previamente limpas nos banhos adequados para isenção de impurezas.

Figura 18 - Equipamento para análise de MEV.

Fonte: Autoria própria.

3.3.3 Potencial Zeta, Índice de Polidispersão e Diâmetro Hidrodinâmico

O potencial zeta é um potencial eletrocinético, em que materiais em escala entre micrômetros ou nanômetros em contato com um líquido, adquire uma carga elétrica em sua superfície, e essa carga influencia na quantidade de íons ao seu redor. Estes íons, que se aproximam da carga da superfície do material formam uma dupla camada dividindo-se em uma região externa e uma interna. A camada interna é extremamente ligada à superfície e a externa, que possuem íons distribuídos em equilíbrio entre forças eletrostáticas e forças térmicas ¹⁴².

O potencial zeta, está relacionado com a carga superficial da partícula de qualquer camada absorvida na interface com o meio, da natureza e composição do meio que o circunda, sendo influenciado pelo pH da solução. Sendo que, em geral, a faixa que indica instabilidade eletrostática ocorre para valores dentro de +/- 30 mv, caracterizando materiais estáveis com valores acima de +30mv ou abaixo de -30mv. ¹⁴².

Desta forma, a medida do potencial zeta fornece informações sobre o potencial da superfície das nanopartículas analisando sua carga superficial, fornecendo informação sobre se existe carga disponível para ligações com outros materiais. Geralmente, ela é influenciada pelas mudanças na interface com o meio dispersante, devido à dissociação de grupos funcionais na superfície da partícula ou pela adsorção de espécies iônicas presentes no meio biológico ¹⁴³.

Este potencial permite medir a magnitude das interações repulsivas entre partículas e avaliar a estabilidade destas em solução, sendo que a carga de superfície das nanopartículas de quitosana é determinada pelo grau de neutralização dos grupos amina (NH_3^+) da estrutura ^{143,144}.

A técnica de espalhamento dinâmico de luz, permite calcular o diâmetro hidrodinâmico das partículas e o índice de polidispersão. As partículas em suspensão podem estar monodispersas, quando possuem uma distribuição de partículas de mesmo tamanho estreita, ou com grande heterogeneidade em solução quando possuem uma grande variedade de tamanhos ¹⁴⁵.

Os valores altos de índice de polidispersão indicam heterogeneidade do diâmetro das partículas em suspensão, em que variações nos valores de polidispersão em função do tempo indicam formação de populações de partículas com diâmetros que não existiam inicialmente, podendo ser decorrentes de agregação ou

degradação de partículas. Índices de polidispersão podem variar de 0 a 1, e os índices acima 0,3 são de soluções com partículas com grande variedade de tamanhos e abaixo deste valor soluções monodispersas ^{146,147}.

Esta técnica de espalhamento de luz é amplamente utilizada para a avaliação das dimensões de nanopartículas ou micropartículas em suspensão, dependendo dos valores dos característicos índices de polidispersão, podem ser caracterizados pelas formas nano esféricas ou nanocápsulas, sendo sua medição baseada que quando uma partícula é iluminada por uma fonte de luz, como um LASER (light amplification by stimulated emission of radiation). Essa partícula irá espalhar luz em todas as direções possibilitando analisar-se o movimento da partícula, movimento este que é a causa das flutuações da intensidade^{148,149}.

Para a análise do diâmetro hidrodinâmico (que indica o tamanho médio das partículas), índice de polidispersão das nanopartículas e o potencial zeta, foram realizados utilizando o equipamento de espalhamento de luz dinâmico Nano-Zetasizer – ZS, modelo ZEN3600 - Malvern Instruments mostrado na Figura 19. O equipamento opera com espalhamento de luz de 90°, na temperatura de 25°C, utilizando a própria solução tampão como dispersante feita com água Milli-Q com viscosidade de 0,8872 cP e índice de refração de 1,33. ^{148,149}.

Figura 19 - Equipamento Zetasizer, modelo ZEN3600 da Malvern Instruments.

Fonte: Autoria própria.

Para a caracterização das nanopartículas quanto ao tamanho hidrodinâmico e polidispersão (PDI), e potencial zeta de cada amostra foi transferida uma alíquota de 25,0 μL para uma cubeta de poliestireno com 1,0 cm de caminho óptico. Cada análise foi realizada em triplicata, sendo que cada análise representa a média de 12 leituras em cada ponto, e os dados foram tratados com o software Zetasizer 7.11. Segue as cubetas para análise de potencial zeta e para análise de diâmetro hidrodinâmico na Figura 20 separadas em A e B ¹⁴⁹.

Figura 20 - Cubeta para potencial zeta na imagem A e cubeta para diâmetro hidrodinâmico na imagem B.

Fonte: Autoria própria.

É importante mencionar que as cubetas com a solução devem estar isentas de bolhas de ar, pois podem interferir nos resultados, e devem estar secas ao redor em especial a de potencial zeta, pois pode interferir na precisão dos resultados. Após confirmadas a isenção de bolhas foram feitas as análises no equipamento Zetasizer.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Neste capítulo, constam os resultados dos graus de desacetilação obtidos no planejamento fatorial 2^3 e no planejamento fatorial 2^2 . Em que, com os resultados do fatorial 2^2 foi possível verificar um padrão de comportamento em todas as reações de acordo com os graus de desacetilação obtidos e podendo portanto analisar a cinética da reação. Os resultados dos graus de desacetilação foram verificados no decorrer de seis horas nos sete experimentos permitindo verificar boa repetibilidade na triplicata do ponto central e portanto confiabilidade nos resultados.

O modelo que mais se aproximou do comportamento real da evolução do grau de desacetilação com o tempo, para a reação de desacetilação, foi o modelo do núcleo não reagido. Em paralelo ao estudo da cinética da reação da desacetilação da quitosana, foram analisados os resultados das amostras de quitosana após serem submetidas ao método de ultrassom bem como a verificação do tamanho na escala nanométrica logo após os tempos de sonicação.

Em todos os 31 experimentos (planejamento fatorial 2^2 com três repetições no ponto central e o fatorial 2^3), as amostras de quitosana, foram inseridas no espectômetro da marca SHIMADZU, para gerar seus espectros analisa-los quantitativamente e qualitativamente. Todos os espectros foram corrigidos para mesma linha de base e os excessos de ruídos foram trabalhados para melhor visualização dos picos.

4.1 RESULTADOS E DISCUSSÕES REFERENTE AO FATORIAL 2^3

Os resultados dos graus de desacetilação são inferidos dos espectros obtidos nos 24 experimentos. Seguem a seguir os comentários referentes aos graus de desacetilação obtidos e a análise estatística utilizando o software MINITAB17. Antes das Figuras dos espectros obtidos, segue o espectro referente ao experimento oito, em que foram utilizados, os valores máximos de temperatura, concentração de hidróxido de sódio e tempo de reação, como representativo para demonstrar os grupos químicos associados característicos da quitosana mostrados na Figura 21. Lembrando que as bandas de referência da amida I, e do grupo hidroxila também foram verificados no espectro e demarcados em círculos verdes.

Figura 21 - Espectro de FTIR referente ao experimento 8 do fatorial 2^3 da duplicata.

Fonte: Autoria própria.

É importante mencionar que o uso da Equação 5, proposta por Domszy e Roberts, somente pode ser utilizada usando a banda de referência que não se altera com o aumento do grau de desacetilação, com a banda de referência que se altera com a retirada dos grupos acetil.

Relembrando, onde o A mencionado na Equação, se refere a absorbância nesta frequência de onda específica da amida I (do grupo acetil (A_{1655})) e do grupo hidroxila (A_{3450}). Nos espectros estudados, foi possível verificar que os grupos encontrados de acordo com suas respectivas bandas seguiram o que consta nas referências para os espectros da quitosana (Santos et al., 2003; Carvalho Canela et al., 2001; Dong et al., 2000; Domard et al., 1983; Tolaimate et al., 1999; Sabinis et al., 1997; Kasaai et al., 2007; Brugnerotto et al., 2000; Rinauldo et al., 2006; Chang et al., 1997; Galed et al., 2005; Methacanon et al., 2002) sendo portanto: banda de estiramento axial OH entre 3430 a 3485 cm^{-1} , a qual aparece sobreposta à banda de estiramento N-H; deformação axial de $\text{C}=\text{O}$ de amida I (entre 1645 a 1657 cm^{-1}); deformação angular de N-H (entre 1580 a 1595 cm^{-1}); deformação angular simétrica do metil CH_3 (entre 1380 a 1383 cm^{-1}); deformação axial de $-\text{CN}$ da amida (por volta de 1420 a 1425 cm^{-1}), deformação axial de $-\text{CN}$ de grupos amino primário, terciário e secundário estão (1320, 1255 e 1382 cm^{-1} respectivamente) e as estruturas polissacarídicas na região entre 875–890 cm^{-1} e 1145–1157 cm^{-1} .

Todas as bandas características foram encontradas em todos os espectros estudados dentro dos limites anteriormente mencionados. Seguem as Figuras 22 e 23 constando os espectros analisados, nas quais na Figura 22 constam os primeiros oito espectros obtidos sobrepostos seguindo a ordem dos experimentos de acordo com o fatorial 2^3 , em seguida a Figura 23 consta os espectros deslocados para melhor visualização dos picos.

Figura 22 - Espectros FTIR sobrepostos dos oito primeiros experimentos do fatorial 2^3 .

Fonte: Autoria própria.

É possível verificar no gráfico mostrado dos primeiros oito experimentos que o pico A_{3450} marcado com a seta em azul não apresenta deslocamento da banda, enquanto no pico referente a A_{1655} também demarcado com a seta azul, ocorre um deslocamento significativo. Portanto, ficou evidente a alteração da quantidade de grupos acetil na estrutura da quitosana inicial, onde poderá ser confirmado nos resultados obtidos nos espectros de infravermelho subsequentes. Estas informações podem ser verificadas nas Figuras 24, 25, 26 e 27, referentes às duplicatas e triplicatas genuínas dos experimentos.

Todos os espectros foram feitos utilizando a mesma linha de base, normalizados e trabalhados para amenizar excesso de ruído permitindo uma melhor visualização dos principais grupos funcionais existentes na estrutura da quitosana.

Figura 23 - Espectros FTIR deslocados dos oito primeiros experimentos do fatorial 2^3

Fonte: Autoria própria.

Na duplicata e na triplicata genuína (seguindo todas as sequencias do experimento do fatorial 2^3), foi possível verificar as bandas de referência representadas também pelas setas azuis, sendo a banda que não se altera com o aumento do grau de desacetilação (A_{3450}), e a banda de referência que se altera com a retirada dos grupos acetil (A_{1655}), permitindo o cálculo do grau de desacetilação por $\sim$ sameio da Equação 5.

Figura 24 - Espectros FTIR sobrepostos da duplicata genuína do fatorial 2^3 .

Fonte: Autoria própria.

Figura 25 - Espectros FTIR deslocados da duplicata genuína do fatorial 2³.

Fonte: Autoria própria.

Nos resultados da duplicata nas Figuras 24 e 25, foi possível verificar um aumento de ruído nos espectros, sendo que todos os espectros dos 24 experimentos foram analisados cinco vezes cada amostra, para se ter certeza do espectro obtido em dias diferentes, e a confirmação dos graus de desacetilação obtidos. É importante mencionar, que ainda assim, alguns fatores podem ter influenciado nos resultados, como a umidade do ar, tratamento para formação da pastilha no que se refere à proporção ideal entre quitosana e KBr e a secagem adequada do material.

Figura 26 - Espectros FTIR sobrepostos da triplicata genuína fatorial 2³

Fonte: Autoria própria

Figura 27 – Espectros FTIR deslocados da triplicata genuína do fatorial 2³.

Fonte: Autoria própria.

Após a obtenção dos espectros, verificaram-se os graus de desacetilação obtidos, em que foi possível fazer uma análise inicial da influência dos fatores envolvidos. Somente após uma análise estatística foi possível verificar a verdadeira influência de cada um dos fatores. No entanto, inicialmente foi possível verificar que os maiores graus de desacetilação foram obtidos nos experimentos na temperatura de 110 °C, na concentração de NaOH de 60% e tempo de reação de 6 horas.

De acordo com os resultados que constam na Tabela 5, foi possível identificar que ocorreu uma repetibilidade efetiva nos resultados em triplicata, em que ao refazer os experimentos com os mesmos níveis dos fatores envolvidos, os resultados obtidos foram muito próximos, comprovando posteriormente nos resultados estatísticos a real repetibilidade na triplicata. As ordens aleatórias dos experimentos, podem ser também verificadas na Tabela 5.

Os resultados dos graus de desacetilação obtidos foram um pouco acima da faixa encontrada na literatura em torno de 85%, partindo de uma quitosana de GD de 75. No entanto, de acordo com referências, a reação de desacetilação sob gás inerte de N₂ provavelmente influenciou no aumento dos graus de desacetilação obtidos, pois o uso do gás inerte diminui a despolimerização que ocorre durante a reação sob altas temperaturas e em soluções altamente alcalinas, facilitando o processo difusivo da solução alcalina aos sítios reativos. Isso foi comentado nos resultados encontrados

nas referências (Methacanon et al., 2002; Chang et al., 1997; Jiang e Xu, 2006; Lamarque et al., 2004 e Martinou et al., 1995).

Tabela 5 - Resultados dos graus de desacetilação obtidos no fatorial 2³.

Ordem real dos experimentos	Experimentos	Temperatura (°C)	Concentração NaOH (%)	Tempo (horas)	Grau de desacetilação
6	1	80	20	1	82,10
4	2	110	20	1	84,50
2	3	80	60	1	83,10
8	4	110	60	1	84,45
3	5	80	20	6	85,21
1	6	110	20	6	89,50
5	7	80	60	6	87,12
7	8	110	60	6	89,99
6	9	80	20	1	82,37
4	10	110	20	1	84,25
2	11	80	60	1	83,00
8	12	110	60	1	85,50
3	13	80	20	6	85,92
1	14	110	20	6	88,10
5	15	80	60	6	87,01
7	16	110	60	6	90,01
6	17	80	20	1	82,59
4	18	110	20	1	85,10
2	19	80	60	1	83,00
8	20	110	60	1	85,00
3	21	80	20	6	85,33
1	22	110	20	6	89,10
5	23	80	60	6	87,68
7	24	110	60	6	89,45

Para a confirmação da boa repetibilidade dos resultados, foi possível verificar que cada experimento representado no gráfico da Figura 28, que os 24 experimentos sob os mesmos níveis de seus fatores deram resultados muito próximos, permitindo portanto constatar uma boa reprodutibilidade e repetibilidade efetiva durante os experimentos. Quanto a algumas questões macroscópicas, é importante mencionar que se observou que a temperatura de 110° C e concentração de hidróxido máxima de 60% gerando um produto líquido após a reação com uma cor fortemente amarelada, modificando também a viscosidade da solução inicial da amostra a qual dificultou a filtragem.

Figura 28 - Representação gráfica da triplicata do fatorial 2^3 .

Fonte: Autoria própria.

Seguem os resultados da análise estatística obtidos pelo software MINITAB 17, em que o início do estudo dos resultados do planejamento fatorial completo 2^3 , foi plotando o cubo constando os três fatores envolvidos e seus níveis, na Figura 29 é possível verificar facilmente que os melhores rendimentos em relação a obtenção do grau de desacetilação foram nos níveis máximos, onde os valores axiais representam as médias das três replicações.

Figura 29 – Cubo plotado referente aos graus de desacetilação obtidos no fatorial 2^3 .

Fonte: Autoria própria.

No gráfico de probabilidade normal de resíduos, os pontos devem estar mais próximos da linha contínua. Desta forma será validada a suposição de normalidade dos resíduos. De acordo com os resultados obtidos pelo MINITAB17, o gráfico de probabilidade normal analisando os resíduos dos 24 experimentos do fatorial 2^3 , apresentou os pontos bem próximos de uma linha reta como pode ser verificado na Figura 30.

Figura 30 - Gráfico de probabilidade normal de análise de resíduos.

Fonte: Autoria própria.

Após a verificação dos resíduos distribuídos normalmente, é possível afirmar que 95% cairão no intervalo entre $(-2,+2)$ como pode ser visualizado na Figura 31, constatando que há ausência de outliers, que são pontos muito fora dos demais, dando a certeza que o procedimento experimental está correto dentro dos fatores necessários que influenciam significativamente o grau de desacetilação obtido.

No gráfico demonstrado na Figura 32, é possível verificar que não existe padrão de comportamento dos resultados dos resíduos, podendo concluir que a variância dos erros é constante. Desta forma, garante uma maior confiabilidade nos resultados do experimental completo 2^3 , que envolve a triplicata genuína dos resultados.

Figura 31 - Gráfico que demonstra ausencia de outliers.

Fonte: Autoria própria.

Figura 32 - Análise da variância de resíduos.

Fonte: Autoria própria.

Dentro do nível de significância de 5%, foi possível verificar no diagrama de pareto os efeitos e interações entre temperatura, concentração de NaOH e tempo de reação. Na teoria os três fatores têm influência; no entanto, na prática, a influência mais significativa na obtenção do maior grau de desidacetilação foi o tempo de reação

e posteriormente, a temperatura. Em relação as interações entre os fatores, concentração de NaOH e tempo de reação a influência foi muito baixa, assim como entre temperatura e tempo de reação. Por outro lado, não ocorreu interação alguma entre temperatura e tempo de reação e entre os três fatores. A representação do diagrama segue na Figura 33 onde pode ser verificado as afirmações acima comentadas.

Figura 33 - Diagrama de pareto do Fatorial 2³.

Fonte: Autoria própria.

Para confirmação dos efeitos principais e das interações entre os fatores, foram feitas novas análises separadamente pelo software MINITAB17. Em que foi possível confirmar que o efeito principal para o resultado dos maiores graus de desacetilação obtidos foi o tempo de reação, tendo a temperatura também sua relevância, ainda que em menor proporção. Na reta que consta desenhada no gráfico da Figura 34, relacionando o grau de desacetilação obtido com o tempo de reação, foi possível observar os maiores rendimentos.

Figura 34 - Efeitos principais do fatorial 2^3 .

Fonte: Autoria própria.

Na Figura 35, onde esta demonstrada as interações entre os fatores envolvidos nas reação de desacetilação, as retas quase paralelas representam baixas interações entre os fatores envolvidos, reafirmando portanto o que consta no diagrama de Pareto.

Figura 35 - Interações entre os fatores do fatorial 2^3

Fonte: Autoria própria.

Os gráficos de controle são utilizados para visualizar como os valores de resposta se relacionam a duas variáveis contínuas, em uma visão bidimensional em

que todos os pontos que têm a mesma resposta e estão ligados para produzir linhas de contorno de respostas constantes. Os gráficos de contorno são úteis para o estabelecimento dos valores de resposta e das condições de funcionamento desejáveis. Nelas as faixas de contorno coloridas representam a amplitude dos valores de resposta ajustados, e através de retas horizontais e verticais é possível verificar a evolução.

No gráfico de contorno de grau de concentração de NaOH (%) com o tempo de reação em horas mostrado na Figura 36, é possível observar a evolução do grau de desacetilação em relação as diferentes tonalidades de verde alcançando a faixa máxima, em que o aumento da concentração de NaOH pouco interfere na evolução do grau de desacetilação, já que o mesmo esta em excesso na reação.

Figura 36 - Gráfico de contorno da concentração de NaOH com o tempo do fatorial 2^3 .

Fonte: Autoria própria.

No gráfico de contorno da temperatura ($^{\circ}\text{C}$) com a concentração de NaOH (%) com o tempo de reação em horas mostrado na Figura 37, é possível ver a evolução do grau de desacetilação apenas em duas faixas de tonalidades de verde, confirmando a baixa relação entre os dois fatores e que ambos não são fatores de grande influência no aumento do grau de desacetilação.

Figura 37 - Gráfico de contorno da temperatura com a concentração de NaOH do fatorial 2³.

Fonte: Autoria própria.

No gráfico de contorno da temperatura (°C) com o tempo de reação (horas) mostrado na Figura 38, é possível ver a evolução do grau de desacetilação em relação em quatro faixas de tonalidades de verde alcançando a faixa máxima, onde existe uma interação entre estes dois fatores de maior relevância, um pouco maior do que os outros fatores estudados neste experimento. De fato, os maiores resultados do grau de desacetilação foram obtidos nos maiores níveis de temperatura e de tempo de reação.

Figura 38 - Gráfico de contorno do tempo de reação com a temperatura do fatorial 2³.

Fonte: Autoria própria.

A superfície de resposta é uma técnica estatística utilizada para a modelagem e análise no fatorial completo, em que a variável resposta é influenciada pelos fatores envolvidos e com o objetivo de uma otimização da resposta. O deslocamento se dá sempre ao longo do caminho de máxima inclinação de um determinado modelo, que é a trajetória na qual a resposta varia de forma mais pronunciada. É possível verificar na Figura 39 a superfície de resposta entre o tempo e a temperatura com a maior inclinação nos níveis máximos.

Figura 39 - Superfície de resposta (tempo x temperatura x GD) do fatorial completo 2^3 .

Fonte: Autoria própria.

O deslocamento ocorre ao longo do caminho de máxima inclinação de um determinado modelo já que nas figuras obtidas não ocorreram uma curvatura significativa, que é a trajetória na qual a resposta varia de forma mais pronunciada, no entanto é possível verificar que na superfície de resposta entre os fatores concentração de NaOH e temperatura a superfície praticamente não ocorreu inclinação, ficando um plano reto, onde os efeitos destes fatores não influenciam de forma significativa nos resultados para encontrar o ponto ótimo dos experimentos. É possível verificar na Figura 40 a superfície de resposta entre o tempo e temperatura a maior inclinação nos níveis máximos.

Figura 40 - Superfície de resposta (concentração de NaOH x temperatura x GD) no fatorial completo 2^3 .

Fonte: Autoria própria.

Na Figura 41, é possível verificar que a superfície de resposta entre o tempo e concentração de NaOH tiveram uma leve inclinação, tendo o ponto ótimo para os níveis máximos de ambos os fatores.

Figura 41 - Superfície de resposta (tempo x Concentração de NaOH x GD) no fatorial completo 2^3 .

Fonte: Autoria própria.

4.2 RESULTADOS E DISCUSSÕES REFERENTE AO FATORIAL 2²

Após a obtenção dos resultados do planejamento fatorial completo 2³, foi possível verificar que o efeito principal em relação aos maiores resultados de grau de desacetilação obtidos foi o tempo de reação. Para compreender melhor como ocorre a evolução do grau de desacetilação com o tempo, foi fixado o tempo de seis horas e onze alíquotas foram retiradas durante a reação, permitindo um estudo posterior da cinética da reação e a obtenção de uma modelagem matemática adequada que mais se aproximasse da realidade da reação.

Inicialmente foram obtidos 77 espectros e todos foram normalizados e ajustados para a mesma linha de base para que os graus de desacetilação fossem calculados. Em cada Figura que representa os sete experimentos feitos, foram colocados 12 espectros utilizando a quitosana inicial como referência. Assim como no planejamento experimental 2³, os resultados dos graus de desacetilação dos espectros obtidos durante os sete experimentos foram analisados utilizando o software MINITAB17 para verificar os efeitos principais e suas interações.

O espectro 4 obtido após 360 minutos de reação, o qual mostrou o melhor resultado do grau de desacetilação com os níveis máximos de temperatura e concentração de hidróxido de sódio foi utilizado na Figura 42 como representativo para demonstrar os grupos químicos associados característicos da quitosana. As bandas de referência da amida, e do grupo hidroxila estão demarcados em círculos verdes.

Figura 42 - Espectro FTIR da quitosana do experimento 4 após 360 minutos de reação.

Fonte: Autoria própria.

O uso da Equação 5, proposta por Domszy e Roberts, para cálculo do grau de desacetilação, pode ser utilizada pois nos resultados a banda de referência que não pode ocorrer alteração se manteve constante com o aumento do grau de desacetilação e a banda de referência que mudou sua posição com a retirada dos grupos acetil durante a reação. Relembrando que a equação 5, foi utilizada para obtenção dos graus de desacetilação, em que A_{1655} e A_{3450} que constam na equação, se refere as absorbâncias das bandas do grupo acetil da amida I e do grupo hidroxila respectivamente.

Nos sentença e sete espectros, estudados de acordo com o experimental 2² com três repetições no ponto central, foi possível verificar que os grupos encontrados de acordo com suas respectivas bandas foram semelhantes ao fatorial 2³ ocorrendo pequenos deslocamentos de diferença das bandas. Todas as bandas características foram semelhantes as mencionadas nos artigos de referência estudados (Santos et al., 2003; Carvalho Canela et al., 2001; Dong et al., 2000; Domard et al., 1983; Tolaimate et al., 1999; Sabinis et al., 1997, Kasaai et al., 2007; Brugnerotto et al., 2000; Rinauldo et al., 2006; Chang et al., 1997; Galed et al., 2005; Methacanon et al., 2002), nos quais grupos de referência estão dentro do que é necessário para utilizar a Equação para cálculo dos graus de desacetilação obtidos.

Desta forma, os grupos característicos da quitosana encontrados nos espectros das alíquotas retiradas referentes aos experimentos do fatorial 2², foram os seguintes: banda de estiramento axial OH entre 3440 e 3480 cm^{-1} , a qual aparece sobreposta à banda de estiramento N-H; deformação axial de C = O de amida I (entre 1645 a 1656 cm^{-1}); deformação angular de N-H (entre 1582 a 1595 cm^{-1}); deformação angular simétrica do metil CH_3 (entre 1378 a 1383 cm^{-1}); deformação axial de -CN da amida (por volta de 1420 a 1425 cm^{-1}), deformação axial de -CN de grupos amino primário, terciário e secundário (1325, 1255 e 1383 cm^{-1} respectivamente) e as estruturas polissacarídicas na região entre 880 –897 cm^{-1} e 1145-1156 cm^{-1} .

A Tabela com os resultados dos sete experimentos, e em sequência vêm a explicação do comportamento do aumento dos graus de desacetilação com o tempo e os espectros que foram utilizados como base para os cálculos.

Tabela 6 - Resultados do planejamento do fatorialexperimental 2^2 com tres repetições no ponto central

Ordem real dos experimentos	Experimentos	Temperatura (°C)	Concentração de NaOH (%)
4	1	80	20
2	2	110	20
3	3	80	60
1	4	110	60
5	5	95	40
6	6	95	40
7	7	95	40

Nos primeiros 11 resultados dos espectros, foi possível verificar um aumento dos graus de desacetilação ao longo do tempo nos primeiros quarenta minutos iniciais de reação e após cerca de sessenta minutos os resultados tenderam a estabilizar . Estes resultados estão de acordo com os resultados dos artigos de referência sobre a cinética da desacetilação da quitosana como: (Jiang e Xu, 2006; Cardoso, 2008; Lamarque et al., 2004; Ahlafi et al., 2013; Chen et al., 2004; Martinou et al., 1995; Methacanon et al., 2003; Chang et al., 1997; Chebotok et al, 2006; Martins, 1995, Martins et al, 1995; Yaghibi e Hormozi, 2010; Liu et al, 2008).

Figura 43 - Espectros FTIR da quitosana sobrepostos das 11 alíquotas do experimento 1 do fatorial 2^2 .

Fonte: Autoria própria.

Na Figura 43 onde esta demonstrado os espectros das 11 alíquotas do experimento 1, demarcados em setas azuis o grupo acetil da Amida I (A_{1655}) e o grupo hidroxila (A_{3450}), esta demonstrado os espectros sobrepostos para verificação da banda do grupo acetil que se altera e do grupo hidroxila que se mantém constante, e na Figura 44 os espectros estão mais separados e portanto deslocados para melhor verificação dos picos principais característicos da estrutura da quitosana.

Figura 44 - Espectros FTIR da quitosana deslocados das 11 alíquotas do experimento 1 do fatorial 2^2 .

Fonte: Autoria própria.

Figura 45 – Gráfico da evolução dos graus de desacetilação da quitosana referente às 11 alíquotas do experimento 1.

Fonte: Autoria própria.

No gráfico da Figura 45, as 11 alíquotas do experimento 1 do fatorial completo 2^2 pode ser verificado a alta velocidade inicial com que ocorre a reação de desacetilação da quitosana, e que os resultados dos GD obtidos foram os mais baixos entre os sete experimentos executados no fatorial 2^2 com três repetições no ponto central, onde foi feito com os níveis mínimos de concentração de NaOH e temperatura.

Na Figura 46 com os 11 espectros sobrepostos, referentes ao segundo experimento do fatorial completo 2^2 , apartir dos resultados foi possível verificar que os valores dos graus de desacetilação obtidos foram um pouco mais altos do que do primeiro experimento, estes dados podem ser confirmados na Tabela 6. Nos espectros da mesma figura 46, podem ser verificados as bandas utilizadas para o cálculo do grau de desacetilação utilizadas com o uso da Equação 5, A_{1655} e A_{3450} . Na Figura 47 mostra os espectros os espctros deslocados para melhor vizualização de seus picos.

Figura 46 - Espectros FTIR da quitosana sobrepostos das 11 alíquotas do experimento 2 do fatorial 2^2 .

Fonte: Autoria própria.

Figura 47 – Espectros FTIR da quitosana deslocados das 11 alíquotas do experimento 2 do fatorial 2^2

Fonte: Autoria própria.

No gráfico da Figura 48 das 11 alíquotas do experimento 2 do fatorial completo 2^2 pode ser verificado novamente a alta velocidade inicial com que ocorre a reação de desacetilação assim como nos experimentos anteriores, demonstrando um padrão de comportamento de reação da desacetilação.

Figura 48 – Gráfico da evolução dos graus de desacetilação da quitosana referente as 11 alíquotas do experimento 2.

Fonte: Autoria própria.

Na Figura 48 com os 11 espectros referentes ao terceiro experimento do fatorial completo 2^2 , a partir dos resultados foi possível verificar valores de graus de desacetilação um pouco mais altos do que no experimento 1. E como já mencionado esta demonstrado na Figura 49 os espectros sobrepostos, onde as setas em azul estão demonstrando a variação das bandas referentes ao grupo acetil da amida I e referente ao grupo hidroxila que não se altera. A Figura 50 mostra os espectros sobrepostos permitindo uma visualização mais clara dos espectros.

Figura 49 – Espectros FTIR da quitosana sobrepostos das 11 alíquotas do experimento 3 do fatorial 2^2 .

Fonte: Autoria própria.

Figura 50 - Espectros FTIR da quitosana deslocados das 11 alíquotas do experimento 3 do fatorial 2^2 .

Fonte: Autoria própria.

No gráfico 4 da Figura 51 referente aos resultados das alíquotas do experimento 3 do fatorial completo 2^2 pode-se verificar novamente a alta velocidade inicial com que ocorre a reação de desacetilação assim como no experimento 1 e 2, demonstrando um padrão de comportamento de reação da desacetilação e a evolução dos graus de desacetilação das 11 alíquotas do experimento 3.

Figura 51 – Gráfico da evolução dos graus de desacetilação da quitosana referente as 11 alíquotas do experimento 3.

Fonte: Autoria própria.

A seguir na Figura 52 com os 11 espectros referentes ao quarto experimento do fatorial completo 2^2 , a partir dos resultados foi possível verificar os maiores valores de graus de desacetilação devido ao uso dos níveis máximos de temperatura e concentração de hidróxido de sódio. As setas azuis indicando as bandas de referência utilizadas na Equação 5 para cálculo dos graus de deaacetilação, onde os espectros estão sobrepostos, enquanto na Figura 53 os gráficos estão deslocados para a melhor verificação dos grupos funcionais característicos da quitosana.

Figura 52 – Espectros FTIR da quitosana sobrepostos das 11 alíquotas do experimento 4 do fatorial 2^2 .

Fonte: Autoria própria.

Figura 53 - Espectros FTIR da quitosana deslocados das 11 alíquotas do experimento 4 do fatorial 2^2 .

Fonte: Autoria própria.

No gráfico 5 da Figura 54, referente aos resultados das alíquotas do experimento 4 do fatorial completo 2^2 podem ser verificados novamente a alta velocidade inicial com que ocorre a reação de desacetilação assim como no experimento 1, 2 e 3 demonstrando um padrão de comportamento de reação da desacetilação que permitiu um estudo para aplicação de uma modelagem matemática adequada.

Figura 54 – Gráfico da evolução dos graus de desacetilação da quitosana referente as 11 alíquotas do experimento 4.

Fonte: Autoria própria.

Seguem os espectros da triplicata do ponto central, referente aos experimentos 5,6 e 7, mostrando que os resultados tiveram uma grande semelhança de resultados e que os resultados tiveram graus de desacetilação após os 360 minutos em torno de 86%, nas Figuras 55,57 e 59 os espectros sobrepostos, e nas Figuras 56, 58 e 60, os espectros deslocados.

Figura 55 - Espectros FTIR da quitosana sobrepostos das 11 alíquotas do experimento 5 do fatorial 2².

Fonte: Autoria própria.

Figura 56 - Espectros FTIR da quitosana deslocados das 11 alíquotas do experimento 5 do fatorial 2².

Fonte: Autoria própria.

Figura 57 - Espectros FTIR da quitosana sobrepostos das 11 alíquotas do experimento 6 do fatorial 2².

Fonte: Autoria própria.

Figura 58- Espectros FTIR da quitosana deslocados das 11 alíquotas do experimento 6 do fatorial 2².

Fonte: Autoria própria.

Figura 59 - Espectros FTIR da quitosana sobrepostos das 11 alíquotas do experimento 7 do fatorial 2².

Fonte: Autoria própria.

Figura 60 – Espectros FTIR da quitosana deslocados das 11 alíquotas do experimento 7 do fatorial 2².

Fonte: Autoria própria.

Segue o gráfico com os resultados da triplicata genuína do ponto central na Figura 61, onde os primeiros quarenta minutos ocorreu o aumento do grau de desacetilação com alta velocidade e estabilizando a partir de sessenta minutos até atingir o tempo de seis horas de reação. Após os resultados obtidos, foi possível concluir que o comportamento do aumento do grau de desacetilação segue um padrão de cinética para os sete experimentos estudados, permitindo assim a aplicação de uma modelagem matemática adequada.

Figura 61 - Gráfico da evolução dos graus de desacetilação da quitosana das 11 alíquotas da triplicata.

Fonte: Autoria própria.

Na Tabela 7, constam os resultados das 11 alíquotas retiradas nos sete experimentos, referentes ao planejamento experimental 2^2 com três repetições no ponto central e logo abaixo no gráfico da Figura 62, é possível visualizar todos os pontos referentes as alíquotas retiradas em todos os sete experimentos, permitindo verificar o comportamento dos resultados seguem um padrão de comportamento com aumento significativo do GD, nos sessenta minutos iniciais e depois estabilizam.

Tabela 7 - Resultados dos graus de desacetilação da quitosana das 11 alíquotas retiradas durante os sete experimentos do fatorial 2^2 com três repetições no ponto central

Tempo (Min.)	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3	Experimento 4	Experimento 5	Experimento 6	Experimento 7
0	75,10	75,10	75,10	75,10	75,10	75,10	75,10
2	77,42	78,18	78,10	77,86	77,50	77,45	77,50
4	78,10	79,15	80,96	79,55	78,22	78,10	78,05
8	79,70	80,50	81,65	80,15	79,89	79,93	79,97
10	80,00	81,50	82,99	81,10	80,99	81,00	81,05
20	80,80	83,01	83,77	83,25	81,77	81,87	81,87
40	81,90	83,80	84,24	85,45	82,96	82,99	83,00
60	82,90	84,52	85,00	87,50	83,90	83,90	83,92
120	83,60	85,88	85,65	88,10	85,10	84,99	84,99
180	84,10	86,83	85,88	88,95	85,50	85,70	85,77
240	84,90	87,15	85,98	88,99	86,50	86,99	87,03
300	85,22	87,98	85,99	89,37	86,85	87,10	87,17
360	85,22	88,02	85,99	89,41	86,85	87,17	87,23

De acordo com os resultados apresentados na tabela acima, foi possível verificar os melhores resultados no experimento 4, onde foi utilizado a máxima concentração de NaOH e temperatura máxima de 110°C , e que o resultado com o valor de grau de desacetilação mais baixo foi o obtido no experimento 1 nos níveis mínimos dos dois fatores envolvidos.

Figura 62 - Gráfico dos resultados dos graus de desacetilação da quitosana dos sete experimentos do fatorial 2^2 .

Fonte: Autoria própria.

Após a comparação de resultados do fatorial 2^2 , com o fatorial feito anteriormente 2^3 foi possível verificar que em ambos os fatorias, os melhores resultados foram obtidos utilizando os níveis máximos de concentração de NaOH e temperatura de 110°C no tempo de seis horas de reação durante a desacetilação da quitosana, permitindo concluir uma grande confiabilidade nos resultados.

Através da análise estatística utilizando o software MINITAB17, foi possível verificar que o efeito principal foi da temperatura e que as interações entre os fatores concentração de hidróxido de sódio e da temperatura que ocorreu a reação, nos sete experimentos estudados do fatorial completo 2^2 foram baixos.

Inicialmente foi plotado os resultados referente a cada experimento nos eixos, e no centro a média dos resultados da repetição do ponto central. Na Figura 63 que segue, é possível verificar com maior clareza, que o maior resultado ocorreu nos níveis máximo dos dois fatores envolvidos.

Figura 63 - Plotagem dos resultados dos graus de desacetilação obtidos no fatorial 2².

Fonte: Autoria própria.

Dentro do nível de significância de 5%, foi possível verificar no diagrama de pareto os efeitos e interações entre temperatura e concentração de NaOH onde, mesmo dentro de uma faixa de significância para a concentração de NaOH, o fator realmente determinante que pode ser considerado como efeito principal é a temperatura que ocorrem na reação. E de acordo com o resultado não existem interações entre os dois fatores como esta representado no diagrama de Pareto na Figura 64. Estes resultados reafirmam o estudo feito anteriormente no fatorial 2³.

Figura 64 - Diagrama de pareto do fatorial 2².

Fonte: Autoria própria.

Para confirmação dos resultados das interações entre os dois fatores obtidas pelo diagrama de pareto, foram feitas novas análises separadamente pelo software MINITAB17. Segue a Figura 65 das interações pelas retas paralelas ratificando de que as interações são baixas entre os dois fatores envolvidos e que os melhores resultados ocorreram nos níveis máximos.

Figura 65 - Interações entre os fatores do fatorial 2^2 .

Fonte: Autoria própria.

No gráfico de contorno da temperatura ($^{\circ}\text{C}$) com a concentração de NaOH mostrado na Figura 66, é possível ver a evolução do grau de desacetilação em relação as faixas de diferentes tonalidades de verde alcançando a faixa máxima no que seria o ponto ótimo dos resultados na tonalidade de verde mais escura, em que, de fato os maiores resultados do grau de desacetilação, foram obtidos nos maiores níveis de temperatura e concentração de NaOH.

Figura 66 - Gráfico de contorno da temperatura com a Concentração de NaOH do fatorial 2².

Fonte: Autoria própria.

Como mencionado nos resultados do planejamento experimental 2³, a superfície de resposta é uma ferramenta estatística utilizada para a modelagem e análise no fatorial completo onde a variável resposta é influenciada pelos fatores envolvidos e com o objetivo de uma otimização da resposta, pode ser verificado na Figura 67 uma leve inclinação e no ponto máximo desta inclinação os níveis máximo dos fatores envolvidos indicando o ponto ótimo dos resultados do grau de desacetilação obtido.

Figura 67 - Superfície de resposta Fatorial completo 2².

Fonte: Autoria própria.

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES DA MODELAGEM MATEMÁTICA DO NÚCLEO NÃO REAGIDO (SHRINKING CORE MODEL) PARA REAÇÃO DE DESACETILAÇÃO

De acordo com os resultados das alíquotas obtidas ao longo da reação de desacetilação, foi possível verificar um padrão de comportamento, em que nos quarenta minutos iniciais a reação ocorreu com alta velocidade até atingir o ponto crítico em torno de sessenta minutos, e em seguida começa estabilizar. Devido a boa repetibilidade dos resultados da triplicata genuína do ponto central do fatorial 2^3 , e dos sete experimentos apresentarem um padrão de comportamento, foi possível adequar um modelo matemático que se aproximasse ao máximo do que ocorre durante a reação.

O modelo matemático adotado no estudo foi o modelo do núcleo não reagido (“shrinking core model”), como mencionado na revisão bibliográfica. Ele descreve a reação através do uso de equações matemáticas, para uma reação heterogênea envolvendo um sólido e um líquido. As partículas de quitosana são o sólido, em um líquido, no caso é uma solução aquosa que se refere a solução de hidróxido de sódio, onde a reação ocorre a partir da camada mais externa em direção ao núcleo do sólido, atingindo valores de conversão entre 85% e 90%.

A reação, portanto envolve um sólido B e um líquido A formando produtos sólidos e fluidos seguindo o modelo de núcleo não reagido (“shrinking core model”). Este modelo, originalmente desenvolvido para reações gás-sólido, também pode ser igualmente aplicado para reações líquido-sólido e supõe que a reação se dá em uma interface bem definida dentro da partícula, separando o núcleo não reagido de uma camada externa através da qual o reagente na fase fluida tem que difundir para atingir o local da reação.

Seja uma reação química entre um componente A na fase fluida (gás ou líquido) reagindo com o sólido B (na forma de uma partícula esférica), formando produto C na fase fluida (gás ou líquido) e um produto sólido D:

Onde b é o coeficiente estequiométrico, a reação ocorrendo em uma partícula isotérmica de raio externo R. Neste modelo, a reação é suposta ocorrer em uma

interface bem definida separando um núcleo central contendo o sólido não reagido B (não poroso) e uma camada externa do produto sólido D (em algumas aplicações, esta camada é chamada de “cinzas”).

A solução externa à partícula está com uma concentração de A, C_{As} . Do lado de fora da partícula, pode haver uma resistência à transferência de massa externa à partícula, representada matematicamente por um coeficiente de transferência de massa k_f , que é função da velocidade relativa entre o fluido e a partícula (ou do nível de agitação do fluido) (alguns autores se referem a isso como um “filme de líquido”, usando a chamada teoria do filme estagnado para a transferência de massa).

O reagente A precisa se difundir dentro da partícula através da camada externa porosa reagida do produto D, onde não há mais o reagente B, até atingir a interface do núcleo não reagido, cujo raio, num dado instante, é r_c . Nesta interface em $r=r_c$ ocorre a reação entre A e B, consumindo B e com isso fazendo com que o núcleo não reagido gradativamente tenha seu tamanho reduzido.

Supõe-se, neste modelo que o tamanho externo da partícula R não se altere, ocorrendo apenas a redução do tamanho do núcleo não reagido. Supõe-se, também que a concentração do reagente A na solução externa (C_{As}) é mantida constante. A Figura 68 ilustra esquematicamente a situação descrita por este modelo.

Figura 68 - Modelo do núcleo não reagido para reação de desacetilação da quitosana.

Fonte: Modificada de Jiang e Xu, 2006.

Considerando a ocorrência destas três resistências em série (a transferência de massa externa, a difusão na camada porosa já reagida, e a reação química na interface do núcleo não reagido), e que no instante inicial ($t=0$) a conversão de B é zero, é possível demonstrar (Levenspiel, 1972) que a relação entre a conversão do sólido B, X_B e o tempo t , é dada por:

$$t = \tau_f[X_B] + \tau_d[1 - 3(1 - X_B)^{2/3} + 2(1 - X_B)] + \tau_r[1 - (1 - X_B)^{1/3}] \quad \text{Equação (7)}$$

$$\tau_r = \frac{\rho_B R}{k_r b C_{As}} \quad \text{Equação (8)}$$

$$\tau_d = \frac{\rho_B R^2}{6 D_e b C_{As}} \quad \text{Equação (9)}$$

$$\tau_f = \frac{\rho_B R}{3 k_f b C_{As}} \quad \text{Equação (10)}$$

Onde ρ_B é a massa específica de B, b é o coeficiente estequiométrico de B na reação química, R é o raio externo da partícula (esférica), C_{As} é a concentração de A na solução externa à partícula, k_r é a constante cinética de reação química entre A e B, k_f é o coeficiente de transferência de massa do componente A entre a solução externa e a superfície externa da partícula, e D_e é a difusividade efetiva do componente A através dos poros da camada já reagida. A relação entre a conversão do sólido B, X_B , e o raio do núcleo não reagido, r_c , é:

$$X_B = 1 - \left(\frac{r_c}{R}\right)^3 \quad \text{Equação (11)}$$

Se apenas uma das três resistências ao processo for limitante, a Equação relacionando o tempo com a conversão de B se simplifica para os seguintes casos particulares:

Controle pela reação química

$$\frac{t}{\tau_r} = 1 - (1 - X_B)^{1/3} \quad \text{Equação (12)}$$

Controle pela difusão na camada reagida

$$\frac{t}{\tau_d} = 1 - 3(1 - X_B)^{2/3} + 2(1 - X_B) \quad \text{Equação (13)}$$

Controle pelo transporte de massa externo

$$\frac{t}{\tau_f} = X_B \quad \text{Equação (14)}$$

Como observado por Froment e Bischoff (1990), o caso de controle pela reação química não seria consistente com a existência de uma interface de reação bem definida (no entanto, pode ser consistente se o núcleo, isto é, sólido B, for não poroso). No caso da reação de desacetilação da quitina para formar quitosana, ocorre reação entre os ânions hidróxido da solução aquosa (A) com os grupos acetamida (B) da estrutura da quitina formando ânions acetato em fase aquosa (C) e grupos amina na estrutura (D), convertendo o polímero sólido em quitosana. A desacetilação é usualmente realizada em etapas sequenciais, de maneira que se aplica também a desacetilação da quitosana (para aumentar o grau de desacetilação) como segue na Figura 69.

Figura 69 - Reação de desacetilação.

Fonte - Modificada de Jiang e Xu, 2006.

O modelo de núcleo não reagido foi aplicado no trabalho de Jiang e Xu (2006) para estudar este tipo de processo de desacetilação de β -quitina, em três etapas sequenciais, onde foi definido o grau de conversão na forma:

$$X_B = \frac{DD - DD_0}{100 - DD_0} \quad \text{Equação (15)}$$

Onde GD é o grau de desacetilação num dado instante e GDo é o grau de desacetilação inicial. Os perfis experimentais de GD versus tempo mostraram um período inicial com significativa variação no grau de desacetilação, seguido por período em que o grau de desacetilação se estabiliza e quase não varia. Por isso, os autores aplicaram o modelo de núcleo não reagido, mas separadamente para duas diferentes faixas de intervalo de tempo, uma faixa inicial de 0 a 15 minutos de reação, e outra faixa para tempos de 15 a 30 minutos, sendo que se observou que o grau de desacetilação praticamente se estabiliza e não mais varia significativamente após 40 minutos até 120 minutos.

No presente trabalho, também foi desenvolvido um modelo de núcleo não reagido para interpretar quantitativamente os dados cinéticos medidos para o processo de desacetilação de quitosana. No entanto, diferentemente do trabalho de Jiang e Xu (2006), no presente trabalho o modelo de núcleo não reagido foi aplicado para todo o conjunto de dados ao longo tempo (e não separadamente em diferentes períodos de tempo). Esta decisão foi tomada para obter um modelo capaz de prever o andamento do processo de desacetilação para todo o período de tempo de reação, de maneira a tornar o modelo mais útil para previsões. Para tanto, algumas modificações tiveram que ser introduzidas no modelo, conforme será explicado adiante.

A comparação destas equações (12), (13) e (14) com os dados experimentais do ensaio 1 está mostrada na Figura 70 (apenas um ensaio está mostrado, os demais forneceram resultados similares). Nesta Figura está colocado graficamente o valor do segundo membro das equações (12), (13) e (14), $f(X_B)$, em função do tempo t . As equações preveem uma relação linear (reta passando pela origem), mas os dados experimentais não apresentam o comportamento previsto por estas equações (não estão alinhados em uma reta).

Conclui-se, portanto, que nenhuma das equações testadas (controle pela reação química, controle pela transferência de massa externa, e controle pela difusão na camada reagida) se aplica satisfatoriamente ao fenômeno. Tampouco uma combinação linear destas três equações, similar à Equação (7), daria resultado satisfatório, pois, neste caso, os pontos estariam entre as curvas lá apresentadas, portanto também não apresentariam um comportamento linear.

Figura 70 – Gráfico com os testes das equações (12), (13) e (14) com os dados do ensaio 1.

Fonte: Autoria própria.

Este mesmo comportamento dos dados experimentais é observado nos trabalhos da literatura sobre desacetilação de quitina e de quitosana (Jiang e Xu, 2006; Cardoso, 2008; Lamarque et al., 2004; Ahlafi et al., 2013; Chen et al., 2004; Martinou et al., 1995; Methacanon et al., 2003; Chang et al., 1997), em que se observa que a conversão aumenta rapidamente no início do processo, mas depois a velocidade da reação diminui significativamente e a conversão praticamente tende a se estabilizar em um patamar de conversão incompleta, como mostrado na Figura 70, mesmo ainda existindo reagente (hidróxido) em grande excesso na solução. Por isso, este modelo precisa ser modificado para incorporar elementos que consigam reproduzir corretamente o comportamento observado nos dados experimentais apresentados na Figura 71.

Figura 71 – Gráfico com dados experimentais de conversão (grau de desacetilação) versus tempo para o ensaio 1.

Fonte: Autoria própria.

O primeiro aspecto a observar é que nenhuma das equações do modelo do núcleo não reagido (equações (12), (13) e (14)) prevêem que a conversão final da reação atinja um patamar em valor de conversão abaixo de 100%. Todas as três equações (i.e., qualquer que seja o fenômeno limitante que controla o processo) prevêem uma conversão de 100% para tempos longos. Isto claramente não é observado nos dados experimentais.

Com base nas informações da literatura (Ahlaifi et al, 2015; Galed et al., 2005; Rinauldo, 2006; Anitha et al., 2014; Lamarque et al., 2004; Chang et al., 2006; Martinou et al., 1995; Methacanon et al., 2002; Cardoso et al., 2008), a observada queda da velocidade de reação de desacetilação e a conseqüente obtenção de uma conversão final num patamar entre 85% e 90% não atingindo o patamar de 100% de desacetilação é explicada primeiramente pelas características da α -quitina, que é a quitina que deu origem a quitosana utilizada, sua estrutura é extremamente organizada, o que influencia de forma significativa na difusividade da reação pela dificuldade da acessibilidade aos sítios reativos da quitosana pela disposição antiparalela das lamelas da cadeia. A segunda explicação é pela quitosana se

caracterizar por ser um material semicristalino onde a região amorfa ao redor da estrutura da quitosana, permite maior acessibilidade aos sítios reativos (grupos acetamida das cadeias da quitosana) e na região cristalina a reação difusiva ocorre com maior dificuldade. A terceira explicação para a queda da velocidade da reação, é devido a porosidade da quitosana, onde durante a reação ficam retidos nos poros os subprodutos ou sólidos devido a despolimerização das cadeias durante a reação, dificultado o acesso aos sítios reativos da estrutura.

Além do que foi acima mencionado, durante o processo de desacetilação, também ocorre degradação das cadeias do polímero, colaborando para dissolver parte do polímero no meio e dentro dos poros, causando um aumento da viscosidade e assim colaborando também para dificultar a difusão. De acordo com Jiang e Xu (2006), a explicação para compreensão por que ocorre a estabilização da reação desacetilação, após quarenta minutos de reação com alta velocidade, é explicada primeiramente, por que a reação ocorre preferencialmente da região amorfa da quitina e posteriormente para região cristalina partindo da parte externa em direção ao interior. A segunda razão que explica por que ocorre a estabilização da reação é que devido a estrutura da quitosana, onde o reagente se difunde através da partícula que envolve o filme na superfície do sólido com certa resistência. E a terceira explicação é pela existência de poros grandes na parte mais externa da fase cristalina, que facilitam a difusão, permitindo o OH^- se infiltrar com maior facilidade na parte mais externa da estrutura cristalina e com maior dificuldade na parte interna onde os poros possuem diâmetros menores. O processo é portanto, controlado por uma reação superficial. Desta forma, a medida que a reação prossegue, a difusão torna-se cada vez mais importante, sendo que inicialmente a reação ocorre com mais facilidade na parte externa e depois é controlada pelo processo difusivo. Já que partimos de uma quitosana com grau de desacetilação de 75%, a resistência da difusão torna-se cada vez maior ao longo do tempo da reação heterogênea de desacetilação. Quando ocorre a reação na parte externa do sólido, diminui a quantidade de grupos acetamida na superfície da quitosana e o processo difusivo começa a ocorrer na camada já reagida de quitosana com maior dificuldade.

Dessa forma, com base nestas informações e discussões da literatura, dentre as três possibilidades de fenômeno limitante e controlador do processo de desacetilação, partindo de uma quitosana com grau de desacetilação de 75%, foi

adotado o modelo de limitação pela difusão nos poros da camada reagida, Equação (13), que pode ser escrito na forma que consta na Equação (16):

$$t = \frac{\rho_B R^2}{6D_e b C_{As}} \{1 - 3(1 - X_B)^{2/3} + 2(1 - X_B)\} \quad \text{Equação (16)}$$

Além disso, para levar em conta o fenômeno observado experimentalmente de redução gradativa da velocidade de desacetilação, e as explicações de que tal fenômeno estaria ligado à redução da difusão no reagente na estrutura da quitosana, adotou-se adicionalmente que a difusividade efetiva sofre uma redução com o aumento da conversão, ou seja, $D_e = g(X_B)$.

Em princípio, diferentes formas matemáticas poderiam ser testadas para modelar esta redução da difusividade efetiva, para verificar qual forma melhor captaria o comportamento dos dados experimentais.

A forma mais simples, inicialmente testada, foi uma Equação linear:

$$D_e = D_{e0}(1 - KX_B) \quad \text{Equação (17)}$$

a qual contém um novo parâmetro, K, para representar a queda da difusividade com o aumento da conversão X_B .

Adotando desta forma, a Equação (16) pode ser reescrita na forma da Equação 18:

$$t = \frac{\rho_B R^2}{6D_{e0} b C_{As}} \frac{[1 - 3(1 - X_B)^{2/3} + 2(1 - X_B)]}{(1 - KX_B)} \quad \text{Equação (18)}$$

ou ainda, na forma da Equação 19:

$$t = \frac{A}{C_{As}} \frac{[1 - 3(1 - X_B)^{2/3} + 2(1 - X_B)]}{(1 - KX_B)} \quad \text{Equação (19)}$$

onde $A = (\rho_B R^2 / (6 D_{e0} b))$ é uma constante. Esta Equação, que contém dois parâmetros ajustáveis, A e K, foi então testada para o ajuste dos dados experimentais.

Uma primeira verificação simples para saber se a Equação (17) é ou não adequada pode ser feita através de uma transformação da Equação (19) na forma linearizada:

$$\frac{1 - 3(1 - X_B)^{2/3} + 2(1 - X_B)}{C_{As} t} = \frac{1}{A} - \frac{K}{A} X_B \quad \text{Equação (20)}$$

Um teste visual da Equação (20) pode ser feito fazendo um gráfico de $[1 - 3(1 - X_B)^{2/3} + 2(1 - X_B)]/(C_{As}t)$ em função de X_B ; se os dados experimentais se apresentarem alinhados, a Equação (20) será capaz de representar adequadamente o comportamento da conversão X_B em função do tempo t . A Figura 72 apresenta este teste.

Este gráfico mostra um comportamento aproximadamente linear dos pontos de cada um dos ensaios mostrados. Isto fornece uma indicação qualitativa de que a Equação (20), e portanto a Equação (18), tem uma forma matemática capaz de representar apropriadamente o fenômeno em estudo.

Figura 72 - Teste da Equação (20) para a queda da difusividade

Fonte: Autoria própria.

Verificada a validade da Equação (17) para o fenômeno em estudo, foi realizado o ajuste da Equação (19) aos dados experimentais de cada ensaio. O ajuste foi realizado em planilha Excel, usando o critério de mínimos quadrados:

$$\min \Phi(\tau_{d0}, K) = \sum_{i=1}^N [t_{calc}(\tau_{d0}, K, X_{B,exp,i}) - t_{exp,i}]^2 \quad \text{Equação (21)}$$

onde t_{calc} foi calculado usando a Equação (19). Para a minimização da soma dos resíduos quadráticos foi usado o comando Solver do Excel. A adoção do ajuste usando os valores de t (tempo) como variável dependente, embora não seja a melhor opção do ponto de vista estatístico, permite simplificar sobremaneira os cálculos envolvidos no procedimento de ajuste do modelo. A opção oposta, ou seja, a de usar X_B como variável dependente, implicaria em resolver iterativamente a Equação (19) para obter $X_B(t)$, ao passo que o cálculo de $t(X_B)$ é direto e não requer procedimento iterativo. A estimativa inicial dos parâmetros pode ser obtida a partir do ajuste de uma reta a cada um dos conjuntos de dados da Figura 71.

Numa primeira abordagem, o ajuste dos parâmetros A e K da Equação (19) foi feito individualmente para cada ensaio, resultando os valores mostrados na Tabela 8, e na Figura 73.

Tabela 8 - Valores dos parâmetros A e K ajustados individualmente para cada ensaio.

Experimentos	CAs (%)	T (°C)	A (min.%)	K
1	20	80	9617	2,22
2	20	110	5608	1,75
3	60	80	5988	2,22
4	60	110	14950	1,45
5,6,7	40	95	15807	1,82

Na Tabela 8 observa-se que o parâmetro A parece não apresentar uma tendência clara em relação à temperatura nem à concentração da NaOH, e o parâmetro K parece ter uma tendência de diminuir com o aumento da temperatura mas não apresenta uma tendência clara com relação à concentração. Isto pode ser verificado na Figura 74.

Figura 73 - Ajuste da Equação (19) para cada ensaio separadamente.

Fonte: Autoria própria.

Com base nesta observação, pode-se admitir que o valor do parâmetro K diminui com o aumento da temperatura de maneira aproximadamente linear, na faixa de valores estudados. Por outro lado, o parâmetro A não apresenta uma tendência clara de variação nem com a temperatura e nem com a concentração de NaOH no meio reacional.

Figura 74 - Verificação da variação dos parâmetros ajustados K e A com a temperatura e com a concentração de NaOH.

Fonte: Autoria própria.

Desta maneira, decidiu-se acrescentar uma dependência linear de K com a temperatura, na forma:

$$K = B - CT \quad \text{Equação (22)}$$

onde B e C são dois novos parâmetros, e também admitir que o valor de A é fixo na faixa estudada de temperatura e concentração.

Dessa forma, o modelo generalizado fica escrito na forma:

$$t = \frac{A}{C_{As}} \frac{[1 - 3(1 - X_B)^{2/3} + 2(1 - X_B)]}{[1 - (B - CT)X_B]} \quad \text{Equação (23)}$$

contendo agora 3 parâmetros (A, B e C). Esta Equação deverá ser capaz de ajustar simultaneamente os dados experimentais de todos os 7 ensaios realizados.

O resultado do ajuste simultâneo da Equação (23) aos diferentes ensaios experimentais está mostrado na Figura 75. Observa-se que o ajuste é satisfatório (embora, obviamente, com maiores desvios do que quando se ajustou o modelo separadamente para cada ensaio).

Figura 75 - Ajuste da Equação (19) e (22) para todos os ensaios simultaneamente

Fonte: Autoria própria.

Os valores ótimos dos parâmetros ajustados simultaneamente para todos os 7 ensaios foram: $A = 8646 \text{ (min.\%)}$, $B = 3,72$ e $C = 0,019 \text{ (}^{\circ}\text{C)}^{-1}$. O modelo obtido (Equação 23 com os valores dos parâmetros dados acima) é capaz de representar adequadamente os dados experimentais de todos os ensaios realizados e é preditivo para outras condições de temperatura e concentração de NaOH dentro das faixas estudadas.

4.4 RESULTADOS E DISCUSSÕES SOBRE AS NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA OBTIDAS APÓS O TRATAMENTO DE ULTRASSOM

Como já foi mencionado, as amostras de quitosana com alto grau de desacetilação foram atingidas, sendo que de acordo com os resultados, as que tiveram os valores próximos ou igual a 90% foram justamente as obtidas após a reação sob os níveis máximos de temperatura e concentração de NaOH no tempo e seis horas. A amostra de quitosana do resultado do experimento 4 do fatorial 2^2 com grau de desacetilação de 89,41% foi submetida ao ultrassom, tendo uma quantidade razoável para testes iniciais.

Primeiramente é importante mencionar o comportamento do material na solução tampão, onde foram utilizadas soluções tampões de pH 4,1 , pH 4,7 e o pH intermediário de 4,4 na proporção 1mL/2mg de quitosana na solução, todas as soluções tiveram um aquecimento quando submetidas ao ultrassom. Para compreender este aquecimento vamos lembrar como o fenômeno de cavitação influencia para que isso ocorra.

A cavitação é um fenômeno que ocorre devido as ondas sonoras emitidas pelo equipamento ultrassônico de acordo com as referências (Nhaghibzadeh et al., 2010; Gharedaghi et al., 2012; Davidson et al., 1987; Tang et al., 2003), a alta frequência de 20Khz que passam através do líquido, gera a formação de bolhas que causam um colapso implosivo, essas bolhas são geradas pelos movimentos de ondas de compressão e descompressão.

A onda de compressão comprime a cavidade das bolhas, então outra onda de expansão a re-expande, ocorrendo uma oscilação nesta bolha cerca de 20 mil vezes por segundo. Onde nesta bolha a área da superfície de expansão é um pouco maior do que a de compressão, então os processos em crescimento são cineticamente mais rápidos do que os processos de retração desta bolhas de acordo com as referências (Nhaghibzadeh et al., 2010; Gharedaghi et al., 2012; Davidson et al., 1987; Tang et al., 2003).

Quando a bolha está em ressonância, ela se torna bem acoplada para o campo sonoro, estes choques contínuos e as rupturas violentas das bolhas após atingir o ápice de energia contida, geram aquecimento na solução, o calor não tem tempo para fluir, de modo que um local muito localizado e transitório se forma, e aquele calor fica retido, este fenômeno se chama hot-spot também de acordo com as referências

(Nhaghibzadeh et al., 2010; Gharedaghi et al., 2012; Davidson et al., 1987; Tang et al., 2003).

Desta forma, ocorre um aquecimento inicialmente linear da temperatura até o tempo de 480 segundo onde começa a estabilizar, este comportamento não foi influenciado pelos diferentes pHs utilizados, segue a triplicata de de resultados das medições de temperatura feitas durante a análise dos três diferentes pHs das soluções tampoes, após submetidas ao ultrassom nos tempos de: 120 segundos, 240 segundos, 360 segundos, 480 segundos, 600 segundos, 720 segundos e 900 segundos. Os resultados estão nas Tabelas 9 e 10 e 11 e a triplicata esta demonstrada em gráficos para melhor visualização da similaridade dos resultados.

Tabela 9 - Resultados da medição de temperatura pH 4,1.

Tempo (segundos)	Temperatura (°C) 1º medição	Temperatura (°C) 2º medição	Temperatura (°C) 3º medição
0	25,0	25,0	25,0
120	41,5	42,0	43,0
240	54,5	54,0	55,0
360	59,0	59,2	59,5
480	60,0	60,0	61,0
600	63,0	62,5	63,0
720	63,0	63,0	63,0
900	63,0	63,0	63,0

Nos resultados do perfil de temperatura após submeter ao ultrassom as amostras de quitosana, foi possível verificar que de fato ocorre um aumento de temperatura devido o processo de cavitação, e que após o tempo de oito minutos a temperatura tende a estabilizar como pode ser visto na Figura 73 que consta os resultados da triplicata genuína do perfil de temperatura.

Nos resultados não ocorreu alteração do perfil de temperatura mesmo com a alteração do pH, e as medições foram feitas em dias alternados e a temperatura ambiente nos dias que foram feitas as medições se mantiveram na temperatura de 25°C como pode ser visto nas Tabelas 9, 10 e 11.

Figura 76 - Resultados da triplicata do perfil de temperatura da medição em pH 4,1.

Fonte - Autoria própria.

Segue os resultados do perfil de temperatura para o pH 4,4 mantendo as mesmas temperaturas independente da alteração do pH na Tabela 10.

Tabela 10 - Resultados da medição de temperatura pH 4,4.

Tempo (segundos)	Temperatura (°C) 1º medição	Temperatura (°C) 2º medição	Temperatura (°C) 3º medição
0	25,0	25,0	25,0
120	43,0	42,5	43,0
240	55,0	53,5	54,0
360	59,0	60,0	59,5
480	61,0	61,0	61,0
600	62,5	62,5	63,0
720	63,0	63,0	63,0
900	63,0	63,5	63,0

Segue na Figura 77 o perfil de temperatura da triplicata genuína, para o pH 4,4, e de acordo com os resultado foi possível verificar no gráfico o mesmo perfil de comportamento para pH 4,1.

Figura 77 - Resultados da triplicata do perfil de temperatura da medição em pH 4,4.

Fonte: Autoria própria.

Tabela 11 - Resultados da medição de temperatura pH 4,7.

Tempo (segundos)	Temperatura (°C) 1º medição	Temperatura (°C) 2º medição	Temperatura (°C) 3º medição
0	25,0	25,0	25,0
120	42,0	42,0	43,0
240	55,0	55,5	55,0
360	59,5	60,0	59,5
480	61,0	61,0	61,0
600	63,0	62,5	63,5
720	63,0	63,0	63,5
900	63,0	63,0	63,5

Segue na Figura 78 os resultados da triplicata genuína de medições de temperatura, para o perfil de temperatura para pH 4,7 onde pode ser verificado que não ocorreu alteração dos valores, mantendo um perfil de temperatura independente do pH.

Figura 78 - Resultados da triplicata do perfil de temperatura da medição em pH 4,7.

Fonte: Autoria própria.

As amostras de quitosana após submetidas ao ultrassom foram feitas a verificação de seu potencial zeta, de seu diâmetro hidrodinâmico e verificação de seu índice de polidispersão no equipamento Nano-Zetasizer – ZS, modelo ZEN3600 - Malvern Instruments, que pelo software Zetasizer 7.11, mostrando os resultados da evolução dos tamanhos das partículas de acordo com o aumento do tempo de ultrassom.

Antes de inserir os resultados vamos relembrar os conceitos de potencial zeta, índice de polidispersão e diâmetro hidrodinâmico. O potencial zeta verifica a estabilidade da quitosana em suspensão, onde a medida se fundamenta na carga superficial da partícula influenciada pelo meio, onde quanto maior o seu valor mais provável a estabilidade em suspensão nesta solução e maior probabilidade das partículas carregadas se afastem evitando a agregação de acordo com as referências (Xu, 2008; Tavares, 2011; Mora- Huertas et al., 2010; Zheng e Kosaraju, 2007; Rampino et al., 2013).

O índice de polidispersão se caracteriza por dar a informação da homogeneidade ou heterogeneidade da distribuição de tamanho das nanopartículas estudadas, sendo que este valor pode variar entre 0 e 1. Enquanto que o diâmetro hidrodinâmico fornece a informação do tamanho médio das nanopartículas, este tamanho pode ser influenciado pela agregação entre as partículas sendo determinado pelo

espalhamento de luz dinâmico de acordo com as referências (Xu, 2008; Tavares, 2011; Mora- Huertas et al., 2010; Zheng e Kosaraju, 2007; Rampino et al., 2013).

O índice de polidispersidade é uma medida de homogeneidade de dispersão, onde valores próximos de zero indicam uma dispersão homogênea, e valores maiores que 0,3 indicam heterogeneidade entre os tamanhos da partículas na solução. O tamanho das nanopartículas de quitosana e sua distribuição de tamanho, depende da concentração em solução, seu peso molecular, as condições da mistura, seu pH e o tempo e frequência de ultrassom. Sendo a solução termodinamicamente instável após o ultrassom, a carga superficial positiva de partículas de quitosana (NH_3^+) podem resultar em maior ou menor estabilidade de partículas em suspensão pela repulsão eletrostática informações de acordo com as referências (Xu, 2008; Tavares, 2011; Mora- Huertas et al., 2010; Zheng e Kosaraju, 2007; Rampino et al., 2013).

De acordo com a literatura (Xu, 2008; Tavares, 2011; Mora- Huertas et al., 2010; Zheng e Kosaraju, 2007; Rampino et al., 2013), pHs menores tendem a elevar o potencial zeta, de acordo com os resultados realmente com a diminuição do pH ocorreu um aumento significativo do potencial zeta, como pode ser visto nos Tabelas 11, 12 e 13, que constam os resultados para as soluções com pHs diferentes. Os índices de polidispersão foram altos para resultado de pH 4,1 e para o pH 4,8, mostrando portanto que ocorreu alta heterogeneidade na solução. Os melhores resultados ocorreram no pH 4,4, tendo uma maior estabilidade de resultados em relação a média de tamanho de partículas, índice de polidispersão com valores menores que 0,3 resultando em uma solução mais monodispersa.

Alguns fatores podem influenciar nos resultados de potencial zeta como degradação e agregação, este fenômeno pode ter ocorrido nos resultados dos potenciais que vão diminuindo após serem submetidos a tempos maiores de ultrassom. Desta forma, seguem as Tabelas com os resultados das médias das triplicatas do potencial zeta, do índice de polidispersão e do diâmetro hidrodinâmico das partículas obtidas após ultrassom, nas Tabelas 11, 12 e 13.

Tabela 12 - Resultados das nanopartículas em pH 4,1.

Tempo (segundos)	Tamanho hidrodinâmico (nm)	Desvio padrão (nm)	Intensidade (%)	Índice de polidispersão	Potencial Zeta (mV)
120	1791,00	151,00	92,00	0,53	68,90
240	1569,00	237,00	100,00	0,56	68,70
360	1570,00	136,00	100,00	0,52	68,20
480	1271,00	164,00	100,00	0,57	67,10
600	1074,00	99,00	100,00	0,57	67,05
720	948,00	94,30	100,00	0,57	66,40
900	768,00	83,00	100,00	0,57	66,40

Tabela 13 - Resultados das nanopartículas em pH 4,4.

Tempo (segundos)	Tamanho hidrodinâmico (nm)	Desvio padrão (nm)	Intensidade (%)	Índice de polidispersão	Potencial Zeta (mV)
120	1867,00	281,00	100,00	0,31	57,90
240	1084,00	211,00	100,00	0,30	57,90
360	875,00	113,00	100,00	0,28	57,80
480	716,00	115,00	100,00	0,28	57,50
600	649,90	141,00	100,00	0,27	57,00
720	589,00	89,00	100,00	0,27	56,60
900	373,00	77,00	95,00	0,27	55,50

Tabela 14 - Resultados das nanopartículas em pH 4,7.

Tempo (segundos)	Tamanho hidrodinâmico (nm)	Desvio padrão (nm)	Intensidade (%)	Índice de polidispersão	Potencial Zeta (mV)
120	2189,00	890,00	90,90	0,58	25,00
240	1142,00	304,60	100,00	0,48	24,50
360	870,00	310,00	100,00	0,41	23,90
480	767,00	153,00	100,00	0,41	23,20
600	714,00	161,00	100,00	0,40	23,00
720	573,00	154,00	100,00	0,40	23,00
900	583,00	123,00	100,00	0,40	22,90

Tendo os resultados representados no gráfico da Figura 79, onde esta sendo comparado a evolução para obtenção de partículas com escala menores para diferentes pHs, é possível concluir que os menores valores em relação ao diâmetro hidrodinâmico foram para as partículas em pH 4,4, e que os resultados foram muito próximos mantendo um padrão muito semelhante de resultados.

Figura 79 - Comparação de resultados dos três de pH.

Fonte - Autoria própria.

De acordo com os resultados, é possível concluir que os menores valores em relação ao índice de polidispersão foram para as nanopartículas em pH 4,4, as partículas com menores valores de diâmetro hidrodinâmico foram também para o pH 4,4, assim como também bons resultados do potencial zeta (maiores que 30mv), permitindo desta forma uma maior estabilidade das partículas em solução tendo portanto resultados próximos com o que consta no artigo escrito por Gharedaghi et al., 2012.

De acordo com os resultados acima obtidos, as amostras de 120 segundos, de 480 segundos e de 900 segundos foram submetidas as análises de MEV para verificar o diâmetro das partículas e se ocorreu agregação. Tendo como resultados das menores partículas na escala de micrometros.

Para compreender como ocorreu a evolução dos picos, referentes aos diâmetros hidrodinâmicos das nanopartículas, foi analisada a quitosana inicial sem ser submetida ao ultrassom, e foram verificados os picos principais como esta representado na Figura 80 e logo em seguida a Figura 81 com as imagens obtidas pela análise do MEV para comparação de resultados dos diâmetros.

Segue a representação dos picos, podendo visualizar que inicialmente já existia uma pequena escala de partículas em escala nanométrica em torno de 100

nm. E que a maior quantidade das partículas estavam em torno de 1700 nanômetros . Mostrada no gráfico da Figura relacionando tamanho (nm) e intensidade (%).

Figura 80 - Picos referentes a quitosana inicial.

Fonte - Autoria própria.

Figura 81 - Imagem das partículas de quitosana inicial.

Fonte: Autoria própria.

De acordo com os resultados do equipamento Nano-Zetasizer, e dos resultados das imagens obtidas pelo MEV, o pico referente a tamanhos de partículas

maiores em torno de 5000nm foram encontradas na imagem representada na Figura 81 podendo afirmar que ambos os equipamentos obtiveram resultados semelhantes.

Após o tempo de dois minutos foi possível verificar que os resultados tenderam para um pico só em torno de 1800 nm, que foram encontrados nas imagens obtidas pelo equipamento MEV como pode ser comparado na Figura 82 e na Figura 83.

Figura 82 - Gráfico do pico referente a quitosana após 120 segundos de ultrassom.

Fonte - Autoria própria.

Figura 83 - Imagem de MEV das partículas de quitosana após 120 segundos de ultrassom.

Fonte: Autoria própria.

De acordo com os resultados do equipamento Nano-Zetasizer, o pico referente ao diâmetro hidrodinâmico de partículas após 480 segundos de ultrassom

obtiveram resultados com uma média de 700 nm como mostra na Figura 84, e na imagem do MEV na Figura 85, foram encontradas diâmetros muito semelhantes.

Figura 84 - Pico referente a quitosana após 480 segundos de ultrassom.

Fonte - Autoria própria.

Figura 85 - Imagem de MEV das partículas de quitosana após 480 segundos de ultrassom.

Fonte: Autoria própria.

De acordo com os resultados do equipamento Nano-Zetasizer, o pico referente ao diâmetro hidrodinâmico de partículas após 900 segundos de ultrassom

obtiveram resultados com uma média de 350 nm como mostra na Figura 86, e na imagem do MEV foram encontradas diâmetros muito semelhantes no entanto para um aglomerado de nanopartículas como pode ser visualizado na Figura 87.

Figura 86 - Pico referente a quitosana após 900 segundos de ultrassom.

Fonte - Autoria própria.

Figura 87 - Imagem de MEV das partículas de quitosana após 900 segundos de ultrassom.

Fonte: Autoria própria.

As nanopartículas aglomeradas tiveram uma média de partículas em torno de 8nm, e pode ser visualizada por toda a amostra como segue na Figura 88, 89 e 90.

Figura 88 – Medidas de Nanopartículas de quitosana após 900 segundos de ultrassom.

Fonte: Autoria própria.

Figura 89 – Imagem de aglomerados de quitosana após 900 segundos de ultrassom.

Fonte: Autoria própria.

Figura 90 – Imagem das nanopartículas de quitosana após 900 segundos de ultrassom.

Fonte: Autoria própria.

Diante dos resultados, foi possível verificar a alta agregação das partículas que mascara os resultados do diâmetro hidrodinâmico verificado inicialmente pelas análises feitas pelo equipamento de espalhamento de luz dinâmico Nano-Zetasizer – ZS, modelo ZEN3600 - Malvern Instruments, esta agregação costuma a ocorrer de devido a alta carga superficial da quitosana e devido ao processo de cavitação que ocorre durante o tempo de ultrassom de acordo com as referências (Xu, 2008; Tavares, 2011; Mora- Huertas et al., 2010; Zheng e Kosaraju, 2007; Rampino et al., 2013; Nhaghibzadeh et al., 2010; Gharedaghi et al., 2012; Davidson et al., 1987; Tang et al., 2003).

5 CONCLUSÕES

Neste capítulo, constam as conclusões referentes a obtenção de quitosana com alto grau de desacetilação em torno de 90%, e a sua modificação para uma escala manométrica, para que com estas características possa ser utilizada no campo da engenharia de tecidos, auxiliando nas etapas de reparação tecidual após queimaduras graves (de segundo grau profundas ou de terceiro grau).

Para isso, a quitosana foi submetida a um meio altamente alcalino permitindo que o hidróxido de sódio na solução, reagisse e retirasse os grupos acetil da estrutura da quitosana, e deixando somente os grupos amina protonados. Para compreender, os fatores que mais influenciaram durante a reação, foram utilizados os planejamentos fatoriais completos 2^3 e 2^2 , analisados pelo software MINITAB17. Esta ferramenta estatística, permitiu concluir que o fator mais importante para o aumento do grau de desacetilação, no fatorial 2^3 , foi o tempo de reação, e para o fatorial 2^2 , foi a temperatura, onde em ambos os fatoriais, os melhores resultados ocorreram em seus níveis máximos. E que as interações foram baixas entre os fatores envolvidos.

Desta forma, no tempo de seis horas de reação, na concentração máxima de 60% de hidróxido de sódio e na temperatura de 110°C, foram obtidos os valores mais altos de grau de desacetilação chegando a atingir 90%. Durante a reação de desacetilação, foi possível verificar que com a retirada de 11 alíquotas durante o tempo de seis horas, a velocidade com que ocorre a reação nos primeiros 40 minutos é muito maior que no tempo restante, alcançando o ponto crítico em sessenta minutos e estabilizando até atingir os 360 minutos. Mantendo o mesmo padrão de comportamento para níveis diferentes de temperatura e concentração de NaOH dentro do fatorial completo 2^2 . com três repetições no ponto central.

De acordo, com os resultados do planejamento fatorial 2^2 , foi possível adequar um modelo matemático para a cinética da reação da desacetilação da quitosana, onde de acordo com os dados experimentais, o modelo do núcleo não reagido (Shrinking Core Model), foi o que mais se adequou para representar por meio de equações o modelo real do que ocorre com a partícula esférica sólida porosa da quitosana, quando em contato com a solução de hidróxido de sódio, reagindo da parte externa para o centro em especial pelo processo difusivo.

Alguns fatores influenciaram para que a cinética da reação ocorresse de forma mais acelerada no início da reação, tendendo a estabilizar após sessenta minutos. As

explicações baseadas em estudos anteriores são: primeiramente pela estrutura da quitosana, que pode ser originária de diferentes polimorfos, no caso a quitosana utilizada vem de uma α -quitina, que possui um arranjo que pode dificultar o acesso aos sítios reativos do polímero, devido à disposição das lamelas de forma antiparalela. A porosidade do material, é outro fator que influencia, onde os diâmetros dos poros na parte mais externa da região cristalina são maiores e mais ao centro vão diminuindo de tamanho. Afetando no aumento do grau de desacetilação. Outro fator, é devido a quitosana ser semicristalina, onde na região amorfa o acesso aos sítios reativos ocorre com maior facilidade do que na região cristalina. E por fim, a reação de desacetilação sob altas temperaturas e com grandes concentrações alcalinas tende a ocorrer despolimerização, deixando a solução mais viscosa e dificultado o acesso aos grupos acetamida.

Em relação aos resultados obtidos das nanopartículas, após submeter à quitosana com grau de desacetilação de 89% ao ultrassom, foi possível concluir que o pH tem grande influência sobre os resultados em relação à estabilidade das nanopartículas, e que os melhores resultados ocorreram no pH 4,4. Neste pH, foi obtido índice de polidispersão de 0,28, potencial zeta em torno de 57mV e partículas com cerca de 8nm que se aglomeraram após o tempo de 900 segundo de ultrassom. Possivelmente pela alta carga superficial que possui a quitosana, e pelo processo de cavitação que ocorre durante o tempo de ultrassom, os resultados do diâmetro hidrodinâmico feito pelo equipamento de espalhamento de luz dinâmico Nano-Zetasizer, pode não gerar resultados confiáveis em relação ao diâmetro hidrodinâmico, devido a possibilidade de agregação durante a análise, sendo recomendado o uso de outro equipamento para confirmação dos diâmetros das nanopartículas obtidas.

REFERÊNCIAS

1. MACEDO, J.; ROSA, S.; SANTOS, J. Complicações Infeciosas E Fatores Preditivos De Infecção. *Rev Soc Bras Cir Plast*, v. 22, n. 1, p. 34–38, 2007.
2. LEITÃO, E. GOMES, H.F.C.; SILVA, V.A.T.; SANTANA, R.V. Estudo epidemiológico de pacientes internados na unidade de tratamento de queimados do Hospital Geral de Vila Penteado - São Paulo. *Revista Brasileira de Cirurgia Plástica*, v. 29, n. 2, p. 264–268, 2014.
3. ANDRADE, A. G. DE; ALBUQUERQUE, A. K. B. DE. Efeitos do laser terapêutico no processo de cicatrização das queimaduras: uma revisão bibliográfica. v. 9, n. 1, p. 21–30, 2010.
4. OLIVEIRA, T. S. Assistência de enfermagem com pacientes queimados. v. 11, n. 1, p. 31–37, 2012.
5. ESKANDARLOU, M. MINA AZIMI, M.M.; RABIEE, S.; RABIEE, M.A.S. The Healing Effect of Amniotic Membrane in Burn Patients. v. 5, n. 1, p. 39–44, 2016.
6. LIMA, O.S; LIMA F.S; FILHO. O.F.S. Queimados: alterações metabólicas, fisiopatologia, classificação e interseções com o tempo de jejum.V.10, p.804-815, 2007.
7. KOTOBUKI, N. HIROSE, M.; TAKAKURA, Y.; OHGUSHI, H. Cultured autologous human cells for hard tissue regeneration: preparation and characterization of mesenchymal stem cells from bone marrow. *Artif Organs*, v. 28, n. 1, p. 33–39, 2004.
8. WU, Y. C.; SHAW, S.Y.; LIN, H.R.; LEE, T.M.; YANG, C.Y. Bone tissue engineering evaluation based on rat calvaria stromal cells cultured on modified PLGA scaffolds. *Biomaterials*, v. 27, n. 6, p. 896–904, 2006.
9. CROISIER, F.; JÉRÔME, C. Chitosan-based biomaterials for tissue engineering. *European Polymer Journal*, v. 49, n. 4, p. 780–792, 2013.
10. DAI, T.; TEGOS, G.P.; BURGATOVSKAYA, M.; CASTANO, A.P.; HAMBLIN, M.R. Chitosan acetate bandage as a topical antimicrobial dressing for infected burns. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 53, n. 2, p. 393–400, 2009.
11. JAYAKUMAR R.; DEEPTY.M. MANZOOR.K. Biomedical application of chitin and chitosan based nanomaterials – short review. V 82, p. 227-232, 2010.
12. BERTHOLD, A.; CREMER, K.; KREUTER, J. Preparation and characterization of chitosan microspheres as drug carrier for prednisolone sodium phosphate as model for anti-inflammatory drugs. *Journal of Controlled Release*, v. 39, n. 1, p. 17–25, 1996.

13. CHO, E. J.; HOLBACK, H. Nanoparticle characterization: state of the art, challenges, and emerging technologies. *Molecular pharmaceutics*, v. 10, n. 6, p. 2093–110, 2013.
14. ZHAO, L. M. ZHAO, M.; SHI, L.E.; ZHANG, Z.Z.; CHEN, J.M.; SHI, D.D.; YANG, J.; TAN, Z.X. Preparation and application of chitosan nanoparticles and nanofibers. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v. 28, n. 3, p. 353–362, 2011.
15. RAMPINO, A.; BORGOGNA, M.; BLASI, P.; BELLICH, B; CESARO, A. Chitosan nanoparticles: Preparation, size evolution and stability. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 455, n. 1–2, p. 219–228, 2013.
16. STEVENS, M.P. *Polymer Chemistry: An introduction*, Oxford University Press, New York, 1999.
17. MANO, E.B. *Introdução a Polímeros*, 2º edição, Editora Edgard Blucher LTDA, São Paulo, 1999.
18. CANEVAROLO JR., S. V. *Ciência dos Polímeros - Um texto básico para tecnólogos e engenheiros*. *Ciência dos Polímeros: um texto básico para tecnólogos e engenheiros*, p. 139–168, 2006.
19. YOUNG, R.J., Lovell, P. A., *Introduction to Polymers*, segunda edição, Chapman & Hall, London, 1994.
20. ODIAN, G., *Principles of polymerization*, terceira edição, John Wiley & Sons., New York, 1991.
21. KAPLAN D.L; MAYER J.M; BALL D., *Fundamentals of biodegradable polymers*, 2003
22. CHING, C.; KAPLAN, D.L.; THOMAS, E.L. *Biodegradable polymers and packaging*. Technomic Pub Co, Lancaster, p. 1–42, 2003.
23. CHANDRA, R.; RUSTGI, R. Biodegradable polymers. *Prog Polym Sci*, p.1273–1335, 1998.
24. BARBANTI, S. H.; ZAVAGLIA, C. A. C.; DUEK, E. A. R. Polímeros biorreabsorvíveis na engenharia de tecidos. *Polímeros*, v. 15, n. 1, p. 13–21, 2005.
25. GUILBOT A, MERCIER C The polysaccharides. In: Aspinall GO (ed) *Molecular biology*, vol 3. Academic Press Incorporation, New York, pp 209–282, 1985.
26. RINAUDO, M. Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in Polymer Science (Oxford)*, v. 31, n. 7, p. 603–632, 2006.

27. CAMPANA-FILHO, S. P.; BRITTO, D.; CURTI, E.; ABREU, F.R.; CARDOSO, M.B.; BATTISTI, M.V.; SIM, P.C.; GOY, R.C.; SIGNINI, R.; LAVALL, R.L. Extração, estrutura e propriedades de α e β -quitina. *Quimica Nova*, v. 30, n. 3, p. 644–650, 2007.
28. MUZZARELLI, R. A. A. Chitins and chitosans as immunoadjuvants and non-allergenic drug carriers. *Marine Drugs*, v. 8, n. 2, p. 292–312, 2010.
29. SHAMELI, K.; AHMAD, M.B.; ZARGAR, M.; YUNUS, W.M.Z.W.; IBRAHIN, N.A.; SHABANZADEH, P.; MOGHAGDAN, M.G. Synthesis and characterization of silver/montmorillonite/chitosan bionanocomposites by chemical reduction method and their antibacterial activity. *International journal of nanomedicine*, v. 6, p. 271–284, 2011.
30. TAYLOR, P.; SYNOWIECKI, J.; AL-KHATEEB, N. A. Critical Reviews in Food Science and Nutrition Production , Properties , and Some New Applications of Chitin and Its Derivatives Production , Properties , and Some New Applications of Chitin and Its Derivatives. n. November 2013, p. 37–41, 2010.
31. ANITHA, A.; SOWMYA, S.; KUMAR, S.; DEEPTHI, S.; CHENNAZHI, K.P.; EHRLICH, H.; TSURKAN, M.; JAYAKUMAR, R. Chitin and chitosan in selected biomedical applications. *Progress in Polymer Science*, v. 39, n. 9, p. 1644–1667, 2014.
32. CHEUNG, R.C.; NA, T.B.; WONG, J.H.; CHAN, W.Y. Chitosan: An Update on Potential Biomedical and Pharmaceutical Applications, *Marine Polysaccharides*, v. 13, n. 8, p 5156 - 5186; 2015
33. PILAR, F. D. Preparação de Filmes de Quitosana e Plga com Polipirrol para Aplicação na Regeneração Nervosa. v. 2, p. 100, 2014.
34. RODRIGUES, S.; DIONISIO, M.; LOPEZ, C.R.; GREHA, A. Biocompatibility of Chitosan Carriers with Application in Drug Delivery. *Journal of Functional Biomaterials*, v. 3, n. 4, p. 615–641, 2012.
35. HAMED ARAMI, ZACHARY STEPHEN, OMID VEISEH, AND M. Z. Chitosan-Coated Iron Oxide Nanoparticles for Molecular Imaging and Drug Delivery. *Advances in Polymer Science*, n. May 2012, p. 1–34, 2012.
36. KONG, M. CHEN, X.G.; XING, K.; PARK, H.J. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review. *International Journal of Food Microbiology*, v. 144, n. 1, p. 51–63, 2010.
37. CHUA, K.-G. NEOH, E.-T. KANG, W. WANG, Surface functionalization of titanium with hyaluronic acid/chitosan polyelectrolyte multilayers and RGD for

promoting osteoblast functions and inhibiting bacterial adhesion, *Biomaterials*, V.29, p. 1412-1421, 2008.

38. PRICE, M.G. BERRY, H.A. NAVSARIA, Hyaluronic acid: the scientific and clinical evidence, *Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery*, V.60, .p 1110-1119, 2007

39. FENG, G.; ZENG, P.; YANG, C. Self-assembly and characterization of polyelectrolyte complex films of hyaluronic acid/chitosan, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, V.5, p. 257–258, 2005.

40. ROMANOVA, O. A.; GRIGOREV, T.E.; GONCHAROV, M.E.; RUDYAK, S.G.; SOLOVYOVA, E.V; KRASHNINNICOV,S.T.; SAPRYKIN, V.P; SYTINA, E.V.; CHVALUN, S.N.; PALTSEV, M.A.; PANTELEEV, A.A. Chitosan as a Modifying Component of Artificial Scaffold for Human Skin Tissue Engineering. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, v. 159, n. 4, p. 557–566, 2015.

41. SURESH, P. K.; SURYAWANI, S. K.; DEWANGAN, D. Chitosan-based interpenetrating polymer network (IPN) hydrogels: a potential multicomponent oral drug delivery vehicle. *International Journal of Comprehensive Pharmacy*, v. 2, n. 8, p. 1–8, 2011.

42. AHMED, S.; IKRAM, S. Chitosan Based Scaffolds and Their Applications in Wound Healing. *Achievements in the Life Sciences*, v. 10, n. 1, p. 27–37, 2016.

43. DAI, T. TANAKA, M.; HUANG, Y.Y.; HAMBLIN, M.R. Chitosan preparations for wounds and burns: antimicrobial and wound-healing effects. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, v. 9, n. 7, p. 857–879, 2011.

44. PICHYANGKURA, R.; CHADCHAWAN, S. Biostimulant activity of chitosan in horticulture. *Biologia*, v. 12, n. 2, p. 49–65, 2011.

45. PILLAI, C. K. S.; PAUL, W.; SHARMA, C. P. Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation. *Progress in Polymer Science (Oxford)*, v. 34, n. 7, p. 641–678, 2009.

46. TAYLOR, P.; SYNOWIECKI, J.; AL-KHATEEB, N. A. Critical Reviews in Food Science and Nutrition Production , Properties , and Some New Applications of Chitin and Its Derivatives Production , Properties , and Some New Applications of Chitin and Its Derivatives. n. November 2013, p. 37–41, 2010.

47. JÚNIOR, E. D. S. C. Desenvolvimento de matriz de Quitosana/PVA, quimicamente reticulado para aplicação potencial em engenharia de tecido epitelial. *Hermes*, 2008.

48. FUMERATE, O.; BULK, E.; FORM, I. International Journal of Biopharmaceutics. Ijbonline.Com, v. 2, n. 2, p. 80–88, 2011.
49. TANG, E. S. K.; HUANG, M.; LIM, L. Y. Ultrasonication of chitosan and chitosan nanoparticles. International Journal of Pharmaceutics, v. 265, n. 1–2, p. 103–114, 2003.
50. JAYAKUMAR, R. MENON,D.; MANZOOR,K.; NAIR,S.V.; TAMURA, H.. Biomedical applications of chitin and chitosan based nanomaterials - A short review. Carbohydrate Polymers, v. 82, n. 2, p. 227–232, 2010.
51. GHADI, A.; MAHJOUR, S.; TABANDEH, F.; TALEBNIA,F. Synthesis and optimization of chitosan nanoparticles: Potential applications in nanomedicine and biomedical engineering. Caspian Journal of Internal Medicine, v. 5, n. 3, p. 156–161, 2014.
52. WANG, J. J.; ZENG, Z.W.; XIAO, R.Z.; XIE,T.; ZHOU,G.L.; ZHAN,X.R.; WANG,S.L . Recent advances of chitosan nanoparticles as drug carriers. International journal of nanomedicine, v. 6, p. 765–774, 2011.
53. AGNIHOTRI, S. A.; MALLIKARJUNA, N. N.; AMINABHAVI, T. M. Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery. Journal of Controlled Release, v. 100, n. 1, p. 5–28, 2004.
54. GUIMARÃES DE CASTRO, E. Nanopartículas de Platina e seus Nanocompósitos com Nanotubos e Outras Formas de Carbono: Preparação, Caracterização e Propriedades . p. 1–181, 2009.
55. VAGDIRAJU, S.; TOMAZOS, I.; BURGESS, D.J.; JAIN, F.C.; PAPADIMITRAKOPOLOUS, F. Emerging synergy between nanotechnology and implantable biosensors: A review. Biosensors and Bioelectronics, v. 25, n. 7, p. 1553–1565, 2010.
56. JORGENSEN, M.S.; ANDERSEN, M. M.; HANSEN,A.; WENZEL, H.; PEDERSEN, T.T.; JORGENSEN, U.; FALCH, M.; RASMUSSEN,B.; OLSEN,S.I.; WILLUM, O. Green Technology Foresight about environmentally friendly products and materials, p. 3–250, 2005.
57. SOZER, N.; KOKINI, J. L. Nanotechnology and its applications in the food sector. Trends in Biotechnology, v. 27, n. 2, p. 82–89, 2009.
58. ROCO, M. C. Nanotechnology: Convergence with modern biology and medicine. Current Opinion in Biotechnology, v. 14, n. 3, p. 337–346, 2003.

59. KOO, O. M.; RUBINSTEIN, I.; ONYUKSEL, H. Role of nanotechnology in targeted drug delivery and imaging: a concise review. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, v. 1, n. 3, p. 193–212, 2005.
60. ALLHOFF, F.; LIN, P.; MOORE, D. What is nanotechnology and why does it matter: From science to ethics, p. 1 -293 , 2009
61. SALAZAR, M. J. C. Desenvolvimento de nanopartículas de quitosana-gelatina e quitosana-colágeno visando a liberação de fármacos. p. 114, 2015.
62. HAAS, S. E. Desenvolvimento, caracterização físico química e avaliação farmacocinética de nanopartículas auto organizadas de quitosana. 2012.
63. RAJAN, M.; RAJ, V. Potential Drug Delivery Applications of Chitosan Based Nanomaterials. *International Review of Chemical Engineering*, v. 5, n. 2, p. 145–155, 2013.
64. ROMAINOR, A. N. B.; CHIN, S.F.; PANG, S.C.; BILUNG, L.M. Preparation and Characterization of Chitosan Nanoparticles-Doped Cellulose Films with Antimicrobial Property. *Journal of Nanomaterials*, v. 2014, p. 1–10, 2014.
65. KANWAR, J. R. Cancer nanotechnology. *Journal of Cancer Science and Therapy*, v. 4, n. 1, p. 163–175, 2012.
66. JUNQUEIRA, L.C; CARNEIRO, J. *Histologia básica*.10. Ed. Rio de janeiro: Elsevier, 2007, pg 65-119.
67. STEVENS, A.; LOWE, J. *Histologia humana*. 2. ed. São Paulo: Manole, 2001. 408 p. Stevens,
68. BOATENG, J. S.; MATTHEWS, K. H.; STEVENS, H. N. E.; ECCLESTON, G. M. Wound healing dressings and drug delivery systems: a review. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 97, n. 8, p. 2892-2923, 2008.
69. EMING, S. A.; KRIEG, T.; DAVIDSON, J. M. Gene therapy and wound healing. *Clinics in Dermatology*, v. 25, n. 1, p. 79-92, 2007
70. SEELEY, R.; STEPHENS, T.; TATE, P. Sistema Tegumentar. *Anatomia e Fisiologia*, p. 150–168, 2005.
71. NITZ, A. C. ELY, J.B.; D'ACAMPORA, A.J.; TAMES,D.R.;CORRÊA, B.P. Estudo morfométrico no processo de cicatrização de feridas cutâneas em ratos usando: *Coronopu didymus* e *Calendula officinali*. *Arquivos Catarinenses de Medicina*, v. 35, p. 74–79, 2006.
72. SOUZA, D. S.; MEDRADO, L.; GITIRANA, L. D. B. *Histologia. Tecido uso colágeno* p. 43–88, 2010.

73. PL, C.; GEMPERLI PL, C, R. MARIA FERNANDA R.; Análise mecânica e histológica do tegumento. 2008.
74. CUNHA, N. A. Sistematização da assistência de enfermagem no tratamento de feridas crônicas. p. 1–33, 2006.
75. BLANES, L. Tratamento de feridas. Cirurgia vascular: guia ilustrado, p. 1–379, 2004.
76. PEREIRA, E. M. C.; DUTRA, F. C.; LONIEN, S. C. H. O Paciente Queimado e a Cicatrização: Uma Revisão Literária. p. 10–27, 2017
77. JIN, Y. ; LING, P.X.; HE, Y.L.; ZHANG, T.M. Effects of chitosan and heparin on early extension of burns. v. 33, n. 8, p. 1027–1031, 2007.
78. HONARDAR, S.; KORDESTANI, S.S.; DALIRI, M.; NAYEBHABIB, F. The effect of chitosan-based gel on second degree burn wounds. v. 25, n. 8, 2016.
79. SIVIERO DO VALE, E. C. Primeiro atendimento em queimaduras: A abordagem do dermatologista. Anais Brasileiros de Dermatologia, v. 80, n. 1, p. 9–19, 2005.
80. MACEDO, J.; ROSA, S.; SANTOS, J. Complicações Infecciosas E Fatores Preditivos De Infecção. Rev Soc Bras Cir Plast, v. 22, n. 1, p. 34–38, 2007.
81. DAI, T.; TEGOS, G.P.; BURGATOVSKAYA, M.; CASTANO, A.P.; HAMBLIN, M.R. Chitosan acetate bandage as a topical antimicrobial dressing for infected burns. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 53, n. 2, p. 393–400, 2009.
82. ANDRADE, A. G. DE; ALBUQUERQUE, A. K. B. DE. Efeitos do laser terapêutico no processo de cicatrização das queimaduras: uma revisão bibliográfica. v. 9, n. 1, p. 21–30, 2010..
83. MANDELBAUM, S. H.; DI SANTIS, É. P.; MANDELBAUM, M. H. S. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares-Parte I Cicatrization: current concepts and auxiliary resources-Part I. Anais Brasileiro de Dermatologia, v. 78, n. 4, p. 393–410, 2003.
84. ROCHA, C. D. L. J. V. Revisão de literatura: Histofisiologia e Classificação das Queimaduras: Consequências locais e sistêmicas das perdas teciduais em pacientes queimados. Revista Interdisciplinar de Estudos Experimentais, v. 1, p. 140–147, 2009.
85. BARBANTI, S. H.; SANTOS JR, A.R.S.; ZAVAGLIA, C. A. C.; DUEK, E.A.R. Poly (ϵ -caprolactone) and poly(D,L-lactic acid-co-glycolic acid) scaffolds used in bone tissue engineering prepared by melt compression- particulate leaching method. Journal of Materials Science: Materials in Medicine, v. 22, n. 10, p. 2377–2385, 2011.

86. BARBANTI, S. H.; ZAVAGLIA, C. A. C.; DUEK, E. A. R. Polímeros biorreabsorvíveis na engenharia de tecidos. *Polímeros*, v. 15, n. 1, p. 13–21, 2005.
87. AMINI, A. R.; LAURENCIN, C. T.; NUKAVARAPU, S. P. Bone Tissue Engineering: Recent Advances and Challenges. *Critical Reviews™ in Biomedical Engineering*, v. 40, n. 5, p. 363–408, 2012.
88. GUTENBERG, J. Tissue Engineering and Regenerative Medicine. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, v. 6, n. September, p. 1–429, 2012.
89. WU, Y. C.; SHAWB, S.Y.; LINC, H.R.; LEED, T.M.; YANG, C.Y. Bone tissue engineering evaluation based on rat calvaria stromal cells cultured on modified PLGA scaffolds. *Biomaterials*, v. 27, n. 6, p. 896–904, 2006.
90. KOTOBUKI, N.; HIROSE, M.; TAKAKURA,Y.; OHGUSHI, H. Cultured autologous human cells for hard tissue regeneration: preparation and characterization of mesenchymal stem cells from bone marrow. *Artif Organs*, v. 28, n. 1, p. 33–39, 2004.
91. MARTINOU, A.; KAFETZOPOULOS, D.; BOURIOTIS, V. Chitin deacetylation by enzymatic means: monitoring of deacetylation processes. *Carbohydrate Research*, v. 273, n. 2, p. 235–242, 1995
92. AHLAFI, H.; MOUSSOUT , H.; BOUKHLIF,F.; ECHETNA,M.; BENNANI,M.N.; SLIMANE , S.M. Kinetics of N-Deacetylation of Chitin Extracted from Shrimp Shells Collected from Coastal Area of Morocco. *Mediterranean Journal of Chemistry*, v. 2, n. 3, p. 503–513, 2013
93. CHEN, S. TSAI, C.C.; CHEN R.L.C.; HSIAO, H.Y.; CHEN,C.T.; YANG,C.W. Study of deacetylation in chitinous materials using near infrared spectroscopy. v. 1, n. October 2005, p. 599611, 2005.
94. CHANG, K. L. B.; TSAI, G.; LEE, J.; FU, W.R. Heterogeneous N-deacetilation of chitin in alkaline solution. *Carbohydrate Reseach*, v. 303, p. 327–332, 1997.
95. GALED, G.; MIRALLES, B.; PANOS, I.; SANTIAGO, A.; HERAS, A. N-Deacetylation and depolymerization reactions of chitin/chitosan: Influence of the source of chitin. *Carbohydrate Polymers*, v. 62, n. 4, p. 316–320, 2005.
96. YAGHOBI, N.; HORMOZI, F. Multistage deacetylation of chitin: Kinetics study. *Carbohydrate Polymers*, v. 81, n. 4, p. 892–896, 2010.
97. CHEN, C. H.; WANG, F. Y.; OU, Z. P. Deacetylation of -chitin. I. Influence of the deacetylation conditions. *Journal of Applied Polymer Science*, v. 93, n. 5, p. 2416–2422, 2004.

98. LIU, T. G.; LI, B.; HUANG, W.; LV, B.; CHEN, J.; ZHANG, J. X.; ZHU, L. P. Effects and kinetics of a novel temperature cycling treatment on the N-deacetylation of chitin in alkaline solution. *Carbohydrate Polymers*, v. 77, n. 1, p. 110–117, 2009.
99. FOGLER, S. C., *Elementos de Engenharia das Reações Químicas*, 3ª ed., Editora LTC, 2002.
100. MARTINO, A.; KAFETZOPOULOS, D.; BOURIOTIS, V. Chitin deacetylation by enzymatic means: monitoring of deacetylation processes. *Carbohydrate Research*, v. 273, n. 2, p. 235–242, 1995.
101. ROBERTS, G. W. *Reações químicas e reatores químicos*. Rio de Janeiro (RJ): LTC, 2010.
102. LAMARQUE, G.; VITON, C.; DOMARD, A. Comparative study of the second and third heterogeneous deacetylations of alpha- and beta-chitins in a multistep process. *Biomacromolecules*, v. 5, p. 1899–1907, 2004.
103. JIANG, C. J.; XU, M. Q. Kinetics of heterogeneous deacetylation of -chitin. *Chemical Engineering and Technology*, v. 29, n. 4, p. 511–516, 2006.
104. LEVENSPIEL, O. *Chemical reaction engineering*, Terceira edição, Editora Blucher, Department of Chemical Engineering Oregon State University, p. 570-577, 1999.
105. PARK, J. Y.; LEVENSPIEL, O. The crackling core model for the reaction of solid particles. *Chemical Engineering Science*, v. 30, n. 10, p. 1207–1214, 1974.
106. LEVENSPIEL, O. *The Chemical Reactor Omnibook*, 8 ed., Department of Chemical Engineering Oregon State University, p. 51.1-51.6, 1989.
107. FROMENT, V. G. F.; BISCHOFF, K. B. *Chemical reactor analysis and design*, Editora John Wiley & Sons, Nova York, v. 2, p. 252-282, 1990.
108. BOX, G. E. P.; HUNTER, W. G.; HUNTER, J. S. *Statistics for experimenters*. New York: John Wiley & Sons Inc., 2 ed., p. 173 - 222 1978.
109. MONTGOMERY, D. C.; RUNGER, G. C. *Estatística Aplicada e Probabilidade para Engenheiros*. 4 ed. Rio de Janeiro: LTC, 2009.
110. METHACANON, P.; PRASITSILP, M.; POTHISREE, T.; PATTARAARCHACHAI, J. Heterogeneous N-deacetylation of squid chitin in alkaline solution. *Carbohydrate Polymers*, v. 52, n. 2, p. 119- 123, 2003.
111. DOMARD, A.; RINAUDO, M. Preparation and characterization of fully deacetylated chitosan. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 5, n. 1, p. 49–52, 1983.

112. TOLAIMATE, A.; DESBRIÈRES, J.; RHAZI, M.; ALAGUI, A.; VINCENDON, M.; VOTTERO, P. On the influence of deacetylation process on the physicochemical characteristics of chitosan from squid chitin. *Polymer*, v. 41, n. 7, p. 2463–2469, 2000.
113. SANTOS, J. E.; SOARES, J.E.; DOCKAL, J.P.; CAMPANA FILHO, E.R, CAVALHEIRO, E.P. Caracterização de quitosanas comerciais de diferentes origens. *Polímeros*, v. 13, n. 4, p. 242–249, 2003.
114. DONG, Y.; XU, C.; WANG, J.; WANG, M.; WU, Y.; RUAN, Y. R.Y. Determination of degree of substitution for N-acylated chitosan using IR spectra. *Science in China Series B: Chemistry*, v. 44, n. 2, p. 216–224, 2001.
115. CANELLA, K. M. N. D. C.; GARCIA, R. B. Caracterização de quitosana por cromatografia de permeação em gel -Influência do metodo de preparação e do solvente. *Quimica Nova*, v. 24, n. 1, p. 13–17, 2001.
116. CZECHOWSKA-BISKUP, R.; Diana, J.; Bożena, R.; Piotr, U.; Rosiak, J.M. Determination of Degree of Deacetylation of Chitosan - Comparaison of Methods. *Progress on chemistry and application of chitin and its derivatives*, v. 17, p. 5–20, 2012.
117. KASAAI, M. R. A review of several reported procedures to determine the degree of N-acetylation for chitin and chitosan using infrared spectroscopy. *Carbohydrate Polymers*, v. 71, n. 4, p. 497–508, 2008.
118. SABNIS, S.; BLOCK, L. Improved infrared spectroscopic method for the analysis of degree of N -deacetylation of chitosan. *Polymer Bulletin*, v. 39, n. 1, p. 67–71, 1997.
119. CHEN, S.; CHENG, T.S.; CHEN, R. L. C.; CHANG, Y.I.; YI, H.H.; TSENG, C.C.; YANG, WEN, C. Study of deacetylation in chitinous materials using near infrared spectroscopy. v. 1, n. October 2005, p. 599611, 2005.
120. DOMSZY, J.G.; ROBERTS, G. A. F.; Evaluation of infrared spectroscopic techniques for analysing chitosan. *Die Makromolekulare Chemie*, 186, 1671–1677, 2003.
121. SOLOMONS, T. W. G, *Fundamentals of Organic Chemistry*, 4 ed, p 891-933, University of South Florida, Editora John Wiley & Sons, New York, 1976.
122. CARDOSO, M. B. Contribuição ao estudo da reação de desacetilação de quitina: Estudos da desacetilação assistida por ultrassom de alta potência. p. 102, 2008.
123. SUSLICK, K. S. CHOE, S.B.; CICHOWLAS; A.A.; GRINSTAFF, M.W. Sonochemical synthesis of amorphous iron. *Nature*, v. 353, n. 6343, p. 414–416, 1991.

124. NAGHIBZADEH, M.; AMANI, A.;ESMAEILZADEH,E.; DASTJERDI,N.M.; FARAMARZI, M. A.. An insight into the interactions between-tocopherol and chitosan in ultrasound-prepared nanoparticles. *Journal of Nanomaterials*, v. 2, 2010.
125. ESMAEILZADEH-G. E.; GHAREDAGHI E.E.; FARAMARZI, M.A.; AMINI, M.A.; NAJAFABADI, A.R.; REZAYAT, S.M.; AMANI, A. Effects of processing parameters on particle size of ultrasound prepared chitosan nanoparticles: An Artificial Neural Networks Study. *Pharmaceutical Development and Technology*, v. 17, n. 5, p. 638–647, 2012.
126. DAVIDSON R.S.; SAFDAR, A.; SPENCER, J.D.; ROBINSON, B. Applications of ultrasound to organic chemistry. *Ultrasonics*, v. 25, n. 1, p. 35–39, 1987.
127. TANG, E. S. K.; HUANG, M.; LIM, L. Y. Ultrasonication of chitosan and chitosan nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 265, n. 1–2, p. 103–114, 2003.
128. CZECHOWSKA BISKUP, R.; JAROSIŃSKA, D.; ROKITA, B.; ULAŃSKI, P.; ROSIAK, J. M. Determination of Degree of Deacetylation of Chitosan - Comparaison of Methods. *Progress on chemistry and application of chitin and its derivatives*, v. 17, p. 5–20, 2012.
129. SABNIS, S.; BLOCK, L. Improved infrared spectroscopic method for the analysis of degree of N -deacetylation of chitosan. *Polymer Bulletin*, v. 39, n. 1, p. 67–71, 1997.
130. B. STUART. *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications*. 1 ed, editora John Wiley and Sons, 2016.
131. KASAAI, M. R. A review of several reported procedures to determine the degree of N-acetylation for chitin and chitosan using infrared spectroscopy. *Carbohydrate Polymers*, v. 71, n. 4, p. 497–508, 2008.
132. COSTA SILVA, H. S. R.; DOS SANTOS, K. S. C. R.; FERREIRA, E. I. Quitosana: Derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços. *Química Nova*, v. 29, n. 4, p. 776–785, 2006.
133. BARBOSA, L.C.A., *Espectroscopia no Infravermelho na Caracterização de Compostos Orgânicos*. Ed. UFV. Viçosa, p. 13-60, 2007.
134. FAWCETT, A.H, *Polymer Spectroscopy*, John Wiley, New York, 1996.
135. DONALD L. P.; GARY M. L.; GEORGE s. k.; *Introduction to Spectroscopy*, Belmonte: book/cod Cengage, learning, 2009.

136. ROTH, J. A.; KAEBERLE, M. L.; HSU, W. H. Effect of estradiol and progesterone on lymphocyte and neutrophil functions in steers. *Infection and Immunity*, v. 35, n. 3, p. 997–1002, 1982
137. . KLOKKEVOLD, P. R, FUKAYAMA, H.; SUNG E.C.H. The effect of chitosan (poly-n-acetyl glucosamine) on lingual hemostasis in heparinized rabbits. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, v. 57, n. 1, p. 49–52, 1999.
138. MARQUES, E.S.S. Modificação e caracterização da quitosana para uso como suporte em processos biotecnológicos Universidade estadual do norte fluminense – uenf. 2009.
139. GENTA, I.; COSTANTINIB M.; ASTI, A.; CONTI, B.; MONTANARIB, L. Influence of glutaraldehyde on drug release and mucoadhesive properties of chitosan microspheres. *Carbohydrate Polymers*, v. 36, n. 2, p. 81–88, 1998.
140. MI, F. L.; TAN. Y.C.; LIANG, H.F.; SUNG, H.W.*In vivo biocompatibility and degradability of a novel injectable-chitosan-based implant. *Biomaterials*, v. 23, n. 1, p. 181–191, 2002.
141. VIMALA, K.; MOHAN, Y.M.; SIVUDU, K.S; VARAPRASAD, K.; RAVINDRA, S.; REGDY, N.N; PADMA, Y.; SREEDHAR, B.; MOHANARAJU, K. Fabrication of porous chitosan films impregnated with silver nanoparticles: A facile approach for superior antibacterial application. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 76, n. 1, p. 248–258, 2010.
142. GRIFFON, D. J.; SEDIGHI, M. R.; SCHAEFFER, D. V.; EURELL, J.A. JOHNSON, A. L. Chitosan scaffolds: Interconnective pore size and cartilage engineering. *Acta Biomaterialia*, v. 2, n. 3, p. 313–320, 2006.
143. CAMPOS, A. M.; DIEBOLD, Y.; CARVALHO, E.L.S. Chitosan Nanoparticles as New Ocular Drug Delivery Systems : in Vitro Stability , in Vivo Fate , and Cellular Toxicity. v. 21, n. 5, p. 0–7, 2004.
144. NIU, W. T.; YOSHIOKA, C.; KOBAYASHI,H. A scanning electron microscopic study of dentinal erosion by final irrigation with EDTA and NaOCl solutions. *International Endodontic Journal*, v. 35, n. 11, p. 934–939, 2002.
145. XU, R. Progress in nanoparticles characterization: Sizing and zeta potential measurement. *Particuology*, v. 6, n. 2, p. 112–115, 2008.
146. TAVARES, I. S. Obtenção e caracterização de nanopartículas de quitosana. *Dissertação*, p. 56, 2011.

147. MORA-HUERTAS, C. E.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 385, n. 1–2, p. 113–142, 2010.
148. ZHANG, L.; KOSARAJU, S. L. Biopolymeric delivery system for controlled release of polyphenolic antioxidants. *European Polymer Journal*, v. 43, n. 7, p. 2956–2966, 2007.
149. RAMPINO, A.; BORGOGNA M.; BLASI P.;, BELLICH B.; CESÀRO A. . Chitosan nanoparticles: Preparation, size evolution and stability. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 455, n. 1–2, p. 219–228, 2013.