UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

JAIBER HUMBERTO RODRÍGUEZ LLANOS

Propriedades físicas de filmes de quitosana dopados como condutores iônicos

Pirassununga

2014

JAIBER HUMBERTO RODRÍGUEZ LLANOS

Propriedades físicas de filmes de quitosana dopados como condutores iônicos

Versão Corrigida

Dissertação apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Ciências do programa de pós-graduação em Engenharia de Alimentos.

Área de Concentração: Ciências da Engenharia de Alimentos

Orientador: Prof. Dr. Andrés Vercik

Pirassununga

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Serviço de Biblioteca e Informação da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos
da Universidade de São Paulo

L791p

Llanos, Jaiber Humberto Rodríguez

Propriedades físicas de filme de quitosana dopados
como condutores iônicos / Jaiber Humberto Rodríguez
Llanos. -- Pirassununga, 2014.

111 f.

Dissertação (Mestrado) -- Faculdade de Zootecnia e
Engenharia de Alimentos - Universidade de São Paulo.

Departamento de Ciências Básicas.

Área de Concentração: Ciência da Engenharia de
Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Andrés Vercik.

1. Quitosana 2. Filmes 3. Propriedades mecânicas
4. Biosensor 5. Eletrônica verde. I. Título.

AGRADECIMENTOS

A Deus pelas muitas bênçãos que tem dado na minha vida e por iluminar sempre meu caminho.

À meus pais Adelaida Llanos e Samuel Humberto Rodriguez pelo constante apoio e colaboração, tendo sempre uma voz de ânimo para nunca desfalecer.

Ao Dr. Andrés Vercik pela orientação e ensinamentos no mestrado.

À Dra. Luci Cristina de Oliveira Vercik pela orientação no laboratório.

À Dra. Eliana Rigo pela disposição, colaboração, apoio e ensinamentos ao longo do meu mestrado.

À Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos pela oportunidade de realização deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de nível Superior (CAPES) pela bolsa para o financiamento dos estudos.

Aos Professores Holmer Savastano Junior e Giovana Tomasso por permitirem a participação no Programa de Aperfeiçoamento de Ensino, PAE o qual permitiu adquirir maiores conhecimentos.

Aos professores Paulo José do Amaral Sobral pela disposição do seu laboratório para o desenvolvimento de medidas de espectroscopia de infravermelho, microscopia eletrônica de varredura, microscopia de força atômica e propriedades mecânicas.

Aos laboratoristas Ana Mônica e Rodrigo Lourenço do laboratório de Tecnologia de Alimentos, pela ajuda e disposição ao realizar as determinações de espectroscopia de infravermelho, microscopia eletrônica de varredura e propriedades mecânicas.

A minha linda, Evelyn Antonelli, que faz parte importante deste caminho de decisões, objetivos e metas a cumprir.

Aos colegas e amigos Hernan Dario, Gretel Gonzalez, Leanne Wiley, Léa Sturton, German Ayala, Christian Flaker, Andrea Vasquez e Isnardo Upegui pela amizade, companheirismo, apoio e paciência.

À Diana Palacio, pelo apoio, amizade, inspiração e acompanhamento ao longo do desenvolvimento deste trabalho.

E todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito obrigado.

RESUMO

LLANOS, J.H.R. **Propriedades físicas de filmes de quitosana dopados como condutores iônicos**. 2014. 110 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2014.

O desenvolvimento de novos materiais a partir de elementos biodegradáveis com durabilidade considerável, versatilidade apreciável e baixo custo tem grande interesse na aplicação da bio-eletrônica. O presente trabalho objetiva a caracterização das propriedades físicas e químicas das membranas de quitosana obtidas a partir da neutralização da solução policatiónica de quitosana. O trabalho foi dividido em duas etapas: solubilização e neutralização. Na primeira etapa a quitosana foi solubilizada em três concentrações diferentes de ácido acético (1%, 0.8% e 0.5%) para avaliar se a concentração de ácido exerce diferença significativa nas propriedades físico-químicas das membranas de quitosana. Na segunda etapa o policatión de quitosana foi neutralizado com duas bases fortes (NaOH e KOH) em três concentrações molares diferentes (0.5, 1 e 5 molar) pelo método de gotejamento lento da base até atingir o pH de 6.0 no policatión e obter membranas com pH perto da neutralidade. A caracterização das membranas obtidas a partir do policatión de quitosana neutralizado mostrou que as concentrações de ácido acético não mudam de forma significativa as propriedades físico-químicas das membranas. Em contraste, o processo de neutralização afetou as propriedades físico-químicas das membranas, e em particular, diferentes comportamentos foram observados dependendo da base utilizada. Membranas mais dúcteis foram obtidas após neutralização com KOH, exibindo capacidade plastificante pela base usada, enquanto que as membranas neutralizadas com NaOH apresentam um comportamento frágil. Além disso, as membranas neutralizadas com KOH exibem uma maior condução iônica em relação às propriedades elétricas das membranas, o qual pode ser interessante no desenvolvimento de biossensores ou célula combustível.

Palavras chave: quitosana, filmes, transporte, propriedades mecânicas, intumescimento, biossensor, eletrônica verde.

ABSTRACT

LLANOS, J.H.R. **Physical Properties of dopped chitosan films as ionic conductors**. 2014. 110 f. M.Sc. Dissertation – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2014.

The development of new materials from biodegradable elements with considerable durability, versatility and low cost is of great interest for applications in bioelectronics. The present work aims the characterization of the chemical and physical properties of chitosan membranes after neutralization of the polycation solution of chitosan. This work was divided into two steps: solubilization and neutralization. In the first step, the chitosan was solubilized with three different concentrations of acetic acid (1%, 0.8% and 0.5%) in order to evaluate whether the acid affects the physical-chemical properties of the chitosan films. In the second step, the polycation of chitosan was neutralized with two different strong bases (NaOH and KOH) using three different molar concentrations (0.5, 1 and 5), by the slow drip method of base until reaching a pH of 6.0 for the polycation and obtaining films with pH close to neutrality. The characterization of the membranes obtained from neutralized chitosan showed that the different concentrations of acetic acid did not affect the physical-chemical properties of the films significantly. In contrast, the neutralization process did affect the physical-chemical properties, and particularly, different behaviors were observed depending on the type of base used for neutralization. More ductile films were obtained after neutralization with KOH, exhibiting plastificant capacity by the used base, whereas the films neutralized with NaOH exhibited a more fragile behavior. Beyond this, regarding the electrical properties, the films with KOH presented a higher ionic conductivity, which could be interesting for developing biosensors or fuel cells

Keywords: chitosan, films, transport, mechanical properties, swelling, biosensor, green electronics

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. FUNDAMENTOS TEÓRICOS E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	13
2.1. POLÍMEROS	13
2.1.1. Quitina.....	13
2.1.2. Quitosana.....	18
2.1.2.1. Sínteses da Quitosana.....	20
2.1.2.2. Neutralização da Quitosana	21
2.1.2.3. Propriedades da Quitosana	23
2.1.2.4. Aplicações da Quitosana	24
2.2. TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO	28
2.2.1. Espectroscopia de Ultravioleta (UV-VIS).....	28
2.2.2. Espectroscopia de Infravermelho (FT-IR).....	30
2.2.3. Difração de Raios X.....	33
2.2.3. Propriedades Mecânicas	35
2.2.4. Intumescimento	41
2.2.5. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	42
2.2.6. Análise Elétrica: Curvas Corrente-Tensão (I-V).....	43
3. OBJETIVOS	50
3.1. OBJETIVO GERAL	50
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	50
4. MATERIAIS E MÉTODOS	51
4.1. MATERIAIS.....	51
4.2. PRODUÇÃO DE SOLUÇÕES NEUTRALIZANTES	51
4.2.1. Hidróxido de sódio como solução neutralizante.....	51
4.2.2. Hidróxido de potássio como solução neutralizante	52
4.3. PRODUÇÃO DE SOLUÇÃO TAMPÃO.....	52
4.3.1. Produção da solução tampão fosfato (pH5 e pH9)	52
4.4. PRODUÇÃO DOS FILMES NEUTRALIZADOS DE QUITOSANA	52
4.4.1. Produção do polycation de quitosana	52
4.4.2. Neutralização do polycation de quitosana	53
4.4.3. Produção dos filmes	54
4.5. CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES NEUTRALIZADOS	55
4.5.1. Espectroscopia de ultravioleta (UV-VIS)	55
4.5.2. Espectroscopia de infravermelho (FT-IR)	56
4.5.3. Difração de Raios X.....	56
4.5.4. Espessura dos filmes.....	57
4.5.5. Intumescimento	57
4.5.6. Propriedades mecânicas.....	58
4.5.7. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	59
4.5.8. Espectroscopia de curvas tensão-Voltagem (I-V).....	59
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	60
5.1. NEUTRALIZAÇÃO DO POLICÁTION DE QUITOSANA.....	60
5.2. CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES DE QUITOSANA NEUTRALIZADOS COM BASES DE SÓDIO E POTÁSSIO ...	61
5.2.1. Espectroscopia de ultravioleta (UV-VIS)	61
5.2.2. Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR).....	63
5.2.3. Difração de Raios X.....	66

5.2.4. <i>Espessura dos filmes</i>	70
5.2.5. <i>Intumescimento</i>	71
5.2.6. <i>Propriedades mecânicas</i>	80
5.2.7. <i>Microscopia eletrônica de varredura (MEV)</i>	86
5.2.8. <i>Espectroscopia de curvas corrente-tensão (I-V)</i>	90
7. CONCLUSÕES	96
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	98

1. INTRODUÇÃO

O uso de materiais de origem biológica no desenvolvimento de elementos com aplicação eletrônica tem atraído interesse considerável entre os cientistas devido às vantagens que apresenta ao dispositivo como o processamento simples, baixo custo de fabricação, concepção molecular versátil e controle das propriedades físico-químicas do dispositivo. Certo número de dispositivos, tais como, biossensores eletroquímicos, células de carga, dispositivos eletroluminescentes e diodos Schottky foram fabricados e testados usando polímeros condutores (AKKdLdÇ; UZUN; KdLdÇOğLU, 2007). Os novos materiais e elementos com aplicações industriais devem possuir características físicas especiais como durabilidade, resistência ao manuseio e versatilidade ao uso.

A maioria dos polímeros apresenta uma resistência à passagem de corrente elétrica, exibindo um comportamento de isolante elétrico. A quitosana é a forma desacetilada da quitina, sendo um biopolímero linear da forma acetil-D-glicose, com a capacidade de atuar como matriz condutora de prótons já que o monômero de quitosana é composto pelo agrupamento dos grupos funcionais de amina e hidroxilo, os quais possuem um par de elétrons livres adequados no desenvolvimento de polímeros eletrólitos sólidos.

A quitosana é um polímero natural que possui propriedades únicas, essencialmente sua não toxicidade, biocompatibilidade e biodegradabilidade, permitindo posicionar as membranas da mesma como uma matriz polimérica adequada para o desenvolvimento de biossensores a partir da imobilização de material biológico (enzimas como horseradish peroxidase ou HRP) na superfície da matriz. No processo de obtenção das membranas de quitosana, o pó de quitosana é solubilizado em uma solução de ácido acético, e, portanto, a membrana resultante possui um pH entorno de 4.3, o que pode afetar a cinética enzimática de forma negativa, devido a máxima atividade enzimática da HRP estar compreendida no intervalo de valores de pH 5-6 (SCHMIDT et al., 2009).

O desenvolvimento de biossensores enzimáticos demanda materiais com certas características próprias da matriz suporte para a imobilização das enzimas, e no caso de matrizes biopoliméricas, o pH perto da neutralidade e alta capacidade de fixação de biorreceptores, sendo necessário eliminar vestígios do solvente no filme, além dos hidrônios livres presentes na matriz polimérica. Para isso é realizado o processo de neutralização da membrana, que remove os restos de ácido e regenera os grupos NH_2 da quitosana tornando a superfície do filme hidrofílica e com compatibilidade celular (NORIEGA; SUBRAMANIAN, 2011) um dos componentes mais importantes é o pH por sua direta ligação com a atividade enzimática e vida útil do biossensor. A literatura relata que o processo de neutralização das membranas de quitosana obtidas pelo método de casting podem ser neutralizadas em soluções de NaOH por imersão, gerando desta forma membranas com modificações estruturais e superficiais devido à reidratação e secagem das membranas.

No presente trabalho visou-se caracterizar as membranas de quitosana a partir da solubilização do pó de quitosana em três concentrações de ácido acético 1%, 0.8% e 0.5%, além da neutralização do polícatión de quitosana pelo método de gotejamento lento das duas bases fortes, hidróxido de sódio (NaOH) e hidróxido de potássio (KOH) em três concentrações molares 0.5, 1 e 5 molar, para estabelecer o comportamento físico-químico das membranas e suas aplicações industriais.

2. FUNDAMENTOS TEÓRICOS E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. POLÍMEROS

2.1.1. Quitina

A quitina é um dos materiais orgânicos mais abundantes na natureza depois da celulose que é produzida anualmente por biossíntese. A quitina está presente em animais, particularmente em crustáceos, moluscos e insetos, como um constituinte importante do exoesqueleto e principal polímero fibrilar em alguns fungos, sendo uma fonte renovável pela disponibilidade na natureza.

A quitina é um polissacarídeo branco, duro e inelástico composto de β -(1 $\rightarrow$ 4) unidades ligadas, 2-acetamido-2-deoxi- β -D-glucopirranose, tem uma estrutura similar à da celulose com a diferença que o carbono 2 do grupo hidroxilo da celulose é substituído pelo grupo acetamido na quitina (DUTTA; DUTTA; TRIPATHI, 2004; FRANCA et al. 2008; ROBERTS, 1992). A figura 1 apresenta a configuração da quitina em comparação com a celulose e a mureína, que é um polímero estrutural da parede celular das bactérias, apresentando uma similaridade estrutural associada às características de proteção e estrutura para os hospedeiros.

O processo de isolamento da quitina foi feito pela primeira vez por Braconnot em 1811 a partir de fungos que se denominaram “fungina” (ROBERTS, 1992).

Em 1823 Odier chamou de quitina (Grego, χιτων, que significa Túnica ou Capa) um isolado residual insolúvel obtido após tratamentos quentes das carcaças dos besouros com soluções alcalinas de potássio (PENICHE; ARGÜELLES-MONAL; GOYCOOLEA, 2008), e em 1859 Rouget reportou que o tratamento da quitina com solução concentrada de KOH sob refluxo pode obter um produto denominado “modificado de quitina” (ROBERTS, 1992), o qual tempos depois denominou-se quitosana, que é solúvel em solução de ácidos orgânicos.

Figura 1. Semelhança entre as estruturas da Quitina (A), Celulose (B), Mureína (C) e a Quitosana (D).

Fonte: Vollmer e Bertsche (2008); Roberts., (1992) adaptado pelo autor.

A quitina está altamente ordenada por estruturas cristalinas as quais podem ser evidenciadas por estudos da difração de raios X. Esta pode apresentar três tipos de polimorfismos dependendo da fonte de extração; os polimorfismos são denominados α -, β - e γ - quitina, tendo divergência significativa das cadeias poliméricas apresentadas nas regiões cristalinas. Na figura 2 estão representados os arranjos das cadeias da quitina como os antiparalelos no polimorfismo da α -quitina, paralelos na β -quitina e um arranjo de duas linhas paralelas e uma folha anti-paralela correspondente à γ -quitina, embora esta estrutura não tenha sido completamente identificada. (LAVALL; ASSIS; CAMPANA-FILHO, 2007; FRANCA et al. 2008; ZHANG et al. 2000; FENG; LIU; HU, 2004). Segundo Roberts (1992) a γ -quitina pode ser interpretada de forma mais simples como uma distorção das estruturas α e β e não como um polimorfismo diferente.

Figura 2. Arranjo das cadeias da quitina α quitina (A), β quitina (B), γ quitina (C)
 Fonte: Robers, (1992) adaptado pelo autor.

O tipo de cristal mais abundante é a forma α -quitina, o qual tem uma estabilidade maior em comparação com as outras duas formas de polimorfismo. A partir de processos químicos as orientações paralelas das cadeias dos polimorfismos β e γ -quitina podem sofrer uma mudança significativa permitindo obter cristais de orientação termodinamicamente mais estáveis (α -quitina)

Rudall (1955) sugere que as três formas de polimorfismo da quitina estão diretamente ligadas com a funcionalidade desenvolvida da parte usada na extração da quitina; a α -quitina é encontrada onde é necessária uma dureza extrema, como em cascas de camarão e de caranguejo (AZUMA et al., 2012), β - e γ - quitina são encontradas no lugar no qual a flexibilidade e resistência são necessárias sem limitar os movimentos, como é a “pena” da lula, espinhos de diatomáceas e tubos de pogonóforos (RUDALL, 1963; BLACKWELL, 1969; OGAWA et al., 2010). A α -quitina tem uma estrutura termodinamicamente mais estável por ter duas cadeias de estrutura ortorrômbica com grupo espacial $P2_1 2_1 2_1$ (OGAWA et al., 2010), que faz referência à orientação das cadeias antiparalelas como pode-se observar na figura 3 onde o desenho molecular no plano a-c representa alienação das cadeias, formado pela interação hidrofóbica de anéis glucopiranosídeos e pelas ligações de hidrogênio intermoleculares. As folhas têm uma polaridade diferente, pela qual estão empilhadas alternadamente ao longo da direção do eixo b para formar uma estrutura anti-paralela, e

estabilizadas com ligações de hidrogénio intermoleculares entre as folhas, originando desta forma uma estrutura cristalina mais estável, com dimensões de célula unitária de $a = 4.742 \text{ \AA}$, $b = 18.871 \text{ \AA}$, $c = 10.338 \text{ \AA}$ (OGAWA et al., 2010; OGAWA et al., 2012; PERSSON; DOMARD; CHANZY, 1992; SIKORSKI; HORI; WADA, 2009) .

Figura 3. Estrutura cristalina da α -quitina.
Fonte: Ogawa et al., 2012

A existência de um segundo cristal na estrutura da quitina foi reportada por Lotmar and Picken em 1950, que fez a identificação a partir das “penas” de lula (ROBERTS, 1992). As cadeias do cristal da β -quitina estão dispostas formando um grupo espacial $P2_1$ monoclinicos de cadeia simples com uma estrutura semelhante à folha molecular α -quitina no plano de fluxo alternado definido por $a = 4.85 \text{ \AA}$, $b = 9.26 \text{ \AA}$, c (repetição da fibra) $= 10.38 \text{ \AA}$, e $\gamma = 97.5^\circ$, portanto, são empacotados em um arranjo paralelo, em oposição ao arranjo antiparalelo da α -quitina (figura 4). No entanto, estas folhas que têm a mesma polaridade estão empilhadas por causa das forças hidrofóbicas de modo a formar uma estrutura paralela, porém não existe forte ligação de hidrogénio entre as folhas ao longo do eixo b , devido à falta de ligações de

hidrogênio entre suas folhas. Por isso é que a β -quitina possui a capacidade de incorporar moléculas pequenas, tais como água, álcoois primários e aminas, entre suas folhas (KOBAYASHI et al., 2010; OGAWA et al., 2012; PERSSON; DOMARD; CHANZY, 1992; YEN; YANG; MAU, 2009).

Figura 4. Estrutura cristalina β -quitina vista perpendicular à direção do eixo c, o qual se encontra ligeiramente inclinado para mostrar as ligações de hidrogênio intermoleculares.

Fonte: Kobayashi et al., 2010

A quitina é um polissacarídeo natural que se destaca do ponto de vista químico por apresentar um grupo acetamido e sua desacetilação conduz a um novo biopolímero denominado Quitosana, ambos tendo semelhança físico-química com a celulose, apresentando características interessantes como biodegradabilidade, biocompatibilidade e bioatividade (ROBERTS, 1992).

2.1.2. Quitosana

A quitosana é o principal derivado da quitina, o qual é produzido pela desacetilação alcalina parcial ou total da quitina (Figura 5); sendo um polissacarídeo que tem na sua cadeia um grupo amino no carbono 2, constituído por unidades de 2-amino-2-desoxi-D-Glucosamina. Pouco solúvel em água, a solubilização é feita mediante adição de ácidos (minerais ou orgânicos), com os quais é formado um polycation devido à protonação dos grupos aminos livre na cadeia polimérica (figura 6). A amina primaria da quitosana é responsável pela obtenção de compostos derivados, os quais estão diretamente ligados com o grau de desacetilação, sendo um dos parâmetros mais importantes no seu aspecto químico (SHAHIDI; ARACHCHI; JEON, 1999; RINAUDO, 2006).

Figura 5. Estrutura da quitina e quitosana.
 Fonte: Pillai, Paul e Sharma (2009) adaptado pelo autor.

A dissolução da quitosana em solução é atingida com o rompimento das ligações intermoleculares na qual estão envolvidos os grupos acetil da quitina e também das propriedades hidrofílicas das unidades glucosaminas (Glc-NH_2), as quais em pH baixo são

protonadas, induzindo o equilíbrio molecular como é apresentado na equação 1. (RINAUDO, 2006; SHAHIDI; ARACHCHI; JEON, 1999; ROBERS, 1992)

Apesar de a quitina ter sido descoberta em 1811 por Braconnot ao trabalhar com fungos, a forma desacetilada desta (quitosana) só foi produzida de forma industrial em 1971 no Japão, onde em 1986 já existiam 15 indústrias produzindo quitina e quitosana de forma comercial (HIRANO et al., 1999).

Figura 6. Estrutura química da quitosana 100% desacetilada
Fonte: Sankalia et al. (2007).

A quitosana é um biopolímero que tem sido muito estudado recentemente em comparação com outros polímeros. Alguns anos atrás as principais aplicações da Quitosana eram na remoção de sedimentos da água (GAMAGE; SHAHIDI, 2007; LU; WANG; SYE, 2011; ALTAHER, 2012), quelação de íons metálicos (QU et al., 2011; GUIBAL, 2004) e algumas aplicações na indústria de alimentos (SHAHIDI; ARACHCHI; JEON, 1999; RINAUDO, 2006; KUMAR, 2000). Atualmente a Quitosana vem sendo muito utilizada na produção de cosméticos, medicamentos, desenvolvimento de biomateriais, tanto na medicina como na odontologia e liberação de drogas (CROISIER; JÉRÔME, 2013; GIRI et al., 2012;

PARK et al., 2010; BERNKOP-SCHNÜRCH; DÜNNHAUPT, 2012; REMUÑÁN-LÓPEZ et al., 1998; PARVEEN; SAHOO, 2011), desenvolvimento de materiais capacitivos (YANG et al., 2005; KALLEMPUDI; GURBUZ, 2011) , como as células de carga e combustível (MA; SAHAI, 2013; MA; SAHAI; BUCHHEIT, 2012; SMITHA; DEVI; SRIDHAR, 2008), também usada como matriz polimérica na imobilização de biomarcadores, já que tem uma superfície hidrofílica que permite a adesão e crescimento celular (AZEVEDO et al., 2006), e desenvolvimento de biossensores (ZHANG et al., 2013; ODACI; TIMUR; TELEFONCU, 2009; FAN et al., 2007; DU et al., 2007).

2.1.2.1. Sínteses da Quitosana

Comercialmente a quitosana é obtida do exoesqueleto dos crustáceos, que é um resíduo proveniente da indústria pesqueira o qual apresenta uma porcentagem bastante alta da quitosana em comparação com outras fontes deste biopolímero (ARANAZ et al., 2009).

Os exoesqueletos dos crustáceos estão compostos de 30-40% de proteína, 30-50% de carbonato de cálcio e 20-30% de quitina. Também há a presença de alguns pigmentos como os carotenóides (ARANAZ et al., 2009). O processo de obtenção da quitosana envolve uma série de procedimentos, os quais tem como quadro padrão a transformação química da quitina, sendo as três primeiras etapas (desmineralização, desproteinização e descoloração), orientadas na separação e purificação da quitina presente nas estruturas biológicas, finalmente a última etapa envolve a transformação do grupo acetamino ($-\text{NHCOCH}_3$) presente na quitina em grupo amino ($-\text{NH}_2$). O processo está representado na Figura 7.

Figura 7. Obtenção da quitina e quitosana a partir do exoesqueleto dos crustáceos.
Fonte: ARANAZ et al., 2009, adaptado pelo autor.

No processo de obtenção da quitosana Aranaz et. al., (2009), o procedimento mais importante é a desacetilação após a desmineralização, desproteínização e descoloração devido a que nesta etapa o grupo acetamino ($-\text{NHCOCH}_3$) presente na quitina é hidrolisado até se obter o grupo amino ($-\text{NH}_2$) característico da quitosana, este processo é feito na presença de hidróxido de sódio.

O grau de desacetilação é a conversão (hidrólise) do grupo acetamino em amino, esta conversão é reportada em porcentagem, sendo muito importante, pois desta dependem as propriedades físico-químicas deste biopolímero como a solubilidade, viscosidade, propriedades mecânicas, entre outras (VALENCIA, 2013; DUTTA; DUTTA; TRIPATHI, 2004).

2.1.2.2. Neutralização da Quitosana

A quitosana é um polissacarídeo semicristalino que normalmente é insolúvel em soluções de pH alcalino. Entretanto, os grupos aminos livres são protonados e as moléculas podem solubilizar em soluções de pH menor que 6.0 (HE et al., 2011). A dependência de soluções com elevado conteúdo protônico na solubilização da quitosana levou ao uso de soluções salinas com alto conteúdo de hidroxilos no processo de neutralização do polímero.

com a finalidade de melhorar a capacidade de reter células, bio-marcadores e enzimas na superfície das matrizes poliméricas. (HE et al., 2011; NORIEGA; SUBRAMANIAN, 2011).

Segundo Noriega e Subramanian (2011) as matrizes poliméricas para a imobilização de material biológico devem possuir um ambiente favorável com um pH perto da neutralidade, além de propriedades mecânicas ajustadas para garantir a viabilidade das células no tempo e nos processos nos quais as matrizes vão ser usadas.

Alguns tratamentos de neutralização podem alterar as propriedades físico-químicas da superfície da membrana, influenciando o padrão de ligação com o material biológico, além de torná-los hidrofílicos ou hidrofóbicos. O padrão de ligação pode ser modificado pelo tipo de agente neutralizante, bem como pela concentração do mesmo, que influencia de forma significativa as propriedades físico-químicas das matrizes. Noriega e Subramanian (2011) melhoraram a hidrofiliabilidade das superfícies das membranas de quitosana incrementando a concentração de NaOH na solução aquosa neutralizante, sendo 0.5 M a máxima concentração de hidróxido de sódio usado na neutralização das membranas, a concentração de NaOH na solução influenciou na adsorção da proteína, apresentando uma contagem maior de células imobilizadas em matrizes neutralizadas com uma concentração de 0.25 M.

O uso de soluções com alto conteúdo de hidroxila na neutralização de membranas de quitosana além de modificar as propriedades químicas e físicas destas, modifica também as características topográficas, as quais podem ser observadas através da microscopia de força atômica (NORIEGA; SUBRAMANIAN, 2011). Segundo HE et al. (2011) o uso do hidróxido de sódio na neutralização das membranas de quitosana adiciona cristais fortemente fixados na superfície, o que pode ser observado pela microscopia de varredura e força atômica, além das modificações nas ligações moleculares das membranas que pode ser observado no FT-IR.

A semi-cristalinidade e as ligações do hidrogênio na matriz polimérica da quitosana durante a neutralização aquosa permitem a incorporação de moléculas de água nas redes

cristalinas, provocando uma modificação no polimorfismo da quitosana, o qual pode ser observado na difração de raioX, tal polimorfismo afeta de forma significativa as propriedades mecânicas da quitosana (HE et al., 2011).

Segundo HE et al. (2011) a neutralização das membranas de quitosana com NaOH em solução e NaOH em solução com etanol, alteram significativamente as propriedades físico-químicas dos filmes e melhora a compatibilidade na imobilização de células endoteliais na superfície da membrana.

Wan et al. (2006a) usou o hidróxido de potássio (KOH) como solução neutralizante em membranas de quitosanas pelo método de imersão, além de estabelecer uma incorporação de hidróxido de potássio na estrutura da membrana para modificar as propriedades mecânicas dos filmes obtidos e melhorar a condutividade iônica nestes tipos de filmes.

2.1.2.3. Propriedades da Quitosana

A quitosana é um polímero com mais versatilidade em comparação com a quitina devido à presença dos grupos aminos nas posições C-2 (DUTTA; DUTTA; TRIPATHI, 2004), isso permite que o polímero tenha propriedades químicas como poliamina catiônica linear, alta carga de densidade $\text{pH} < 6$, formação de géis com poliânions, viscosidade característica, grupos amino reativos, grupos hidroxilo reativos disponíveis e propriedade quelante. Algumas das propriedades biológicas da quitosana são: a biocompatibilidade, biodegradabilidade, não toxicidade, estimulação do sistema imunológico, efeitos regenerativos sob o tecido conectivo, acelerador na formação de osteoblastos e responsável pela formação de osso, além de hemostático, fungostático, espermicida e antiolesterêmico. Dentre as propriedades físicas a quitosana apresenta permeabilidade, razão de intumescimento em membranas, propriedades térmicas, estabilidade a solventes, propriedades mecânicas e porosidade. (SENCADAS et al., 2012; DASH et al., 2011; RINAUDO, 2006; GENG;

KWON; JANG, 2005; HUANG et al., 2005; DUTTA; DUTTA; TRIPATHI, 2004; HEJAZI; AMIJI, 2003; KUMAR, 2000; KOIDE, 1998; CHEN; LIN; YANG, 1994).

As propriedades antibacterianas da quitosana poderiam estar ligadas às interações eletrostáticas entre as grupo aminos da quitosana e os grupos aniônicos das paredes celulares pela presença dos ácidos carboxílicos e os fosfolipídios (HEJAZI; AMIJI, 2003; KONG et al., 2010).

2.1.2.4. Aplicações da Quitosana

O uso da quitina e os derivados desta nas aplicações industriais são reportados há mais de quatro décadas (KUMAR, 2000), entretanto, a baixa solubilidade tem sido um dos principais limitantes na utilização; apesar desta limitação a literatura reporta um grande número de pesquisas abordando aplicações na medicina e na indústria (MORIMOTO et al., 2011; DUTTA; DUTTA; TRIPATHI, 2004; KUMAR, 2000).

Dentro das principais aplicações da quitosana na linha biomédica estão:

Engenharia de tecidos: a quitosana tem recebido uma grande atenção devido à sua biodegradabilidade, biocompatibilidade e não toxicidade, tendo aplicação na liberação de drogas, implantes de preenchimento de espaço e matriz de suporte devido a suas propriedades físicas e químicas como o tamanho de poro, propriedades mecânicas, reabsorção e biodegradabilidade.

Cicatrização de feridas: efeitos de aceleração nos processos curativos e de cicatrização têm sido encontrados na quitosana, com capacidade de regeneração de tecido fibrilar exibido a uma porcentagem perto dos 30% (DUTTA; DUTTA; TRIPATHI, 2004).

Tratamento de queimaduras: a capacidade de absorção de umidade, permeabilidade ao oxigênio e biodegradabilidade pelas enzimas do corpo são características ótimas apresentadas pelas membranas de quitosana para o tratamento de pacientes com queimaduras.

Oftalmologia: a versatilidade da quitosana permite a substituição de polímeros sintéticos nas aplicações oftalmológicas como em lentes de contato, devido às características próprias da quitosana como a claridade ótica, estabilidade mecânica, permeabilidade a gases, molhabilidade e compatibilidade imunológica.

Sistema de liberação de drogas: a utilização de polímeros naturais na liberação de drogas se deve às características de biodegradabilidade e não toxicidade. A quitosana ou misturas desta com outros polímeros bio-ativos na liberação de drogas são amplamente usadas devido às propriedades físico-químicas e de permeabilidade da mesma, permitindo veicular os agentes de interesse até o lugar de liberação, garantindo uma absorção idônea pelo hospedeiro (GHAFARI et al., 2007).

Enquanto as aplicações da quitosana na linha industrial, segundo DUTTA; DUTTA; TRIPATHI (2004) a maior concentração estão nas linhas de:

Cosméticos: na indústria dos cosméticos a quitosana é usada como base dos materiais desenvolvidos (BALDRICK et al., 2010) devido ao caráter catiônico desta, permitindo as interações com as cargas negativas das superfícies biológicas como a pele e o cabelo, sendo as características mais relevantes da quitosana o alto peso molecular, a retenção de umidade e a capacidade filmogênica na complexação de íons de metais pesados (PENICHE; ARGÜELLES-MONAL; GOYCOOLEA, 2008).

Tratamento de águas: a proteção do meio ambiente é um problema global e cada uma das indústrias deve desenvolver novas tecnologias para mitigar o problema da contaminação das águas (Kumar, 2000). A natureza policatiônica da quitosana permite o uso desta como agente floculante e agente quelante na remoção de metais pesados e íons metálicos. A estrutura molecular da quitosana permite a remoção e recuperação de elementos dispostos nas águas de descarte como corantes, plutônio como contaminante, o acetato de metil-mercúrio, remoção de arsênico, remoção do petróleo e derivados deste, desacidificação e clarificação de

águas. Além disso, as membranas de quitosana podem ser usadas nos processos de osmose inversa, microfiltração, dessalinização, diálises e hemodiálises (THIRUGNANASAMBANDHAM; SIVAKUMAR; MARAN, 2013; PENICHE; ARGÜELLES-MONAL; GOYCOOLEA, 2008; DUTTA; DUTTA; TRIPATHI, 2004; KUMAR, 2000; KAYA; PICARD, 1996).

Indústria do papel: a semelhança da estrutura da quitosana com a estrutura da celulose permite o uso da quitosana na elaboração de papel com a finalidade de melhorar a biodegradabilidade e as propriedades mecânicas do mesmo.

Indústria têxtil: os derivados da quitosana são usados para conferir características anti-estáticas e repelentes nos têxteis, assim como na remoção dos pigmentos dos esgotos da indústria.

Indústria alimentar: a ausência da toxicidade, biodegradabilidade, alta afinidade eletrostática, grupos aminos ativos para reagir, propriedade emulsificante e alta capacidade gelificante são as propriedades características da quitosana que permitem usá-la na estabilização de alimentos. Apesar das importantes propriedades da quitosana, no contexto da indústria alimentar, políticas de saúde pública podem limitar o uso *in vivo* do polímero. A quitosana como aditivo alimentar foi aprovado no Japão e na Coreia nos anos de 1983 e 1995 respectivamente. A inclusão do polímero no Codex Alimentarium foi considerada por comissões e organizações internacionais (como a FAO e OMS) no ano de 2003, mas o uso do polímero não está reconhecido nas listas gerais padronizadas, já que ainda não houve aprovação pela FDA (Food and Drug Administration) e EFSA (European Food Safety Authority). Na atualidade além do uso como aditivo alimentar nos países asiáticos, nos Estados Unidos há um produto comercial (ChitoClear® Prymex ASA, Norway) com reconhecimento do GRAS (Generally Recognised As Safe), o qual foi outorgado no ano 2001

(MENGÍBAR, 2011; SAGOO; BOARD; ROLLER, 2002; RAO; SHARMA, 1997; PENICHE; ARGÜELLES-MONAL; GOYCOOLEA, 2008; STAFFOLO et al., 2011).

Agricultura: o uso da quitosana na agricultura tem um impacto muito positivo no crescimento das plantas. Todas as plantas com tratamento de quitosana apresentam um melhor desenvolvimento de raízes e brotos, além disso, a quitosana é usada no tratamento das sementes, folhas, frutos e vegetais, tendo impacto na pré-colheita e pós-colheita, além de servir como proteção contra os microrganismos patogênicos (EL-SAWY et al., 2010; PENICHE; ARGÜELLES-MONAL; GOYCOOLEA, 2008)

Biotecnologia: a quitina tem dois grupos hidroxilos, enquanto a quitosana tem um grupo amino e dois grupos hidroxilos na repetição de cada hexosamina. A partir da configuração estrutural da quitosana diversas afinidades são apresentadas na configuração química as quais contrastam com as propriedades físicas, sendo que as aplicações na linha da biotecnologia estão baseadas na imobilização de enzimas e células para serem usados como biossensores. As enzimas imobilizadas na quitosana apresentam maior estabilidade e maior resistência às variações de temperatura (PENICHE; ARGÜELLES-MONAL; GOYCOOLEA, 2008).

Nanotecnologia: o uso de ferramentas nano-tecnológicas no desenvolvimento de materiais com propriedades diferentes aos macroscópicos, permitem avançar na obtenção de novos materiais nano-estruturados. As nanopartículas metálicas são amplamente usadas no desenvolvimento de biossensores, tendo aplicação nas áreas como a medicina, no diagnóstico e terapia de doenças como o tratamento do câncer, onde nano partículas de ouro são conjugadas com fragmentos específicos de peptídeos ou anticorpos que são seletivos às células cancerígenas. Em farmacologia as nanopartículas são amplamente usadas na liberação controlada de medicamentos. Além disso, as nanopartículas são usadas na área de alimentos como controle nas linhas de processamento, indicador da degradação dos mesmos e indicador

da concentração de componentes específicos. No desenvolvimento de biossensores as nanopartículas formam parte da matriz nano-estruturada, contendo uma ou mais enzimas imobilizadas (VALENCIA, 2013). A utilização da quitosana como matriz no desenvolvimento de biossensores, polímeros eletrolíticos e síntese de nanopartículas têm sido estudados devido a sua versatilidade, repetibilidade e reprodutibilidade de baixo custo e ampla aplicabilidade (LAVERTU et al., 2006; ESCAMILLA-GARCÍA et al., 2013; LUO et al., 2004; GOMATHI et al., 2011; LUO et al., 2005; ZHANG et al., 2013; TANGKUARAM et al., 2007; TIWARI et al., 2011).

2.2. TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO

2.2.1. Espectroscopia de Ultravioleta (UV-VIS)

Esta técnica consiste na incidência da radiação do espectro eletromagnético em uma longitude de onda entre 100 e 800 nm, e uma energia compreendida entre 286 e 36 kcal/mol. O objetivo da radiação sob o material é produzir transições eletrônicas entre os orbitais atômicos ou as moléculas do elemento. Quando a radiação atravessa um material, uma fração desta radiação pode ser absorvida e conseqüentemente excitar os átomos e moléculas da amostra, passando de um estado de baixa energia para um estado de maior energia. A energia nesses átomos ou moléculas está quantizada, portanto, a radiação eletromagnética que uma amostra pode absorver é igual a diferença energética entre os dois estados permitidos da mesma. Com esta técnica pode-se determinar a vibração dos átomos e das moléculas (THANJAM et al., 2011; HIENMENZ; LODGE, 2007; PAVIA et al., 2010).

No caso da espectroscopia ultravioleta e visível, as transições que resultam em absorção de radiação eletromagnética nessa região do espectro ocorrem entre níveis de energia eletrônicos, quando a molécula absorve energia, um elétron é promovido de um orbital

ocupado para um orbital desocupado de maior energia potencial. Em geral, a transição mais provável é do *orbital ocupado de maior energia* (HOMO) para o *orbital de menor energia* (LUMO). As diferenças de energia entre os níveis eletrônicos na maioria das moléculas variam de 125 a 650 kJ/mol. (PAVIA et al., 2010).

Para um átomo que absorve no ultravioleta, o espectro de absorção às vezes é composto de processos quantizados entre dois níveis de energia discretos, porém para as moléculas a absorção no UV ocorre em uma ampla faixa de comprimentos de onda devido aos modos excitados de vibração e rotação a diferentes temperaturas. Os níveis rotacionais e vibracionais são “sobrepostos” aos níveis eletrônicos, mas uma molécula pode passar simultaneamente por uma excitação eletrônica e vibracional, modificando deste jeito a absorbância nos diferentes comprimentos de onda.

A absorção de luz em certos comprimentos de onda está diretamente ligada com a quantidade de moléculas na amostra, além disso, quanto maior é a eficiência de uma molécula na absorção de luz em certo comprimento de onda, maior será o grau de absorção, a partir destes princípios é formulada a equação governada pela lei de *Lambert-Beer*.

$$\epsilon_{bc} = A = \log \frac{I_0}{I_t} \quad (2)$$

A absorbância A apresenta um máximo quando a energia da radiação coincide com o intervalo de energia vibracional (ϵ_{bc}). A absorbância é descrita pela lei de Beer-Lambert, onde I_0 é a intensidade de luz incidente sobre a amostra, I_t a intensidade de luz refletida e ϵ a absortividade molar (PAVIA et al., 2010).

Um espectrofotômetro ultravioleta é constituído por uma fonte de luz, um monocromador e um detector de luz. A fonte de luz comumente usada é feita de deutério, que emite radiação eletromagnética na região ultravioleta do espectro (400-200 nm), paralelamente uma segunda fonte de luz, uma lâmpada de tungstênio, é empregada para emitir luz com

comprimento de onda na região visível do espectro (750-400 nm). Assim, pode-se obter um feixe de luz entre 200 e 750 nm, esta luz deve atravessar o monocromador cuja função é espalhar a luz em todas as longitudes que a compõe e filtrar por comprimento de onda. Posteriormente a luz que sai do monocromador é dirigida à amostra, os feixes de luz que conseguem atravessar o material chegam ao detector de luz, o qual quantifica os feixes retidos na amostra. Os cálculos da absorbância são determinados de acordo com a lei de Beer-Lambert (CLARK; FROST; RUSSELL, 1993; PAVIA et al., 2010).

2.2.2. Espectroscopia de Infravermelho (FT-IR)

A espectroscopia vibracional engloba basicamente duas técnicas que se baseiam em princípios físicos distintos, mas que propiciam resultados complementares. As frequências vibracionais fundamentais completas de uma molécula só serão conhecidas com a aquisição dos espectros de absorção no infravermelho (IR) e o espalhamento Raman, desta forma a espectroscopia vibracional é uma ferramenta utilizada na determinação de grupos funcionais. A maioria dos compostos com ligações covalentes tem uma absorção de frequências de radiação eletromagnética na região do infravermelho. O infravermelho envolve comprimentos de onda maiores associados à luz visível em uma faixa de 400 até 800 nm (CANEVAROLO JUNIOR, 2007; PAVIA et al., 2010).

A absorção de radiação pelas moléculas na faixa do infravermelho corresponde a alterações de energia da ordem de 8 a 40 kJ/mol. A radiação nessa faixa de energia corresponde à faixa que engloba frequências vibracionais de estiramento e dobramento das ligações nas moléculas com enlaces covalentes.

O uso mais importante do espectro infravermelho é fornecer a informação estrutural de uma molécula, as absorções de cada tipo de ligação (enlaces simples, dobles ou triples entre

os átomos) são, em geral, encontradas apenas em certas regiões pequenas do infravermelho vibracional, sendo associada para cada tipo de ligação uma faixa de absorção que designará o tipo de enlace existente na molécula. A força de ligação e as massas dos átomos afetam a frequência de absorção do infravermelho, apresentando uma relação direta com o modelo do oscilador harmônico, que é usado para descrever o comportamento vibracional dos átomos e moléculas, o qual supõe que as oscilações das ligações dos átomos ou moléculas em torno a suas respectivas posições de equilíbrio são de pequena amplitude. O modelo é:

$$E_{osc} \propto h\nu_{osc} \quad (3)$$

onde para um oscilador harmônico, é determinado pela constante de força elástica K , ou sua rigidez, e pelas massas ($m_1, m_2, \dots$) dos átomos unidos. A frequência natural de vibração de uma ligação é dada pela equação:

$$\tilde{\nu} = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{K}{\mu}} \quad (4)$$

O qual é derivado da lei de Hooke para molas em vibração. A massa reduzida μ do sistema está dada por:

$$\mu = \frac{m_1 m_2 \dots}{m_1 + m_2 + \dots} \quad (5)$$

A constante K depende do tipo de ligação dos átomos, sendo que as ligações de mais de um enlace vão apresentar maior força que as de menor quantidade de enlaces.

No espectro vibracional, além das bandas fundamentais, podem aparecer outras bandas, tais como combinações por soma ou diferença e as bandas harmônicas; na região de frequências baixas ($<500 \text{ cm}^{-1}$), podem existir bandas de torção, bandas de modo rede (movimentos das cadeias em relação às outras) e bandas devidas ao modo acústico (vibração de cristais), pelo anterior a espectroscopia de absorção no infravermelho pode ser dividida em

três regiões distintas; de 10 até 400 cm^{-1} (IR longínquo ou afastado), de 400 até 4000 cm^{-1} (IR médio) e de 4000 até 12820 cm^{-1} (IR próximo).

A maior concentração dos estudos que envolvem ao IR está referida na região média onde estão localizadas as frequências vibracionais fundamentais, que correspondem às transições vibracionais entre o nível de energia vibracional fundamental ($v=0$) e o primeiro nível vibracional excitado ($v=1$). A região de 400 a 1800 cm^{-1} é conhecida como região de impressão digital ($\Delta v=1$).

A região do IR próximo é utilizada no controle de qualidade e controle de processos industriais devido as transições vibracionais entre os níveis de energia fundamental e os níveis de energia de ordem superior ($v=2,3,4\dots$) e/ou combinação de uma vibração fundamental com outras harmônicas (CANEVAROLO JUNIOR, 2007; PAVIA et al., 2010).

Os espectrofotômetros usados na obtenção do espectro da absorção do infravermelho estão divididos em dois tipos, o espectrofotômetro de dispersão e de transformada de Fourier (FT), ambos oferecem espectros de compostos em uma faixa comum de 4000 a 400 cm^{-1} , sendo o mais comum o espectrofotômetro de transformada de Fourier devido a sua versatilidade e eficácia na compilação dos dados.

O princípio de funcionamento do IV-FT está diretamente ligado ao interferômetro de Michelson, que regula a quantidade de energia enviada na amostra. A fonte de radiação infravermelha mais utilizada é o bastão de cerâmica refrigerado a ar e a configuração do espectrofotômetro é de varredura contínua. Na década de 90 foi desenvolvida a configuração de FT-IR denominada varredura por passos (*step-scan*), onde o comprimento de onda é deslocado até atingir um deslocamento compatível com as condições experimentais. O FT-IR gera um interferograma com o qual, a partir da transformada de Fourier, pode se obter o espectro IR normal (*raw*), que é o perfil espectral de intensidade versus número de ondas. A ocorrência de fenômenos de interferência no interferômetro afeta a intensidade de radiação

num determinado comprimento de onda, sendo esta a razão pela qual a radiação que passa pelo interferômetro é modulada, e o feixe de luz é caracterizado pelo número de vezes por segundo e pela frequência com que ele alterna suas propriedades. No caso do FT-IR a frequência de modulação é dada pela equação:

$$F = 2\nu\tilde{\nu} \quad (6)$$

Onde F é a frequência de modulação (Hz), ν é a velocidade do espelho móvel (cm.s^{-1}) e $\tilde{\nu}$ é o número de ondas da radiação medidas em cm^{-1} .

No espectrofotômetro FT-IR pode-se efetuar várias varreduras e acumular os interferogramas correspondentes, este processo é conhecido por co-adição, tendo como vantagem o aumento significativo da razão sinal/ruído (S/N , *signal to noise*), segundo a equação:

$$\frac{S}{N} \propto n^{1/2} \quad (7)$$

onde n é o número de varreduras. Assim, quando são efetuadas 100 varreduras, a razão S/N sofrerá um aumento de 10 vezes em relação a um espectro de uma varredura.

2.2.3. Difração de Raios X

As macromoléculas e os polímeros têm a capacidade de formar cristais e a difratometria de raios X corresponde a uma das principais técnicas de caracterização microestrutural de materiais cristalinos.

Os raios X utilizam o espalhamento coerente da radiação X, por estruturas organizadas (cristais) permitindo estabelecer a morfologia, estrutura e fração percentual cristalina contida na amostra. O fóton de raios X após a colisão com o elétron muda sua trajetória, mantendo,

porém, a mesma fase e energia do fóton incidente. Sob o ponto de vista da física pode-se dizer que a onda eletromagnética é instantaneamente absorvida pelo elétron e reemitida, tendo função de emissor de raios X (BLEICHER; SASAKI, 2013). Da mesma forma que em outras técnicas espectroscópicas, as técnicas de raios X também exigem que o feixe de radiação seja monocromático. Considerando dois ou mais planos de uma estrutura cristalina, as condições para que ocorra a difração de raios X (interferência construtiva ou em uma mesma fase) vão depender da diferença de caminho percorrido pelos raios X e o comprimento de onda da radiação incidente; esta condição está dada pela lei de Bragg.

$$n\lambda = 2d \operatorname{sen} \theta \quad (8)$$

onde λ corresponde ao comprimento de onda da radiação incidente, n a um número inteiro (ordem de difração), d à distância interplanar para o conjunto de planos “ hkl ” (índice de Miller) da estrutura cristalina e θ ao ângulo de incidência dos raios X (medido entre o feixe incidente e os planos cristalinos).

A intensidade difratada, dentre outros fatores, é dependente do número de elétrons no átomo; adicionalmente, os átomos são distribuídos no espaço, de tal forma que os vários planos de uma estrutura cristalina possuem diferentes densidades de átomos ou elétrons, fazendo com que as intensidades difratadas sejam, por consequência, distintas para os diversos planos cristalinos, a figura 8 exibe a reação de uma rede cristalina ao feixe de um cristal monocromador.

Figura 8. Difração dos raios X pela rede cristalina de um polímero
Fonte: CANEVAROLO JUNIOR, 2007, adaptado pelo autor.

Na difração de raios X o feixe colimado de raios x é diretamente aplicado na amostra e a radiação difratada é monitorada em função do ângulo θ com um detector que pode ser uni ou bidimensional. Os cristais iônicos seguem o padrão de retículos de Bravais podendo ser cristais básicos, cúbicos, monoclinico, triclínico, hexagonal, ortorrômbico e tetragonal, mas em cristais moleculares as atribuições cristalinas estão diretamente ligadas às dimensões variadas em função do peso molecular (CANEVAROLO JUNIOR, 2007; HIENMENZ; LODGE, 2007; KAHN, 2013)

A cristalinidade de um polímero é um importante parâmetro que define as propriedades físicas e químicas, juntamente com o peso molecular e sua distribuição. A determinação do grau de cristalinidade de polímeros foi intensamente estudada durante a década de 1960, sendo W. Ruland o responsável pelo desenvolvimento da base de cálculo para a interpretação do fenômeno de espalhamento de raios X por estruturas cristalinas e sua quantificação (CANEVAROLO JUNIOR, 2007).

Segundo Cheng et al. (2003) o uso da difração de raios X é uma ferramenta que permite estabelecer as interações entre dois polímeros no momento de estabelecer blendas entre eles, permitindo concluir sua compatibilidade, além disso, é uma ferramenta complementar de outras técnicas que envolvem as modificações químicas com impacto nas propriedades físicas da amostra

2.2.3. Propriedades Mecânicas

A estrutura molecular do polímero é responsável pelo seu comportamento mecânico, os polímeros apresentam ligações primárias covalentes entre átomos da cadeia principal e ligação secundária de baixa energia de ligação entre as cadeias poliméricas, tais como forças de Van der Waals, interações entre dipolos, ligações de hidrogênio entre outras. De acordo

com o comportamento mecânico os polímeros podem ser classificados em termos de rigidez, fragilidade e tenacidade. A estrutura molecular dos polímeros proporciona um comportamento visco-elástico; a fração elástica da deformação aparece devido a variações do ângulo e a distância de ligação entre os átomos da cadeia polimérica, enquanto a fração plástica ocorre por causa do atrito entre as cadeias poliméricas, nas análises dos comportamentos mecânicos, os fatores a serem levados em conta são a massa molar, temperaturas características e temperatura na qual é feita a análise (CANEVAROLO JUNIOR, 2002).

Os comportamentos mecânicos dos materiais poliméricos estão diretamente ligados ao tipo de esforço no qual estão submetidos e as características estruturais como são a cristalinidade, presença de grupos polares, massa molar, copolimerização, ligações cruzadas, além dos parâmetros externos como a presença de plastificante, elastômero, monômeros residuais reforçados com fibras e misturas entre polímeros (CANEVAROLO JUNIOR, 2002).

As cadeias poliméricas são estruturas compostas por centenas de meros os quais apresentam ligações covalentes, baseando a estrutura em ligações simples, duplas ou triplas entre carbono-carbono. Tipicamente as cadeias poliméricas estão compostas entre 100 e 1000 meros por cadeia, fundamentando muitas das propriedades físicas dos polímeros ao comprimento da cadeia polimérica. As configurações espaciais das cadeias poliméricas são fortemente influenciadas pela estrutura polimérica tetraédrica do átomo do carbono apresentando um ângulo de $109,5^\circ$ no caso das ligações carbono-carbono, o qual permite uma rotação ao longo da cadeia polimérica estruturada. Muitas das estruturas poliméricas são amorfas, o que quer dizer que não há uma ordem aparente estabelecida para a cadeia polimérica em uma distribuição espacial, entretanto há evidência de certo tipo de ordem localizado nas cadeias de alguns polímeros, o qual é definido como cristalinidade. A cristalinidade nos polímeros é devida às pregas das cadeias, que é apresentado tipicamente nos polímeros lineares (figura 9).

Figura 9. Estrutura esquemática das regiões presentes de um polímero linear
 Fonte: SOBOYEJO, 2003, adaptado pelo autor.

À medida que o grau de cristalinidade de um polímero cresce o módulo elástico, a resistência ao escoamento e a dureza também aumentam, fator pelo qual a densidade em polímeros pode ser considerada proporcional ao grau de cristalinidade (CANEVAROLO JUNIOR, 2002).

No processo de caracterização das propriedades mecânicas dos polímeros existem vários tipos de ensaios os quais podem ser estáticos, dinâmicos, destrutivos e não destrutivos e as solicitações podem ocorrer na forma de tensão ou de deformação, sendo o registro geral dos ensaios as curvas de tensão vs deformação (figura 10). Os principais parâmetros que quantificam a resistência mecânica dos polímeros nos ensaios de tensão deformação são o módulo de Young ou de elasticidade, tensão e deformação no escoamento, tensão máxima, tensão e deformação na ruptura e tenacidade.

Figura 10. Curva de tração deformação de um polímero com uma porcentagem de umidade de 0,2%

Fonte: CANEVAROLO JUNIOR, 2002, adaptado pelo autor.

As tensões em qualquer região da curva são calculadas usando-se a razão entre a carga e a área de seção transversal do corpo de prova. A tensão é definida como nominal quando a área utilizada para o cálculo da tensão é a inicial, mas se a área utilizada é a obtida no instante da aplicação da carga, esta tensão é definida como real (CANEVAROLO JUNIOR, 2002).

O módulo de Young está diretamente relacionado com a rigidez do polímero pelo qual um valor maior no módulo estabelece uma maior rigidez do polímero, sendo obtido pela inclinação da curva estabelecida na área elástica do polímero, que está determinado até antes do ponto de escoamento regido pela equação:

$$E = \sigma / \varepsilon \quad (9)$$

As deformações no escoamento e na ruptura definem o poder de escoamento das moléculas poliméricas durante o estiramento, o que está definido pela equação que relaciona o delta do comprimento da região útil do corpo de prova, com comprimento útil inicial, após a aplicação do esforço.

$$\varepsilon = \Delta l / l_0 \quad (10)$$

O ponto de ruptura está ligado ao tipo de fratura que se pode atingir no material após os esforços, podendo apresentar fraturas frágil e dúctil; sendo a ruptura frágil caracterizada pela ruptura do material no momento antes de atingir a deformação plástica e a dúctil apresenta um escoamento e uma deformação plástica momentos antes de atingir a ruptura do material (CANEVAROLO JUNIOR, 2002).

CANEVAROLO JUNIOR (2002) estabelece que a resistência do polímero na ruptura é um parâmetro de controle de resistência, tendo valor significativo quando o material atinge uma ruptura frágil, porém, nas fraturas dúcteis o valor da tensão onde ocorre escoamento é mais importante devido as mudanças físicas do material, já que este deforma irreversivelmente.

CANEVAROLO JUNIOR (2007) estabeleceu cinco comportamentos típicos dos polímeros quando são submetidos a esforços de tração, os quais são:

- a) Polímeros com elevado módulo de elasticidade e baixa elongação na ruptura.
- b) Polímeros com elevado módulo de elasticidade, tensão de escoamento e tensão na ruptura, e moderada elongação na ruptura.
- c) Polímeros com elevado módulo de elasticidade, tensão de escoamento, elongação na ruptura e máxima resistência à tração.
- d) Polímeros com baixo módulo de elasticidade, baixa tensão de escoamento, porém elevado ponto de elongação e tensão no ponto de ruptura.
- e) Polímeros com baixo módulo de elasticidade e tensão no escoamento, e elongação moderada até o ponto de ruptura.

As amostras de quitosana disponíveis no mercado apresentam diferentes propriedades funcionais devido as variações no grau de desacetilação (variando de 60 a 90%) e o peso molecular (intervalo de 50 a 2000 kDa) (CHO; NO; MEYERS, 1998; DEL BLANCO et al., 1999). É por esta razão que a quitosana apresenta variação nas propriedades físicas em

contraste com a resistência a esforços mecânicos (KUMAR 2000; RINAUDO, 2006; CALERO et al., 2010; CHO; NO; MEYERS, 1998; DEL BLANCO et al., 1999).

Segundo Chen, Lin e Yang (1994) o grau de desacetilação da quitosana é diretamente proporcional ao número de ligações intermoleculares do hidrogênio, a qual afeta à rigidez da membrana do polímero. As propriedades mecânicas das membranas de quitosana podem ser controladas pela manipulação das propriedades da solução de quitosana como o pH, concentração, força iônica e tipo de solvente, sendo que a manipulação da força iônica e o pH permitem reduzir as repulsões eletrostáticas entre as cadeias da quitosana (CHEN; LIN; YANG, 1994)

Segundo KHAN et. al., (2013) o peso molecular da quitosana tem que ser reduzido para melhorar a solubilidade e reduzir a viscosidade; O baixo peso molecular da quitosana tem mostrado melhores propriedades físicas, antifúngica e antimicrobiana, em comparação com as quitosana de maior peso molecular.

Segundo CHEN et al., (2012) o alto peso molecular da quitosana ligado com a baixa solubilidade da mesma limita as aplicações desta na medicina e na indústria alimentícia, já que a baixa solubilidade e alto peso molecular vão interferir na absorção e degradação da quitosana no tempo, levando a processos mais longos e tempos de espera.

Diferentes processos de degradação da quitosana têm sido estudados com o fim de reduzir o peso molecular desta, visando melhorar suas propriedades físicas sem alterar a sua estrutura química. Dentro dos métodos desenvolvidos estão à hidrólise ácida (CHEN et al., 2012), a degradação por oxidação (HUANG; ZHUO; GUO, 2008), a degradação enzimática (ILYINA et al., 2000) e a degradação pela radiação (KHAN et al., 2013).

O ensaio de viscosidade é o método mais simples e rápido para determinar o peso molecular médio. A viscosidade intrínseca de uma solução de polímero está diretamente

ligada com o peso molecular do polímero de acordo com a equação de Mark-Houwink (ZIANI et al., 2008).

$$[\eta] = K(M_w)^a, \quad (11)$$

onde o $[\eta]$ é a viscosidade intrínseca da quitosana, M_w é o peso molecular médio da quitosana, K e a são constantes empíricas para um sistema dado de soluto-solvente à uma temperatura específica.

No entanto, para o cálculo da viscosidade da quitosana, além de conhecer o sistema do solvente (força iônica e pH) e da temperatura, o grau de desacetilação é de grande importância pela liberação dos grupos acetilo das cadeias lineais da quitosana (ZIANI et al., 2008; TSAIH; CHEN, 1999).

2.2.4. Intumescimento

A predominância dos grupos amino caracterizados pelas ligações covalentes, geram sítios de alta polaridade devido à eletronegatividade do nitrogênio presente na quitosana, tornando assim uma estrutura molecular característica de alto grau de afinidade e retenção de água (ASSIS; SILVA, 2003). Esta habilidade de absorção e retenção de umidade é um fator importante na absorção e liberação de componentes.

O polímero da quitosana é estável em uma conformação quase globular pelas ligações do hidrogênio, as ligações dos grupos amino e hidroxila na cadeia da quitosana influenciam diretamente na viscosidade da solução da quitosana, e o grau de dissociação da ligação de hidrogênio pode afetar a cinética de intumescimento dos géis. A pH baixos as ligações de hidrogênio são dissociadas pela protonação dos grupos amino, o qual conduz a um intumescimento maior em comparação aos pH maiores do pKa da solução (HEJAZI; AMIJ, 1999).

2003). Na literatura se estabelece que a formação de membranas com pH abaixo de 5.0 permite a obtenção de películas com características ótimas para a liberação de componentes inclusos a partir do processo de intumescimento, em comparação as membranas obtidas a pH maiores ou iguais a 5.0.

2.2.5. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A MEV é uma técnica de caracterização que foi iniciada com as pesquisas de Ernst Ruska & Max Knoll em 1931, e tem sido amplamente pesquisada até hoje. O uso do MEV em comparação com o microscópio óptico convencional permite obter imagens com maior resolução ao utilizar elétrons na formação das imagens. O MEV apresenta uma resolução de 10 nm, com aumentos entre 20 e 100.000 vezes da imagem original (CANEVAROLO, 2007).

Para uma ótima interpretação da imagem obtida no MEV, devem-se conhecer os tipos de interações entre os elétrons (usados no equipamento) e a amostra, basicamente estas interações podem ser de dois tipos:

- Espalhamento elástico ou espalhamento de Rutherford: processo em que a energia do elétron não é alterada, mas sua trajetória resultante é modificada. Neste processo a energia cinética do elétron permanece constante, assim o espalhamento dos elétrons ocorre como resultado da interação eletrostática entre o feixe primário e o núcleo de um átomo da amostra. Este tipo de processo é importante no retroespalhamento, o qual permite obter imagens com contraste maior (CANEVAROLO, 2007).

- Espalhamento inelástico: neste processo ocorre a perda de energia dos elétrons que incidem na amostra, além da mudança da sua trajetória. A perda de energia dos elétrons que incidem é transferida para os elétrons de átomos da amostra que são excitados. Ao retirar o feixe de elétrons, os átomos da amostra relaxam até seu estado fundamental, levando a uma

emissão de raios X, comumente conhecido como espectrofotometria de dispersão de energia, e que serve para detectar a presença de átomos específicos na amostra (CANEVAROLO, 2007).

Abugoch et al. (2011) usou a microscopia eletrônica de varredura como parâmetro de caracterização em filmes obtidos a partir da mistura de quitosana com extrato proteico de quinoa, determinando que as blendas obtidas a partir da mistura apresentam uma estrutura homogênea, lisa, continua e compacta, concluindo que o extrato da proteína da quinoa não causa descontinuidade ou porosidade nos filmes quando é misturado com a quitosana.

2.2.6. Análise Elétrica: Curvas Corrente-Tensão (I-V)

Apesar das numerosas vantagens e propriedades únicas da quitosana, o baixo desempenho nas propriedades mecânicas e elétricas restringe a sua utilização numa gama de aplicações, sendo uma abordagem eficaz a incorporação de compósitos como os agentes dopantes, argilas, nanopartículas metálicas e nanotubos com o objetivo de melhorar as propriedades físicas e mecânicas nos filmes (MARROQUIN; RHEE; PARK, 2013).

A análise elétrica a partir das curvas corrente-tensão é uma técnica na qual a amostra sólida é colocada entre dois eletrodos e submetida a uma aplicação de tensão elétrica. O objetivo desta técnica é avaliar o comportamento elétrico do sistema, estabelecendo o transporte dos elétrons ou eventualmente dos íons a partir da diferença de potencial aplicado (no caso de análise DC) (VALENCIA, 2013).

A corrente de condução depende dos fenômenos que ocorrem através dos movimentos dos tipos de cargas no material, sendo que as cargas podem ser intrínsecas ou extrínsecas quando são injetadas através dos eletrodos da amostra (CANEVAROLO, 2007), onde a condutividade elétrica σ é definida como:

$$\sigma = q\eta\mu, \quad (12)$$

onde q é a carga do portador, η é a concentração dos portadores e μ a mobilidade dos portadores (sendo que a velocidade do portador sob a ação de um campo elétrico está dada pela unidade $m^2 V^{-1} s^{-1}$).

Na maioria dos materiais poliméricos a condução de cargas eletrônicas está restrita, sendo que o processo de condução é atribuído ao movimento de íons livres no material, podendo inferir na dopagem, fragmentos de polimerização, degradação ou produtos de dissociação do polímero. A condutividade iônica pode ser descrita pelo modelo no qual o íon está preso a um poço de potencial, e tem probabilidade de saltar uma barreira de potencial para se movimentar para o próximo poço, apresentando uma dependência da corrente com a tensão aplicada, V , com o seno hiperbólico da tensão (CANEVAROLO, 2007):

$$I \propto \sinh \left[\frac{\alpha V}{kT} \right], \quad (13)$$

onde α é uma constante, k é a constante de Boltzmann e T a temperatura em graus *Kelvin*.

Nos materiais isolantes e semicondutores é comum usar a teoria de bandas na descrição do transporte pelos portadores, nesse caso assume-se que os portadores se movem na banda de condução ou de valência, podendo ser capturados em armadilhas, como é o caso dos semicondutores. O fenômeno de injeção de cargas elétricas e o seu acúmulo em armadilhas no volume da amostra produzem uma carga espacial, que gera um campo elétrico adicional no interior do dielétrico, sendo este o motivo pelo qual o campo elétrico não é uniforme na amostra e o seu valor não pode ser dado pela razão entre a tensão elétrica aplicada e a espessura da amostra, e a ocorrência deste tipo de fenômeno se dá principalmente devido à corrente ser limitada pela carga espacial e seu valor variar como (CANEVAROLO, 2007):

$$l \propto \frac{V^2}{L^3} \quad (14)$$

Quando a rigidez dielétrica de um polímero diminui, o efeito da carga espacial tem como consequência um campo mais intenso na amostra que do campo externo, efeito importante para dielétricos, que tem influência no desenvolvimento de memórias orgânicas.

Thanpitcha et al. (2006) avaliou as propriedades elétricas e mecânicas da mistura de polianilina e quitosana, sendo a polianilina (PANI) um dos polímeros condutivos mais estudados com aplicações potenciais no uso em baterias recarregáveis, sensores, membranas comutáveis, revestimentos anticorrosivos e dispositivos eletrônicos, a blenda foi avaliada em termos de composição da mistura e as condições de dopagem do tipo de ácido, concentração de ácido e tempo de dopagem.

Os dispositivos orgânicos exibem vantagens como o baixo custo de fabricação, alta flexibilidade mecânica e versatilidade devido a estrutura química do material em comparação com os dispositivos semicondutores inorgânicos (REDDY et al., 2009), em adição, a transferência eletrônica em filmes poliméricos que apresentam centros redutores expõe dois tipos de transportes (eletrônico e iônico), os quais são associados à estrutura molecular similar às junções moleculares, na medida em que consistem de uma camada orgânica entre dois ou mais sólidos condutores ou semicondutores (BRÜTTING; BERLEB; MÜCKL, 2001), o qual é semelhante aos filmes poliméricos de quitosana estruturados e ou neutralizados com bases.

Segundo McCreery (2004) a variedade dos transportes eletrônicos depende do peso e estrutura molecular, além da temperatura e magnitude da diferença de energia livre entre o doador e aceitador dos elétrons.

As espessuras dos filmes poliméricos apresentam uma barreira ao fluxo de elétrons que é diretamente proporcional ao decrescimento da taxa do fluxo explicado pela teoria do tunelamento. A taxa de tunelamento decresce exponencialmente com a espessura da membrana, que é dada pela forma mais simples da relação de Simmons equação 15 (McCREERY, 2004).

$$J = \frac{q^2 V}{h^2 d} (2m\Phi)^{\frac{1}{2}} \exp \left[\frac{-4\pi d}{h} (2m\Phi)^{1/2} \right], \quad (15)$$

onde J é a densidade de corrente, (A/cm²), q é a carga eletrônica, V é a voltagem aplicada, h é a constante da Plank, m é a massa eletrônica, Φ altura da barreira e d a espessura da barreira.

Segundo McCreery (2004) a equação 15 apresenta os termos de linearidade em uma barreira de tunelamento retangular, sendo que no caso de junções moleculares d é a distância entre os condutores e Φ_T é a altura do tunelamento da barreira expressa em Joules ou elétrons volts.

Sendo a espessura das membranas poliméricas um fator determinante do transporte eletrônico o qual é avaliado na espectrometria de corrente-voltagem, as características de avaliação provem critérios de análises como a injeção de carga e o transporte na membrana (Figura 11). O transporte nas membranas neutralizadas é melhorado devido aos íons presentes após a neutralização, além da configuração das armadilhas estruturais e a configuração final do polímero, que estabelece melhoria no transporte através da membrana polimérica (REDDY et al., 2009).

Segundo Reddy et al. (2009) as condições ambientais, como o oxigênio ou a umidade, alteram as propriedades do transporte dos materiais estruturados ou dispositivos feitos a partir dos polímeros.

Figura 11. Esquema de transferência eletrônica e distribuição de cargas em polímeros: (1) injeção da carga, (2) transporte da carga na espessura do polímero, (3) deslocamento e distribuição das cargas no volume do polímero.

Fonte: BRÜTTING; BERLEB; MÜCKL, 2001, adaptado pelo autor.

A injeção de carga na amostra feita entre os eletrodos é descrita a partir dos modelos de Richardson-Schottky, que descreve o comportamento da emissão termiônica (equação 16) e do Fowler-Nordheim que descreve o tunelamento (equação. 17). Na primeira se observa que a corrente depende exponencialmente da raiz quadrada da tensão aplicada e na segunda a corrente depende do produto da tensão aplicada ao quadrado vezes uma exponencial do inverso da tensão (BRÜTTING; BERLEB; MÜCKL, 2001), assim:

$$I_{RS}(V) \propto e^{\sqrt{AV}} \quad (16)$$

$$I_{FN}(V) \propto V^2 e^{B/V} \quad (17)$$

No processo de caracterização elétrica dos polímeros a partir das curvas de corrente-tensão (I - V), diferentes mecanismos de transporte podem ser percebidos, os quais são função da tensão aplicada e podem ser associados à presença das armadilhas no material orgânico que atuam como poços de potencial com níveis discretos de energia, onde os elétrons podem

ficar confinados, devido a defeitos ou irregularidades quando o polímero é constituído por um único componente. O efeito das armadilhas sob o transporte eletrónico é percebido unicamente quando a energia dos elétrons é igual à energia das armadilhas (BRÜTTING; BERLEB; MÜCKL, 2001). O modelo matemático que descreve este comportamento foi proposto por Mott-Gurney, a partir da equação 14 conhecido como SCLC (Space charge limited current) onde L é a espessura do filme.

$$J_{SCLC} = \frac{9}{8} \varepsilon \varepsilon_0 \mu \frac{V^2}{L^3} \quad (18)$$

As armadilhas serão gradualmente preenchidas com o aumento do campo eléctrico, fator pelo qual a corrente aumentará mais rapidamente do que a parte quadrática, estabelecendo um preenchimento total das armadilhas e aumento da tensão. Os elétrons tem uma probabilidade de cair nos poços de potencial, podendo sair deles quando a energia do elétron é igual à energia do poço seguinte para o qual vai se deslocar (BRÜTTING; BERLEB; MÜCKL, 2001). Quando o transporte eletrónico leva em consideração o efeito do preenchimento das armadilhas, o modelo é conhecido como TCLC (Trap Charge Limited Current):

$$J_{TCLC} = N_C \mu q \left[\frac{\varepsilon \varepsilon_0 l}{N_t q (l+1)} \right]^l \left[\frac{2l+1}{l+1} \right]^{l+1} \frac{V^{l+1}}{d^{2l+1}}, \quad (19)$$

onde l , é igual a $E_t/K_B T$, sendo E_t a energia referente à armadilha.

Os modelos SCLC e TCLC são caracterizados por serem unipolares e unidimensionais.

O preenchimento das armadilhas a partir do aumento do campo eléctrico permite ter fenômenos de tunelamento nas membranas poliméricas, os quais podem ser estudados a partir do diferencial da condutividade dividido pelo total da condutividade (dI/dV), estabelecendo desta forma a fronteira da faixa de condução, mostrando os estados disponíveis para o elétron ocupar. À medida que o elétron aumenta em energia, a densidade de estados do elétron

aumenta e mais estados tornam-se disponíveis para serem ocupados (PASSONI et al., 2009).

A equação 20 modela os níveis de energia que podem ser ocupados em um estado específico.

$$\frac{dI}{d(eV)} = A[T(eV, V, z)\rho_s(eV)\rho_t(0) + T(0, V, z)\rho_s(0)\rho_t(-eV)] \quad (20)$$

Onde T é a barreira de transmissão, z a espessura das amostras.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

O desenvolvimento de biossensores a partir de enzimas imobilizadas requer matrizes poliméricas que apresentem características físico-químicas que assegurem a viabilidade da enzima, e por esta razão o objetivo deste trabalho está focado em caracterizar as propriedades físicas e químicas das membranas de quitosana obtidas a partir da solução do polícatión neutralizado com NaOH e KOH.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar o hidróxido de sódio e hidróxido de potássio como agente neutralizante do polícatión de quitosana.

Produzir membranas de quitosana a partir do polícatión neutralizado e caracterizá-las a partir das técnicas físico-químicas.

Avaliar as mudanças elétricas apresentadas nas membranas de quitosana neutralizadas a partir da derivada da espectroscopia de curvas I-V.

Avaliar a degradação das membranas neutralizadas a partir do ensaio de intumescimento, estabelecendo a transferência de massa das membranas para a solução tampão e a quantidade de umidade absorvida pelo filme.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. MATERIAIS

Para a produção das membranas neutralizadas usadas neste trabalho foi utilizada quitosana com grau de desacetilação de 85% e peso molecular médio da Aldrich Chemical Company Ltd (Brasil), ácido acético glacial da NEOBIO (Brasil), hidróxido de sódio e hidróxido de potássio (grau analítico) da SYNTH (Brasil).

4.2. PRODUÇÃO DE SOLUÇÕES NEUTRALIZANTES

4.2.1. Hidróxido de sódio como solução neutralizante

A solução neutralizante de hidróxido de sódio foi produzida a partir da solubilização NaOH em água deionizada (18,2 mΩ.cm@25°C) em três concentrações molares (0.5, 1 e 5 M). No cálculo da massa necessária da base de NaOH foi usada a equação do cálculo de molaridade de soluções (equação 21), uma vez obtido o valor da massa foram pesados ditos valores e dissolvidos em água deionizada em balão volumétrico e o volume completado para 500 ml.

$$m = [mol].pm.vol , \quad (21)$$

onde m é a massa da base, mol é a concentração molar desejada, pm é o peso molecular da base e vol é o volume final da solução.

4.2.2. Hidróxido de potássio como solução neutralizante

A solução neutralizante de hidróxido de potássio foi produzida a partir da solubilização da base em água deionizada ($18,2 \text{ m}\Omega\cdot\text{cm}@25^\circ\text{C}$) em três concentrações molares (0.5, 1 e 5 M). No cálculo da massa necessária de KOH foi usada a equação do cálculo de molaridade de soluções (equação 21). Uma vez obtidos os valores de massa, estes foram pesados e dissolvidos em água deionizada em balão volumétrico e o volume completado para 500 ml.

4.3. PRODUÇÃO DE SOLUÇÃO TAMPÃO

4.3.1. Produção da solução tampão fosfato (pH5 e pH9)

As soluções tampão fosfato salino (PBS) foram produzidas de acordo com Tanuma et al. (2010). As soluções tampão com diferentes pH's foram preparadas a partir da mistura de fosfato monossódico hidratado ($\text{NaH}_2\text{PO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$) e fosfato dissódico hepta-hidratado ($\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$), sendo que para a elaboração da solução tampão fosfato a pH 5 foram usados 1,3614g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$ e 0,036g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e na elaboração da solução no pH 9 foram usados 0,01g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$ e 2,6605g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ para 100 ml de solução

4.4. PRODUÇÃO DOS FILMES NEUTRALIZADOS DE QUITOSANA

4.4.1. Produção do polícatión de quitosana

A quitosana (1% P/v) em pó com grau de desacetilação de 85% e peso molecular médio, fornecida pela Aldrich Chemical Company Ltd (Brasil), foi solubilizada em diferentes

concentrações da solução de ácido acético e água deionizada 1, 0.8 e 0.5 % (v/v), com agitação constante até a solubilização total da quitosana. A solução viscosa do polícatión foi filtrada em um sistema de vácuo usando um filtro com tamanho de poro 1.2 μm com o objetivo de remover partículas insolúveis e impurezas presentes na quitosana em pó.

As soluções policatiônicas foram classificadas de acordo a concentração de ácido acético usado na solubilização e o tipo e concentração de base usada na neutralização do polícatión. A tabela 1 exemplifica o método de classificação e o nome designado a cada amostra, sendo que o branco é a amostra controle, ou seja, amostra não neutralizada.

4.4.2. Neutralização do polícatión de quitosana

O processo de neutralização do polícatión de quitosana foi efetuado a partir do gotejamento lento da solução neutralizante específica a uma razão de uma gota de solução por minuto (1 gota/minuto), até atingir um pH de 6.0 no polícatión em agitação constante, já que de acordo com Boeris et al., 2011 e Rinaudo, 2006 o pKa do polícatión de quitosana está em torno de 6,3 devido a presença de grupos aminos. O processo de neutralização e gotejamento lento pode-se observar na figura 12.

Figura 12. Gotejamento lento da solução neutralizante no processo de neutralização da quitosana.

Tabela 1. Classificação das amostras a serem tratadas

		Solução Neutralizante NaOH			Solução Neutralizante KOH		
Concentração de ácido acético usado	Branco	0,5 M	1 M	5 M	0,5 M	1 M	5 M
HAc 1%	Qs w ₁	QsSo ₁ 0.5	QsSo ₁ 1.0	QsSo ₁ 5.0	QsPo ₁ 0.5	QsPo ₁ 1.0	QsPo ₁ 5.0
HAc 0.8%	Qs w ₂	QsSo ₂ 0.5	QsSo ₂ 1.0	QsSo ₂ 5.0	QsPo ₂ 0.5	QsPo ₂ 1.0	QsPo ₂ 5.0
HAc 0,5%	Qs w ₃	QsSo ₃ 0.5	QsSo ₃ 1.0	QsSo ₃ 5.0	QsPo ₃ 0.5	QsPo ₃ 1.0	QsPo ₃ 5.0

4.4.3. Produção dos filmes

Os filmes neutralizados foram produzidos pela técnica de “casting”, conforme o fluxograma mostrado na figura 13. A solubilização da quitosana no ácido acético foi feita com agitação constante, usando 1 g de quitosana/100 ml de solução (ácido acético a diferentes concentrações). O polícatión de quitosana foi neutralizado sob agitação constante com controle permanente do pH devido ao gotejamento constante da solução neutralizante, que previamente foi obtida a partir da solubilização das bases em água deionizada em

concentrações molares específicas (0.5, 1 e 5 M). O processo de neutralização foi levado até atingir o pH de 6.0 no polycation. Após a etapa de neutralização do polycation, a solução foi mantida em banho de ultrassom (UltraCleans 1400^a, Unique) por 2 minutos. As soluções filmogênicas foram dispersas em placas de petri (Bioplass) com a mesma quantidade de massa (25 g) para garantir uma espessura constante. As soluções dispersas nas placas de petri foram submetidas à secagem em uma estufa de circulação forçada (MA 037, Marconi) a 30°C, por 48 horas. Após esse tempo, os filmes foram acondicionados em dissecadores com sílica gel até o processo de caracterização.

4.5. CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES NEUTRALIZADOS

4.5.1. Espectroscopia de ultravioleta (UV-VIS)

As soluções filmogênicas padrão ou brancas foram analisadas pela espectroscopia de UV-Vis para avaliar os tipos de ligações presentes a partir das vibrações dos enlaces da quitosana solubilizada nas diferentes concentrações de ácido acético. Os filmes neutralizados foram analisados a partir das mudanças apresentadas nos enlaces na presença das bases no polycation. Para as análises das mudanças no polycation neutralizado com relação às amostras padrão foi empregado um espectrofotômetro Beckman Coulter DU 800, dessa forma, os colóides foram medidos para uma faixa de comprimento de onda entre 200 e 800 nm. Cada determinação foi feita em triplicata.

Figura 13. Fluxograma Geral da produção, neutralização e caracterização do policátion de quitosana.

4.5.2. Espectroscopia de infravermelho (FT-IR)

As interações entre o policátion e as bases foram avaliadas com um espectrofotômetro Perkin Elmer (Spectrum One FT-IR) munido de acessório UATR, de acordo com Vicentini et al. (2005). Foram realizadas varreduras (16 varreduras no ponto) na faixa espectral de 400 a 4000 cm^{-1} com resolução de 2 cm^{-1} . Os dados foram coletados e tratados com o software Spectrum One (Spectrum One, versão 5.3).

4.5.3. Difração de Raios X

A cristalinidade dos filmes neutralizados comparados com a cristalinidade dos filmes padrão foi avaliada a partir da difração de raios X (Rigaku Geigerflex Powder Diffractometer) com Ni-filtrado, radiação de Cu, operado a 30 kV e 30 mA como a fonte raios X. Os padrões

de difração foram registados ao longo de um intervalo de ângulo de difração $2\theta = 5$ até 25° , com uma taxa de varredura de $1^\circ (2\theta)$ por minuto e um tamanho de passo de $0,1^\circ (2\theta)$.

4.5.4. Espessura dos filmes

A espessura dos filmes foi determinada utilizando-se um micrometro digital (MITUTOYO) com escala de 0-25 mm e precisão de 0,001 mm. Os valores foram apresentados como a média de dez medidas feitas aleatoriamente ao longo de cada amostra avaliada, realizando triplicatas de cada tipo de filme.

4.5.5. Intumescimento

As amostras dos filmes foram cortadas em formato de quadrado de 10x10 mm. As mostras respectivamente secas e estabilizadas no dissecador por 72 horas foram retiradas e pesadas (balança analítica Shimadzu AUY220) para determinar o peso da amostra seca. Após a pesagem as amostras foram imersas nas soluções de tampão fosfato de pH 5 e 9 respectivamente. Para determinar a porcentagem de intumescimento foi necessário coletar dados por um período de 72 horas iniciando a coleta de dados a cada 15 minutos por uma hora, e cada hora até completar 4 horas. Após este tempo a coleta foi feita a cada 4 horas até completar 8 horas, e então realizada a cada 8 horas até completar as primeiras 24 horas, finalizando a coleta de dados a cada 24 horas até completar as 72 horas do teste. Para estabelecer a porcentagem de intumescimento é necessário relacionar o peso seco da amostra com o peso da amostra hidratada (equação 22). Para o qual as amostras foram retiradas da solução de intumescimento no tempo estabelecido da coleta de dados e retirando o excesso de

umidade da superfície do filme com papel filtro previamente umedecido, garantindo a absorção só da umidade da superfície do filme.

$$S(t) = \left[\frac{W(t)}{W_0} - 1 \right] \times 100 \quad (22)$$

No processo de análises de dados uma figura de mérito e o intumescimento médio normalizado para o qual é usada a equação 23 definida pela seguinte integral:

$$\omega_s = \frac{1}{\tau} \int_0^{\tau} \frac{S(t)}{S_{max}} dt, \quad (23)$$

onde S_{max} é o valor máximo de intumescimento de cada amostra. Esta figura de mérito ω_s toma valores entre 0 e 1 e permite distinguir os diferentes comportamentos das amostras.

4.5.6. Propriedades mecânicas

As propriedades mecânicas dos filmes foram avaliadas por testes de tração (módulo de elasticidade, porcentagem de alongação, tensão na ruptura e energia necessária para a fratura) utilizando-se um texturômetro TA.XT2i (TA Instrumens).

Na determinação das propriedades mecânicas pelo teste de tração, os filmes foram cortados em tiras de 15 mm de largura e 80 mm de comprimento; seguidamente os filmes foram acondicionados no dissecador com sílica gel durante sete dias. As tiras foram fixadas nas garras do texturômetro com uma altura inicial de 50 mm (l_0) e uma velocidade de tração constante de 0,9 mm/s, os filmes foram tracionados até a ruptura, gerando uma curva de tensão (MPa) por alongação (%). Para as análises foram realizadas triplicatas.

A tensão na ruptura (MPa) é a tensão máxima que o filme pode suportar antes de se romper, a qual é calculada dividindo a máxima carga suportada pela área da seção transversal do filme. A alongação na ruptura é a porcentagem de alteração no comprimento do filme pela

ação da força aplicada no ensaio de tração em relação ao comprimento inicial. O módulo de elasticidade (Young, ME, em Mpa/%) foi obtido a partir do cálculo da inclinação da porção linear da curva. A energia necessária para a fratura foi determinada a partir do cálculo da área abaixo da curva da força e por deslocamento.

4.5.7. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A microestrutura superficial e interna, além da análise elementar (Energy Dispersive X-ray Spectroscopy or EDS) dos filmes de quitosana padrão e os neutralizados, também foram analisadas a partir do microscópio eletrônico de varredura (MEV) (Hitachi, TM30000) a 15 kV. Para as análises usando o MEV as amostras foram previamente condicionadas em dissecadores com sílica gel sob vácuo, sendo que para a análise da microscopia interna os filmes foram crio-fraturados, após da imersão em nitrogênio líquido.

4.5.8. Espectroscopia de curvas tensão-Voltagem (I-V)

A reposta elétrica das membranas neutralizadas em relação às amostras padrão foi avaliada ao contato entre os eletrodos do arranjo de ensaios de resistividade KEITHLEY 8009 (Resistivity test fixture) controlado pelo electrómetro com fonte KEITHLEY 6517B (Electrometer/ High Resistance Meter). O acoplamento dos equipamentos permite avaliar a resposta elétrica tanto no volume do filme como na superfície deste. A avaliação elétrica dos filmes foi feita na temperatura ambiente. Os testes elétricos foram fixos na faixa de 0 até 60 volts com um passo de 0,2 volts e um tempo de relaxação de 5 segundos. Para cada ensaio foi feita uma curva I-V.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Neutralização do polícatión de quitosana

O processo de neutralização do polícatión sem atingir o pKa (6.3) da quitosana (BOERIS et al., 2011; RINAUDO, 2006) usando bases de sódio e potássio em diferentes concentrações pelo método de gotejamento lento permite a obtenção de filmes com propriedades físicas e químicas que podem ter uma gama de utilidades, entre estas o desenvolvimento de matrizes poliméricas ideais para a imobilização de receptores biológicos, que são a base de biossensores; isto devido a capacidade de rastrear as cargas iônicas da quitosana na solução ácida pelas bases empregadas (EL-TAHLAWY; HUDSON, 2006). As soluções do polícatión não apresentaram uma diferença significativa quanto à cor destas, já que todas exibiram uma transparência similar quando são usadas as diferentes concentrações de ácido acético na solubilização da quitosana e as diferentes concentrações das bases usadas para a neutralização do polícatión. Em contraste os filmes apresentam diferenças, já que os neutralizados com sódio possuem uma coloração branca, enquanto os filmes neutralizados com potássio exibem uma transparência similar aos filmes sem tratamento. Esta diferença pode estar associada aos diferentes raios iônicos do sódio ($\text{Na}^+ = 0.95 \text{ \AA}$) e do potássio ($\text{K}^+ = 1.33 \text{ \AA}$), presentes nas soluções de neutralização, além disso, a coloração branca nos filmes obtidos do polícatión de quitosana neutralizado com soluções de hidróxido de sódio está diretamente ligada a uma formação de acetato de sódio na superfície da membrana, enquanto que nas membranas obtidas do polícatión neutralizado com hidróxido de potássio, esta formação de acetato poderia estar presente na estrutura das membranas. O trabalho de El-tahlawy e Hudson (2006) que consiste na micro-precipitação da solução de quitosana a partir de soluções de lítio, potássio, sódio e acetato de sódio, estabeleceram que o potássio teve um

comportamento melhor no processo de coagulação, além de melhorar as propriedades de tração das fibras obtidas; isto devido a que o raio iônico do potássio por ser menor estabelece uma distribuição mais uniforme ao longo do volume da matriz polimérica, obtendo desta forma uma coloração uniforme, sendo neste caso similar aos filmes sem neutralização. A coloração dos filmes é apresentada na figura 14.

Figura 14. Filmes de quitosana 1% sem tratamento (A), neutralizado com NaOH (B), neutralizado com KOH (C).

5.2. Caracterização dos filmes de quitosana neutralizados com bases de sódio e potássio

5.2.1. Espectroscopia de ultravioleta (UV-VIS)

O polímero de quitosana solubilizado com três concentrações de ácido acético e neutralizado com duas diferentes bases com três concentrações molares foram caracterizados por espectroscopia de UV-vis em uma faixa de comprimento de onda de 200 até 600 nm. Os espectros obtidos, mostrados na figura 15, se caracterizam por um incremento na absorção de onda perto de 240 nm em relação aos respectivos brancos e ligeiramente deslocado na direção

dos comprimentos de onda curtos sendo que o aumento na absorção está diretamente ligado ao aumento no uso do ácido acético na solubilização da quitosana. O deslocamento em comprimento de onda observado pode estar associado a uma variação da cristalinidade dentro da matriz do polímero. A banda de 225 nm no espectro UV-vis é atribuída aos enlaces iônicos ($\eta \rightarrow \pi$) que são afetados diretamente com a base usada para a neutralização do polímero de quitosana quando este é solubilizado com uma porcentagem de ácido acético igual ou maior a 1%. As absorções perto de 280 nm são atribuídas a ligações insaturadas de enlaces covalentes ($\pi \rightarrow \pi$) principalmente do C-O, que aumenta a intensidade de absorção com aumento da concentração de quitosana (BONILLA et al., 2014; ABDELRAZEK; ELASHMAWI; LABEED, 2010).

Figura 15. Espectros UV-vis da quitosana solubilizada com diferentes concentrações de ácido acético, 1% p/v (A), 0.8% (B) e 0.5% (C) e neutralizadas com diferentes concentrações de bases.

A absorção de UV-vis na faixa de 240 nm confirma a alteração da ionização dos grupos amina da cadeia de quitosana, exibindo um aumento na intensidade do pico após o processo de neutralização em comparação a cada branco, isto devido à natureza dos substituintes ligados ao átomo de nitrogênio, sendo que com o aumento da eletronegatividade do composto a frequência de alongamento aumenta apresentando o efeito de absorção nesta faixa (SHU; ZHU; SONG, 2001; S.ULĆUMLIĆ; KSHAD; MIJIN, 2003; CHEN; SUN, 2006; LI et al., 2013).

5.2.2. Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR)

Para efeito de explicação do processo de neutralização dos filmes de quitosana foram feitas análises de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR). Os espectros dos filmes sem tratamento estão apresentados na figura 16. Os filmes de quitosana apresentaram bandas características a 3450 cm^{-1} (alongamento do grupo O-H), 3299 cm^{-1} (alongamento do grupo N-H), 2898 cm^{-1} (alongamento do grupo C-H), 1655 cm^{-1} (banda da amida I), 1560 cm^{-1} (banda da amida II, alongamento do N-H), 1410 cm^{-1} (assimetria do grupo C-H e flexão do grupo CH_2), 1310 cm^{-1} (banda da amida III), 1150 cm^{-1} (vibração esquelética que envolve o alongamento da ponte C-O-C) e 1080 cm^{-1} (vibrações esqueléticas próprias da estrutura piranose da quitosana) (BONILLA et al., 2014; ABDELRAZEK; ELASHMAWI; LABEED, 2010; SINGH; DUTTA, 2009; PENICHE, 2006).

Os espectros da quitosana solubilizada com diferentes concentrações de ácido acético não apresentam diferença nos picos característicos, como mostrado na figura 16. No entanto, observa-se que as diferentes concentrações de ácido acético influenciam os picos de referência da quitosana quando o polímero é neutralizado particularmente com KOH (Figura 17).

Figura 16. Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) Quitosana 1% (p/v) solubilizada com ácido acético em concentrações (v/v) de 1% (A) 0.8% (B) e 0.5% (C).

Os espectros de FT-IR dos filmes de quitosana neutralizados com sódio e potássio não exibem uma mudança na intensidade dos picos quando é usada a mesma base em diferentes concentrações, mas uma diferença na intensidade é exposta quando são comparadas as duas bases na mesma concentração no processo de neutralização. Isto se pode observar na figura 17 onde os picos do filme neutralizado com potássio expõem uma intensidade maior comparado com os filmes neutralizados com sódio que ao mesmo tempo exibem uma intensidade maior que o filme sem tratamento.

Figura 17. Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) Quitosana 1% (p/v) solubilizada com ácido acético em concentração (v/v) de 1%, filme sem tratamento (A), filme neutralizado com NaOH 1 M (B), KOH 1 M (C).

Segundo He et al. (2011) os picos característicos para os grupos amino protonados (NH_3^+) na estrutura da quitosana estão perto de 1588 cm^{-1} , desta forma se pode avaliar o grau de protonação da amina com a intensidade do pico exibido no espectro FT-IR estabelecendo que o grau de cristalinidade da estrutura pode ser identificado a partir da intensidade do pico 1410 cm^{-1} , que apresenta a estabilidade da vibração na fase amorfa da amida III (CH_2) (PUCIC; JURKIN, 2012).

A figura 18 mostra os efeitos da neutralização dos filmes de quitosana solubilizados com a menor concentração de ácido acético (0.5%), estabelecendo desta forma que a concentração de ácido acético abaixo de 1% não interfere no desenvolvimento dos picos característicos da quitosana e que a melhor base para o processo de neutralização é o potássio

devido ao acréscimo da intensidade vibracional no espectro para os picos característicos do processo de neutralização da quitosana.

Figura 18. Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) dos filmes de quitosana obtidos pela solubilização desta com ácido acético 1% (A-B) e 0.5% (C-D) e neutralizados com hidróxido de sódio e potássio.

5.2.3. Difração de Raios X

Com a finalidade de analisar a influência do processo de neutralização na cristalinidade das membranas de quitosana estas foram analisadas pela difração de raios X.

Segundo Wan et al. (2006a) a estrutura cristalina da quitosana é mantida principalmente pela ligação de hidrogênio intramolecular e intermolecular, estabelecido por um grupo amino

em C-2 e um grupo hidroxilo em C-3 e a segunda é formada entre dois grupos hidroxilo em C-6 e C-3, posições através de uma molécula de água absorvida.

Tipicamente, as membranas de quitosana apresentam dois picos característicos, os quais estão relacionados a dois tipos de cristais que estão presentes na matriz polimérica. O primeiro dos picos possui uma reflexão forte em $2\theta = 11.5^\circ$ e está catalogado como a forma de cristal I com uma configuração ortorrômbica e possuindo uma célula unitária de $a=7.76 \text{ \AA}$, $b=10.91 \text{ \AA}$, e $c=10.30 \text{ \AA}$, $\beta=90^\circ$. O segundo pico possui uma reflexão em $2\theta = 20.1^\circ$ associado à forma de cristal II também com uma configuração ortorrômbica e uma célula unitária de $a=4.4 \text{ \AA}$, $b=10.0 \text{ \AA}$, e $c=10.30 \text{ \AA}$ $\beta=90^\circ$ (eixo da fibra). O tamanho da célula unitária do cristal I é maior que a célula do cristal II, devido à célula unitária do cristal I estar constituída por duas unidades monoméricas ao longo do eixo principal da cadeia polimérica, enquanto o cristal II possui apenas uma unidade monomérica ao longo do eixo principal (LIMA et al., 2006).

A figura 19 apresenta os resultados da difração de raios X das membranas de quitosana solubilizadas com diferentes concentrações de ácido acético sem o processo de neutralização, mostrando que a concentração de ácido não tem influência na formação dos cristais característicos das membranas de quitosana, apresentando os dois picos característicos em $2\theta = 11.5^\circ$ e $2\theta = 20.1^\circ$.

Figura 19. Difratoograma de Raios X da quitosana em concentração 1% solubilizada em ácido acético em concentrações de: (A) 1% (B) 0,8% e (C) 0,5%.

Os resultados de difração de raios X das membranas de quitosana neutralizadas com hidróxido de sódio e hidróxido de potássio em concentrações de 0,5, 1 e 5 M indicam uma mudança na conformação da estrutura do cristal tipo I no polimorfo da quitosana. A figura 20 mostra a análise de difratometria de raios X das membranas de quitosana neutralizadas, exibindo uma redução do pico $2\theta = 11.5^\circ$ o qual é característico da parte (Tendão) hidratada na estrutura polimérica das membranas de quitosana (HE et al., 2011). Segundo Zong et al. (2000) a modificação do pico relacionado à morfologia do cristal do tipo I na difratometria de raios X da estrutura cristalina da rede polimérica de quitosana está diretamente ligada com a perda de ligações de hidrogênio e desprotonação dos grupos amino na estrutura polimérica da quitosana após tratamento de neutralização.

Figura 20. Difratoograma de Raios X da quitosana neutralizada com KOH em concentração molar de (A) Branco, (B) 0,5 M e (C) 5 M.

A modificação na cristalografia da rede polimérica de quitosana está diretamente ligada com as interações intra e intermoleculares da rede tridimensional da quitosana e de compostos que possam gerar algum tipo de modificação nesta (ABUGOCH et al., 2011). A figura 21 apresenta os difratogramas de raios X dos filmes neutralizadas com NaOH e KOH, exibindo uma mudança só no pico $2\theta = 11.5^\circ$.

Figura 21. Difratoograma de Raios X da quitosana neutralizada com bases em concentração molar de 0.5 M (A) Branco, (B) NaOH e (C) KOH.

5.2.4. Espessura dos filmes

Os valores médios de espessura dos filmes sem tratamento (brancos) e após o processo de neutralização do polímero de quitosana a partir da solubilização desta com diferentes concentrações de ácido acético são mostrados na figura 22. A espessura dos filmes teve um acréscimo a partir do tipo de base, exibindo maior espessura nos filmes neutralizados com KOH em comparação com os filmes neutralizados com NaOH. Os filmes neutralizados com NaOH apresentaram um incremento de 14%, em relação ao branco, enquanto que os filmes neutralizados com KOH exibiram 68% de incremento na espessura, e uma diferença de 32% em relação ao filme neutralizado com NaOH. O aumento na espessura está diretamente ligado a uma possível formação de acetato, no caso das membranas obtidas com o polímero neutralizado com hidróxido de sódio tiveram uma formação de acetato de sódio na superfície

da membrana, mudando a coloração e espessura desta, enquanto que as membranas obtidas com o polícatión de quitosana neutralizado com hidróxido de potássio apresentaram uma espessura maior em relação aos outros filmes, pela relação direta à formação de acetato na estrutura e volume da membrana. Resultados similares ao aumento da espessura foram reportados por pesquisadores que estabeleceram um aumento significativo na espessura após a neutralização e/ou incorporação de dopantes nos filmes de quitosana (THAKHIEW ; DEVAHASTIN; SOPONRONNARIT, 2013; KHOSHGOZARAN-ABRAS et al., 2012; CAMPOS et al., 2005).

Figura 22. Valores médios de espessura dos filmes de quitosana em função do tipo de base usada e a concentração no processo de neutralização do polícatión.

5.2.5. Intumescimento

A resistência dos polímeros a ambientes com alto conteúdo de umidade está diretamente relacionada à presença de grupos hidrofílicos e ao grau de reticulação molecular,

e à presença de grupos polares iônicos na estrutura dos filmes de quitosana, que lhes permitem ter uma sensibilidade maior ao pH do meio no qual os filmes tenham uma interação (TASSELLI et al., 2013; GHOSH; ALI; WALLS, 2010). A avaliação do intumescimento em meios ácidos e básicos permite estabelecer perda de massa e ganho de umidade nos filmes de quitosana após o processo de neutralização. O grau de intumescimento nos filmes foi calculado a partir da equação 22, e mostrado nas figuras 23 e 24.

A figura 23 exhibe o intumescimento dos filmes que foram neutralizados com a solução de NaOH nas três diferentes concentrações. Os mesmos foram imersos em solução tampão fosfato com pH 5 e 9. Após o ganho inicial de massa devido à absorção de água em tempo inferior a três horas (figura 23 A1, B1) os filmes tendem a estabilizar com o tempo (figura 23 A2, B2). Os filmes sem tratamento exibem uma estabilização mais prolongada em comparação com os filmes neutralizados, já que estes apresentam dois comportamentos, uma curva crescente devido à absorção de umidade e um padrão final decrescente atribuído à perda de massa na estabilização dos filmes na solução tampão. O padrão observado está diretamente ligado ao pH da solução de imersão, a concentração e tipo de base usada na neutralização do polímero. Os filmes neutralizados com NaOH mostram uma absorção de água, e perda de massa mais estáveis ao longo do tempo para a concentração de 5 M; neste sentido, as amostras neutralizadas com as concentrações mais baixas de base são claramente mais estáveis. Ghosh, Ali e Walls (2010) avaliaram o grau de inchamento de filmes de quitosana reticulados imersos em solução de pH 5,2 enquanto que Tanabe et al. (2002) avaliaram o inchamento do compósito de quitosana e queratina numa solução de pH 4.0. Em ambos os casos, as membranas de quitosana reticulada e de compósito com queratina exibiram uma perda de massa completa até a dissolução no meio aquoso. No entanto, Ghosh, Ali e Walls (2010) e Tanabe et al. (2002) destacaram uma supressão de inchamento nas membranas imersas em soluções tampão altamente alcalinas, o que tem concordância com nossos

resultados, sendo que eles atribuem este efeito a imobilização das cadeias de quitosana ou o bloqueio da repulsão eletrostática, comportamento que é observado para as membranas neutralizadas com KOH, o qual está diretamente ligado as modificações estruturais exibidas no espectro FT-IR mostrado na figura 17.

Figura 23. Cinética de intumescimento dos filmes de quitosana neutralizados com NaOH em tampão fosfato pH5 (A1, A2) e tampão fosfato pH9 (B1,B2) a 37.5°C por 72h (□) Qs w0, (○) QsSo0.5, (Δ) QsSo1.0, (◇) QsSo5.0.

Os filmes neutralizados com KOH e imersos em solução aquosa tampão fosfato pH9 apresentaram uma perda de massa considerável em relação as mesmas amostras imersas em tampão fosfato pH5. De novo este fato pode ser explicado em termos da afinidade eletrostática entre o meio aquoso e a estrutura modificada da quitosana, além da interação dos íons de potássio remanescentes na rede tridimensional da quitosana, permitindo desta forma uma alta transferência de massa dos filmes com o meio reagente (figura 24). A quitosana é um polissacarídeo que contém grupos amino com um pKa perto da neutralidade (TASSELLI et al., 2013; BOERIS et al., 2011; RINAUDO, 2006; SHU; ZHU, 2002) por conseguinte em pH<5.0 a repulsão eletrostática entre os grupos amino primários protonados (NH_3^+) excedem as interações eletrostáticas com os grupos COO^- induzindo a dissolução das películas sem tratamento. É por esta razão que tais filmes em soluções com pH5 possuem a capacidade de intumescer, além de manter a sua estrutura e rede tridimensional ao longo do tempo (VANICHVATTANADECHA; SUPAPHOL; RUJIRAVANIT, 2008; TANABE et al., 2002).

Figura 24. Cinética de intumescimento dos filmes de quitosana neutralizados com KOH em tampão fosfato pH5 (A1, A2) e tampão fosfato pH9 (B1,B2) a 37.5°C por 72h (□) Qs w0, (○) QsPo0.5, (Δ) QsPo1.0, (◇) QsPo5.0.

A figura 25 apresenta os valores médios normalizados do processo de neutralização dos filmes de quitosana solubilizados com diferentes concentrações de ácido acético. A captura

máxima de umidade ocorre nas primeiras horas do processo, observando-se posteriormente uma perda de massa ao longo do tempo. Enquanto ao intumescimento, filmes com concentrações de ácido acético menor ou igual a 1% e maior ou igual a 0,5% apresentaram comportamentos semelhantes aos filmes com 1% e 0,5% respectivamente.

Figura 25. Cinética de intumescimento normalizada dos filmes de quitosana neutralizados com NaOH e KOH 0.5 M imersos em tampão fosfato pH5 NaOH (A) e KOH (C) e tampão fosfato pH9 NaOH (B) e KOH (D) a 37.5°C por 72h, solubilizados com ácido acético ($\square$) 1%, ($\circ$) 0.8%, (Δ) 0.5%.

A figura 26 apresenta a cinética de intumescimento das primeiras horas do processo, estabelecendo o máximo ponto de captura de umidade nos primeiros 15 minutos, após este tempo os filmes apresentam uma estabilização e começa o processo de transferência de massa do filme para a solução devido a uma possível degradação da membrana e pela solubilização dos cristais formados pelos íons remanescentes da base usada na neutralização após da secagem dos filmes.

Figura 26. Cinética de intumescimento normalizada da primeira hora dos filmes de quitosana neutralizados com NaOH e KOH 0.5 M imersos em tampão fosfato pH5 (A-C) e tampão fosfato pH9 (B-D) a 37.5°C, solubilizados com ácido acético (□) 1%, (○) 0.8%, (Δ) 0.5%.

Os diferentes padrões de comportamento dos filmes neutralizados em comparação aos filmes sem neutralização na presença de umidade podem ser analisados melhor usando o intumescimento médio normalizado, o qual está definido pela equação 23 e que é proporcional à área embaixo da curva do intumescimento. O aumento inicial, relativamente rápido e aproximadamente igual para todas as amostras permite a obtenção de uma curva que exibe um comportamento crescente normalizado perto de um, enquanto que a curva que decresce no tempo resultará em valores menores para este parâmetro. Os diferentes comportamentos, que estão diretamente ligados à perda de massa pelos filmes, são representados na figura 27. As membranas de quitosana neutralizadas apresentam uma área menor em comparação com as membranas sem tratamento, devido à interação dos cristais de

sódio e potássio presentes na rede estrutural da quitosana com a solução de intumescimento, levando a uma perda de massa considerável em relação à concentração de base usada no processo de neutralização do polícatón.

Figura 27. Cinética de intumescimento normalizada dos filmes de quitosana sem neutralização com relação aos neutralizados.

O processo de transferência de massa dos cristais de sódio e potássio dos filmes para a solução de intumescimento pode ser constatado pelo acréscimo da condutividade específica na solução de intumescimento. A tabela 2 mostra as condutividades específicas das soluções tampão fosfato antes e após do processo de intumescimento dos filmes neutralizados, revelando um aumento na condutividade da solução produto da transferência e solubilização dos cristais na solução de intumescimento. O uso de bases fortes ou hidróxidos alcalinos como LiOH, KOH e NaOH ($M-OH \rightarrow M^+ + OH^-$) permite a obtenção de hidrônios capazes de neutralizar a dissociação do ácido e obter o equilíbrio da eletro-neutralidade na estrutura polimérica, mas os íons (M^+) remanescentes na rede polimérica incrementam a condução iônica do polieletrólito (MOBARAK et al., 2013; CARDOSO et al., 2009; DÍAZ, 2002;

GADJOUROVA et al., 2001). No processo de intumescimento os íons remanescentes na rede polimérica são liberados obtendo desta forma um incremento na condutividade da solução de intumescimento e uma perda de massa nos filmes ao longo do tempo.

Tabela 2. Condutividade das soluções tampão fosfato pH5 e pH9 após o processo de intumescimento (72h) com o erro padrão.

Solução tampão fosfato pH5, Condutividade Especifica 7.14 mS/cm							
[HAC %]	Branco	NaOH			KOH		
		0.5 M	1 M	5 M	0.5 M	1 M	5 M
1%	7.66±0.089	8.04±0.089	7.94±0.072	8.03±0.253	8.01±0.115	8.04±0.106	8.11±0.077
0.8%	7.77±0.077	8.05±0.078	8.08±0.128	8.06±0.111	8.03±0.133	8.06±0.771	8.14±0.126
0.5%	7.82±0.253	8.08±0.107	8.11±0.104	8.12±0.117	8.05±0.116	8.09±0.053	8.17±0.141

Solução tampão fosfato pH9, Condutividade Especifica 14.3 mS/cm							
[HAC %]	Branco	NaOH			KOH		
		0.5 M	1 M	5 M	0.5 M	1 M	5 M
1%	15.46±0.176	15.57±0.106	15.77±0.207	15.64±0.142	15.54±0.114	15.52±0.185	15.69±0.123
0.8%	15.58±0.273	15.71±0.152	15.78±0.179	15.87±0.135	15.71±0.196	15.86±0.198	15.74±0.109
0.5%	15.72±0.245	15.89±0.261	15.84±0.101	15.92±0.210	15.84±0.180	15.88±0.213	15.84±0.274

Segundo Li et al. (2006) a condutividade no polycation de quitosana está diretamente afetada pela concentração de quitosana devido a sua baixa concentração de íons livres necessários no processo de transporte de carga. A tabela 2 mostra um aumento na condutividade das soluções de intumescimento quando a concentração de quitosana aumenta em relação à quantidade de ácido acético usada na solubilização da quitosana em pó, o que está diretamente relacionado com a transferência de hidrônios da base usada na neutralização do filme, que migram para a solução de intumescimento devido à baixa concentração de grupos aminos protonados no polycation e consequentemente no filme.

5.2.6. Propriedades mecânicas

Dependendo da aplicação, as membranas biodegradáveis devem suportar as cargas mecânicas demandadas durante seu funcionamento, transporte e manuseio, a fim de manter sua integridade e diversas propriedades, como a de barreira, resistência à tração e deformação antes da ruptura, etc. (BONILLA et al., 2013; LI et al., 2011).

Os resultados obtidos das análises mecânicas dos filmes de quitosana solubilizados em três concentrações de ácido acético e neutralizados com três concentrações molares de hidróxido de sódio e hidróxido de potássio estão resumidos na tabela 3. As propriedades mecânicas, como resistência à tração (σ) (a tensão máxima de tração que o filme pode suportar em MPa), alongação à ruptura ($\epsilon_{\max}$), (variação máxima do comprimento do filme antes de ser quebrado, em %), módulo de elasticidade E (que é uma medida da rigidez da película, em MPa) e a energia para rompimento (KJ/m^2) (energia necessária para quebrar a película) foram considerados como os principais parâmetros de interesse.

O processo de neutralização do polycation de quitosana gera membranas com modificações no nível molecular notadas nas faixas do espectro de FT-IR que estão diretamente relacionados com as características físico-químicas e propriedades mecânicas destes.

Tabela 3. Propriedades mecânicas dos filmes de quitosana antes e após o processo de neutralização com NaOH e KOH.

Codificação das amostras	Resistência à tração (σ) (MPa)	Elongação à ruptura (ϵ) (%)	Módulo de elasticidade (E) (MPa)	Energia para ruptura (KJ/m ²)
Qs w1	98.82±0.72	6.28±0.07	2442.61±198.63	195.371±17.45
QsSo10.5	48.43±0.68	2.48±0.07	2463.02±185.32	25.907±4.54
QsSo11.0	44.74±0.98	2.17±0.09	2658.67±219.63	20.864±3.58
QsSo15.0	35.02±0.51	1.74±0.05	3076.93±275.53	11.559±2.21
QsPo10.5	12.25±0.95	3.68±0.07	660.52±89.63	14.433±1.08
QsPo11.0	20.22±0.85	6.45±0.09	807.79±97.45	45.643±3.45
QsPo15.0	19.82±0.94	6.49±0.07	816.14±92.85	44.918±2.18
Qs w2	107.55±2.11	6.42±0.02	3374.35±212.28	239.737±19.87
QsSo20.5	76.1±1.08	2.25±0.03	4329.78±282.81	39.637±1.45
QsSo21.0	79.5±1.17	3.73±0.02	3597.5±231.78	83.865±4.85
QsSo25.0	89.34±1.51	4.1±0.02	3265.4±210.48	101.022±9.77
QsPo20.5	75.28±1.23	2.72±0.05	3578.15±222.22	44.054±1.54
QsPo21.0	46.51±0.95	4.34±0.04	2031.49±182.28	68.573±2.87
QsPo25.0	80.16±1.03	3.99±0.09	3535.9±242.44	86.524±3.24
Qs w3	110.11±2.23	4.72±0.04	3291.74±187.91	154.28±4.69
QsSo30.5	102.12±2.35	4.5±0.05	3878.32±198.15	136.069±4.84
QsSo31.0	96.02±1.23	4.55±0.03	3962.47±201.11	136.183±4.12
QsSo35.0	86.92±1.12	5.42±0.04	4083.23±231.35	174.576±5.14
QsPo30.5	114.83±2.34	3.62±0.08	4464.65±242.91	119.187±3.87
QsPo31.0	63.54±0.93	2.64±0.09	3217.24±211.51	37.281±2.69
QsPo35.0	88.49±1.03	2.76±0.04	3974.87±271.08	61.092±3.01

Dados seguidos de seus erros padrão.

O uso de diferentes concentrações de ácido acético (1, 0.8 e 0.5%) na solubilização da quitosana não proporciona uma diferença significativa nas membranas sem o processo de neutralização, mas a capacidade de resistência à tração está diretamente ligada com as forças de coesão da matriz polimérica como resultado das interações intermoleculares, e são afetadas pela concentração e tipo de base usada no processo de neutralização (BONILLA et al., 2013).

A figura 28 apresenta a resistência a tração dos filmes (MPa) de quitosana sem e após o processo de neutralização, estabelecendo que os filmes solubilizados com uma concentração de 0,5% ácido acético e neutralizados com hidróxido de potássio a uma concentração de 0,5 M exibem uma resistência maior ao ensaio de tração, o que pode estar atribuído a uma melhora na ductilidade do material. Wan et al. (2006b) obtiveram resultados similares no ensaio de tração e atribuíram os resultados a uma melhora na ductilidade do material devido a porosidade da membrana feita pelos pequenos cristais de KOH remanescentes nos filmes de quitosana.

Figura 28. Comparação dos resultados do ensaio de tração das membranas sem neutralizar (Qs W0) com as membranas neutralizadas usando NaOH e KOH em diferentes concentrações, solubilizadas com ácido acético em concentrações de (//) 1%, (x) 0,8%, (\\) 0,5%.

A figura 29 mostra a deformação dos filmes neutralizados, exibindo que as amostras neutralizadas com KOH apresentam uma maior porcentagem de deformação em comparação com as amostras neutralizadas com NaOH e as amostras sem tratamento. Azevedo et al.

(2006), afirmam que o uso de plastificantes em membranas de quitosana aumentam a ductilidade do material, diminuindo a resistência a tração e aumentando a elongação da membrana. Na figura 28 pode-se observar que as amostras solubilizadas com ácido acético em concentração de 1% e neutralizadas com KOH 1 e 5 M apresentam a menor resistência a tração, enquanto na figura 29 estas mesmas amostras apresentam maior porcentagem de elongação, o que pode ser atribuído a possibilidade de o KOH possui uma capacidade plastificante nas membranas de quitosana. A melhora da flexibilidade das membranas poliméricas está diretamente ligada à adição de agentes plastificantes nas estruturas poliméricas, levando a uma diminuição das forças intermoleculares ao longo da rede tridimensional. Estes plastificantes possuem a capacidade de reduzir a resistência e aumentar a porcentagem de deformação devido a um aumento na absorção de água pelos filmes, conseguindo uma maior mobilidade na cadeia da quitosana (MARTÍNEZ-CAMACHO et al., 2010; AZEVEDO et al., 2006).

Figura 29. Porcentagem de deformação das membranas sem neutralizar (Qs W0) e as membranas neutralizadas usando NaOH e KOH em diferentes concentrações, solubilizadas com ácido acético em concentrações de (//) 1%, (x) 0,8%, (\\) 0,5%.

A estrutura molecular protonada da quitosana experimenta forças de atração, força de Van der Waals e ligações de hidrogênio que são reforçadas envolvendo moléculas de água ao longo da estrutura, enquanto as cadeias do polímero neutralizado possuem uma coesão menor devido às ligações fracas com as moléculas de água e a desprotonação dos grupos amino (BONILLA et al., 2013). As modificações estruturais nas cadeias da quitosana envolvem mudanças nas características próprias dos filmes. A figura 30 mostra os resultados obtidos do módulo de elasticidade (Young) das membranas de quitosana neutralizadas (Fig. 30A) e a energia (KJ/m^2) necessária para a ruptura do filme, uma vez que este está sendo tracionado (Fig. 30B). Wan et al. (2006b), estabeleceram que o módulo de elasticidade e a energia necessária para a ruptura das membranas diminuem significativamente com a presença de KOH no interior da membrana, enquanto que He et al. (2011) obtiveram um incremento no módulo de elasticidade das membranas neutralizadas com NaOH, o qual é similar aos resultados apresentados neste trabalho, onde as membranas neutralizadas com NaOH exibem um incremento no módulo de elasticidade em comparação com as membranas neutralizadas com KOH. Ao mesmo tempo, as membranas neutralizadas com NaOH possuem uma deformação menor pelo qual é possível afirmar que as membranas neutralizadas com NaOH exibem um comportamento mais frágil em comparação as membranas neutralizadas com KOH, que exibem um comportamento dúctil.

Na figura 31 pode se observar um leve aumento do módulo de elasticidade com o aumento da concentração de NaOH e de KOH, no entanto, no segundo caso os valores de módulo de elasticidades são muito inferiores aos da amostra sem neutralizar ou neutralizada com NaOH. Já no caso da energia necessária para a ruptura da membrana, os filmes neutralizados com ambas as bases apresentam valores muito inferiores comparados com a amostra sem neutralizar. Além disso, o comportamento com ambas as bases é diferente. Enquanto a energia diminui com o aumento da concentração de NaOH, o valor deste

parâmetro aumenta com a concentração de KOH. Estes comportamentos são coerentes com os descritos anteriormente na figura 29 (ductilidade e fragilidade).

Figura 30. Módulo de elasticidade E (A) e energia para ruptura (KJ/m^2) (B) das membranas sem neutralizar (Qs W0) e as membranas neutralizadas usando NaOH e KOH em diferentes concentrações, solubilizadas com ácido acético em concentrações de (/) 1%, (x) 0,8%, (\\) 0,5%.

Figura 31. Variação do módulo de elasticidade e energia de ruptura (KJ/m^2) das membranas de quitosana solubilizadas com 1% de ácido acético (Qs W1) e as membranas neutralizadas usando NaOH e KOH em diferentes concentrações molares.

5.2.7. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As morfologias (de fratura e de superfície) das membranas de quitosana sem e após o processo de neutralização podem ser visualizadas nas figuras 32, 33 e 34. As superfícies das membranas sem o processo de neutralização (Fig. 32A) exibem uma regularidade e homogeneidade que está diretamente ligada ao processo de secagem, enquanto que a morfologia da fratura (Fig. 32B) exibe uma estrutura homogênea, densa e coesa, típica dos filmes de quitosana sem qualquer tipo de processamento (BONILLA et al., 2013).

Figura 32. Imagens de microscopia de varredura (MEV) das membranas sem o processo de neutralização: (A) superfície da membrana, (B) seção transversal da fratura após o congelamento com nitrogênio líquido.

Figura 33. Imagens de microscopia de varredura (MEV) da superfície das membranas solubilizadas com uma concentração de ácido acético de 1% (A,C) e 0.5% (B,D) neutralizadas com NaOH 0.5 M (A,B) e KOH 0.5 M (C,D).

As membranas obtidas após neutralização exibem modificações como a presença de cristais de sódio e potássio na superfície (Fig. 33 A-D), enquanto que a seção transversal da membrana após a fratura exhibe modificações como a presença de poros e formatos laminares (Fig.34 A,D) em comparação aos filmes sem neutralizar que exibem uma morfologia densa e coesa (Fig 34E), razão pela qual se teve mudanças características nas propriedades mecânicas em relação ao filme sem tratamento. Resultados similares foram obtidos por Wan et al. (2006a), no qual encontraram cristais de KOH, poros e formatos divergentes na seção transversal após a fratura da matriz polimérica, o que representa uma variação significativa nas propriedades mecânicas.

Figura 34. Imagens de microscopia de varredura (MEV) da área transversal após a ruptura das membranas solubilizadas com uma concentração de ácido acético de 1% (A,C) e 0.5% (B,D) neutralizadas com NaOH 0.5 M (A,B) e KOH 0.5 M (C,D) e branco (E) solubilizado com uma concentração de ácido acético de 1%.

5.2.8. Espectroscopia de curvas corrente-tensão (I-V)

A existência de desordem em materiais orgânicos representa um obstáculo adicional para a injeção de carga, que deve superar as barreiras de potencial distribuídas de maneira aleatória (em posição e energia) causada pela desordem das cadeias poliméricas (BRÜTTING; BERLEB; MÜCKL, 2001, KLAUK, 2006).

A reposta elétrica das membranas neutralizadas em relação às amostras padrão foi analisada colocando os filmes em um sistema de eletrodos para ensaios de resistividade KEITHLEY 8009 (Resistivity test fixture), controlado pelo electrômetro com fonte KEITHLEY 6517B (Electrometer/ High Resistance Meter). A figura 35 apresenta as curvas de corrente-tensão entre 0 e 60 V, onde é observado que o uso de bases fortes na neutralização do polímero de quitosana modifica suas propriedades elétricas, aumentando a condução no filme de quitosana, o qual está diretamente ligado aos íons disponíveis capazes de se deslocar na presença do campo elétrico (WAN et al., 2006b; EGGINGER et al., 2009).

Figura 35. Curvas I-V das membranas de quitosana sem ($\square$) e neutralizadas com NaOH (A) e KOH (B) em concentrações molares de 0.5 ($\circ$), 1 (Δ) e 5 (v).

Segundo Egginger et al. (2009), a mobilidade de íons nos dispositivos orgânicos conduz a fenômenos de histerese, mas com uma taxa de movimento mais lenta em relação aos dispositivos inorgânicos, apresentando histerese maior para as taxas de varredura mais lentas, o que proporciona a oportunidade de distinguir armadilhas de íons móveis. A figura 36 apresenta as histereses das membranas neutralizadas com NaOH e KOH em relação as membranas sem o processo de neutralização, onde mostra que as membranas neutralizadas apresentam um sentido de giro horário em relação ao ligado para desligado (On/Off ou rampa

ascendente para rampa descendente), enquanto que as membranas sem neutralizar apresentam um sentido de giro anti-horário (EGGINGER et al., 2009); resultados similares foram obtidos por Morgado et al. (2013), onde os filmes de quitosana foram dopados com pentaceno para o desenvolvimento de transistores de película delgada, os quais apresentaram curvas do anti-horário no processo de acumulação de cargas. A histerese observada nessas curvas foi atribuída ao deslocamento de íons dentro da membrana de quitosana, concluindo dessa forma que os filmes de quitosana apresentam características interessantes para o desenvolvimento de aplicações na eletrônica orgânica (memórias resistivas).

O transporte de carga tem sido um assunto de interesse do ponto de vista da ciência e da tecnologia. Os primeiros estudos de transporte de carga em materiais orgânicos foram realizados em cristais simples e sistemas desordenados, sendo a mobilidade um dos principais parâmetros de interesse, que por sua vez é fortemente dependente da natureza, estrutura e pureza do material, no qual a condutividade está determinada pela mobilidade dos portadores de carga que ocorre dentro e entre as moléculas (TIWARI; GREENHAM, 2009). A figura 37 apresenta os diferentes regimes esperados para o transporte de carga, segundo os modelos SCLC e TCLC, com o preenchimento parcial ou total das armadilhas da matriz polimérica. A figura 37A apresenta as curvas I-V das membranas neutralizadas com NaOH em escala duplo logarítmica (log-log), exibindo uma condução muito próxima ao filme sem tratamento, enquanto as membranas obtidas a partir do polycation neutralizado com KOH (Fig. 37B) exibem uma condução maior em relação a concentração molar e tipo de base usada, característica que está diretamente ligada a capacidade de mobilidade dos íons presentes na membrana. Resultados similares foram obtidos por Want et al. (2006b), que incorporou hidróxido de potássio nas membranas de quitosana com a finalidade de incrementar sua condutividade iônica.

Figura 36. Curvas de histerese I-V das membranas de quitosana sem neutralizar (A), neutralizadas com NaOH (B) e KOH (C) usando uma concentração de 5 M apresentando o sentido horário.

Os regimes que seguem os comportamentos elétricos das membranas neutralizadas podem ser analisados a partir dos gráficos do $\log(I)$ vs. $\log(V)$ apresentados na figura 37C. Como foi exposto na equação 18, o modelo SCLC prevê uma dependência quadrática da corrente em função da tensão, isto é JaV^2 , o que é similar ao comportamento das membranas de quitosana sem o processo de neutralização onde $JaV^{2.4}$ (figura 37D). A figura 37D exhibe que o processo de transporte de carga está diretamente ligado ao tipo e concentração de base usada, já que nas membranas neutralizadas com NaOH a corrente em função da tensão exibiu a forma $JaV^{1.9}$, o que expõe uma similaridade com o regime SCLC devido a seu valor próximo a ($n=2$). Já as membranas neutralizadas com KOH tiveram um comportamento elétrico em função do modelo TCLC (equação 19) devido a sua forma $JaV^{3.1}$, onde a corrente aumenta em função da tensão na forma JaV^{l+1} (BRÜTTING; BERLEB; MÜCKL, 2001).

Figura 37. Log (tensão) vs. log (corrente) das membranas de quitosana neutralizadas com NaOH (A) e KOH (B). Corrente vs. Tensão em escala duplo logarítmica das membranas neutralizadas com KOH (C) e das membranas neutralizadas com NaOH e KOH (D) em relação ao branco.

As estruturas físico-químicas dos polímeros afetam de forma direta o transporte de cargas devido à presença de armadilhas. A distribuição energética das armadilhas é mais frequentemente descrita como uma densidade exponencial ou Gaussiana de estados (DOS). As análises da densidade de superfície de estados (DOS) é feita a partir da condutividade diferencial (dI/dV) (I e V denotam a corrente de tunelamento e tensão) (KIM et al., 2011).

A figura 38 mostra a análise da função densidade de estados das membranas de quitosana neutralizadas em relação aos filmes sem neutralizar, estabelecendo um primeiro

pico relacionado às armadilhas próprias da quitosana e um segundo pico presentes nas membranas neutralizadas, os quais estão relacionados à modificação das estruturas moleculares da quitosana. Dubois et al. (2005) estabeleceram que a presença do segundo pico na análise de corrente por DOS, está associada às configurações dos enlaces σ e π devido as variações estruturais na matriz polimérica, originando processos de tunelamento no transporte nos filmes neutralizados.

Figura 38. Análise da densidade de estados das membranas de quitosana sem neutralizar (□), neutralizadas com NaOH (○) e KOH (Δ).

7. CONCLUSÕES

Este trabalho visou caracterizar as propriedades físicas e químicas de membranas de quitosana obtidas a partir da solubilização da quitosana em três concentrações diferentes de ácido acético e a neutralização do polícatión de quitosana com duas bases fortes, hidróxido de sódio e hidróxido de potássio, abordando duas áreas específicas como solubilização e neutralização. Com base nos resultados pode-se concluir que:

- A solubilização com as diferentes concentrações de ácido acético não apresentaram diferença significativa nas propriedades físico-química das membranas de quitosana ao nível molecular, mas apresentaram diferença significativa em relação ao tipo e concentração de base usada na neutralização do polícatión, modificando as propriedades das membranas.
- O processo de neutralização do polícatión de quitosana até atingir o pH de 6.0 pelo método de gotejamento da base não apresentou precipitação da quitosana, o que é importante na obtenção das membranas devido a homogeneidade na solução e obtenção de membranas uniformes.
- O uso de bases fortes como o hidróxido de sódio e hidróxido de potássio no processo de neutralização do polícatión de quitosana apresentou diferenças significativas nas membranas, como mudança na conformação dos cristais na estrutura polimérica da quitosana, além de um acréscimo na espessura dos filmes, sendo que os filmes neutralizados com KOH apresentaram um incremento maior em relação aos filmes neutralizados com NaOH.
- O desenvolvimento de membranas a partir da neutralização do polícatión com NaOH permitiram obter membranas com alta capacidade de retenção de umidade, maior fragilidade, menor capacidade de deformação e um requerimento maior de energia

para a ruptura das membranas, enquanto que as membranas neutralizadas com KOH exibiram uma retenção de umidade baixa, expondo um comportamento dúctil, pelo qual uma maior capacidade de deformação e menor energia para a ruptura da membrana.

- A metodologia usada para a neutralização do polícatión de quitosana a partir do método de gotejamento lento da solução neutralizante permitiu obter membranas que apresentaram um transporte iônico favorável para o desenvolvimento de biossensores ou células de carga, isto quando o polícatión foi neutralizado com KOH em uma concentração inferior a um molar.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDELRAZEK, E. M.; ELASHMAWI, I. S.; LABEED, S. Chitosan filler effects on the experimental characterization, spectroscopic investigation and thermal studies of PVA/PVP blend films. **Physica B: Condensed Matter**, Amsterdam, v. 405, p. 2021-2027, 2010.

ABUGOCH, L. E. et al. Characterization of quinoa protein–chitosan blend edible films. **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, v. 25, p. 879-886, 2011.

AKKİLİ, K.; UZUN, İ.; KİLİÇOĞLU, T. The calculation of electronic properties of an Ag/chitosan/n-Si Schottky barrier diode. **Synthetic Metals**, Lausanne, v. 157, p. 297-302, 2007.

ALTAHER, H. The use of chitosan as a coagulant in the pre-treatment of turbid sea water. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v. 233-234, p. 97-102, 2012.

ARANAZ, I. et al. Functional characterization of chitin and chitosan. **Current Chemical Biology**, Bussum, v. 3, p. 203-230, 2009.

ASSIS, O. B. G.; SILVA, V. L. DA Caracterização estrutural e da capacidade de absorção de água em filmes finos de quitosana processados em diversas concentrações. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, São Carlos, v. 13, p. 223-228, 2003.

AZEVEDO, E. P. et al. Mechanical properties and release studies of chitosan films impregnated with silver sulfadiazine. **Journal of Applied Polymer Science**, Hoboken, v. 102, p. 3462-3470, 2006.

AZUMA, K. et al. α -Chitin nanofibrils improve inflammatory and fibrosis responses in inflammatory bowel disease mice model. **Carbohydrate Polymers**, Kidlington, v. 90, p. 197-200, 2012.

BALDRICK, P. et al. The safety of chitosan as a pharmaceutical excipient. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, Maryland Heights, v. 56, p. 290-299, 2010.

BERNKOP-SCHNÜRCH, A.; DÜNNHAUPT, S. Chitosan-based drug delivery systems. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, Amsterdam, v. 81, p. 463-469, 2012.

BLACKWELL, J. Structure of β -chitin or biopolymers, or parallel chain systems of poly- β -(1 $\rightarrow$ 4)-N-acetyl-d-glucosamine. **Biopolymers**, Hoboken, v. 7, p.281-298, 1969.

BLEICHER, L.; SASAKI, J. M. **Introdução à difração de raios-x em cristais**. Disponível em:<<http://www.raiosx.ufc.br/site/wp-content/uploads/downloads/2013/01/apostila.pdf>>. Acesso em: 09 ago. 2013.

BOERIS, V. et al. Interaction behavior between chitosan and pepsin. **Carbohydrate Polymers**, Kidlington, v. 84, p. 459-464, 2011.

BONILLA, J. et al. Physical, structural and antimicrobial properties of poly vinyl alcohol–chitosan biodegradable films. **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, v. 35, p. 463-470, 2014.

BONILLA, J. et al. Properties of wheat starch film-forming dispersions and films as affected by chitosan addition. **Journal of Food Engineering**, London, v. 114, p. 303-312, 2013.

BRÜTTING, W.; BERLEB, S.; MÜCKL, A. G. Device physics of organic light-emitting diodes based on molecular materials. **Organic Electronics**, Amsterdam, v. 2, p. 1-36, 2001.

CALERO, N. et al. Flow behaviour, linear viscoelasticity and surface properties of chitosan aqueous solutions. **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, v. 24, p. 659-666, 2010.

CAMPOS, M. G. N. et al. Effects of neutralization process on preparation and characterization of chitosan membranes for wound dressing. **Macromolecular Symposia**, Weinheim, v. 229, p. 253-257, 2005.

CANEVAROLO JUNIOR, S. V. **Técnicas de caracterização de polímeros**. São Paulo: Artliber Editora Ltda, 2007. 448 p.

_____. **Ciência dos polímeros: um texto básico para tecnólogos e engenheiros**. 2. ed. São Paulo: Artliber Editora Ltda, 2002. 280 p.

CARDOSO, J. et al. Ionic conductivity of polymer electrolytes. **Macromolecular Symposia**, Weinheim, v. 283-284, p. 205-210, 2009.

CHEN, Q. et al. Hydrolysis of chitosan under microwave irradiation in ionic liquids promoted by sulfonic acid-functionalized ionic liquids. **Polymer Degradation and Stability**, London, v. 97, p. 49-53, 2012.

CHEN, R. H.; LIN J. H.; YANG, M. H. Relationships between the chain flexibilities of chitosan molecules and the physical properties of their casted films. **Carbohydrate Polymers**, Kidlington, v. 24, p. 41-46, 1994.

CHEN, Z.; SUN, Y. N-halamine-based antimicrobial additives for polymers: preparation, characterization, and antimicrobial activity. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, Washington, v. 45, p. 2634-2640, 2006.

CHENG, M. et al. Study on physical properties and nerve cell affinity of composite films from chitosan and gelatin solutions. **Biomaterials**, Amsterdam, v. 24, p. 2871-2880, 2003.

CHO, Y. I.; NO, H. K.; MEYERS, S. P. Physicochemical characteristics and functional properties of various commercial chitin and chitosan products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 46, p. 3839-3843, 1998.

CLARK, B. J.; FROST, T.; RUSSELL, M. A. **UV spectroscopy: techniques, instrumentation data handling**. 6. ed. London: Chapman & Hall, 1993.

CROISIER, F.; JÉRÔME, C. Chitosan-based biomaterials for tissue engineering. **European Polymer Journal**, Kidlington, v. 49, p. 780-792, 2013.

DASH, M. et al. Chitosan: a versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. **Progress in Polymer Science**, London, v. 36, p. 981-1014, 2011.

DEL BLANCO, L. F. et al. Influence of the deacetylation degree on chitosan emulsification properties. **Colloid and Polymer Science**, Heidelberg, v. 277, p. 1087-1092, 1999.

DÍAZ, A. C. **Fundamentos de química analítica: equilibrio iónico y análisis químico**. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia, 2002. 1009 p.

DU, D. et al. Amperometric detection of triazophos pesticide using acetylcholinesterase biosensor based on multiwall carbon nanotube–chitosan matrix. **Sensors and Actuators B: Chemical**, Lausanne, v. 127, p. 531-535, 2007.

DUBOIS, M. et al. Scanning tunneling microscopy and spectroscopy of reconstructed Si(100) surfaces. **Physical Review B (Condensed Matter and Materials Physics)**, College Park, v. 71, p. 165322-0 – 165322-10, 2005.

DUTTA, P. K.; DUTTA, J.; TRIPATHI, V. S. Chitin and chitosan: chemistry, properties and applications. **Journal of Scientific and Industrial Research**, New Delhi, v. 63, p. 20-31, 2004.

EGGINGER, M. et al. Current versus gate voltage hysteresis in organic field effect transistors. **Monatshefte Für Chemie - Chemical Monthly**, Vienna, v. 140, p. 735-750, 2009.

EL-SAWY, N. M. et al. Radiation-induced degradation of chitosan for possible use as a growth promoter in agricultural purposes. **Carbohydrate Polymers**, Kidlington, v. 79, p. 555-562, 2010.

EL-TAHLAWY, K.; HUDSON, S. M. Chitosan: aspects of fiber spinnability. **Journal of Applied Polymer Science**, Hoboken, v. 100, p. 1162-1168, 2006.

ESCAMILLA-GARCÍA, M. et al. Physical and structural characterisation of zein and chitosan edible films using nanotechnology tools. **International Journal of Biological Macromolecules**, Amsterdam, v. 61, p. 196-203, 2013.

FAN, Q. et al. Amperometric phenol biosensor based on laponite clay–chitosan nanocomposite matrix. **Biosensors and Bioelectronics**, Amsterdam, v. 22, p. 816-821, 2007.

FENG, F.; LIU, Y.; HU, K.. Influence of alkali-freezing treatment on the solid state structure of chitin. **Carbohydrate Research**, Kidlington, v. 339, p. 2321-2324, 2004.

Franca, E. F. et al. Characterization of chitin and chitosan molecular structure in aqueous solution. **Journal of Chemical Theory and Computation**, Washington, v. 4, p. 2141-2149, 2008.

GADJOUROVA, Z. et al. Ionic conductivity in crystalline polymer electrolytes. **Nature**, London, v. 412, p. 520-523, 2001.

GAMAGE, A.; SHAHIDI, F. Use of chitosan for the removal of metal ion contaminants and proteins from water. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 104, p. 989-996, 2007.

GENG, X.; KWON, O.; JANG, J. Electrospinning of chitosan dissolved in concentrated acetic acid solution. **Biomaterials**, Amsterdam, v. 26, p. 5427-5432, 2005.

GHAFFARI, A. et al. Preparation and characterization of free mixed-film of pectin/chitosan/Eudragit® RS intended for sigmoidal drug delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, Amsterdam, v. 67, p. 175-186, 2007.

GHOSH, A.; ALI, M. A.; WALLS, R. Modification of microstructural morphology and physical performance of chitosan films. **International Journal of Biological Macromolecules**, Amsterdam, v. 46, p.179-186, 2010.

GIRI, T. K. et al. Modified chitosan hydrogels as drug delivery and tissue engineering systems: present status and applications. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, Beijing, v. 2, p. 439-449, 2012.

GOMATHI, P. et al. Fabrication of novel chitosan nanofiber/gold nanoparticles composite towards improved performance for a cholesterol sensor. **Sensors and Actuators B: Chemical**, Lausanne, v. 153, p. 44-49, 2011.

GUIBAL, E. Interactions of metal ions with chitosan-based sorbents: a review. **Separation and Purification Technology**, Kidlington, v. 38, p. 43-74, 2004.

HE, Q. et al. Preparation of chitosan films using different neutralizing solutions to improve endothelial cell compatibility. **Journal of Materials Science. Materials in Medicine**, New York, v. 22, p. 2791-2802, 2011.

HEJAZI, R.; AMIJI, M. Chitosan-based gastrointestinal delivery systems. **Journal of Controlled Release**, Amsterdam, v. 89, p. 151-165, 2003.

HIENMENZ, P. C.; LODGE, T. P. **Polymer chemistry**. 2. ed. Boca Raton, Fl.: Taylor & Francis Group, 2007.

HIRANO, S. et al. The preparation and applications of funtional fibers from crab shel chitin. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 70, p. 373-377, 1999.

HUANG, Q. Z.; ZHUO, L. H.; GUO, Y. C. Heterogeneous degradation of chitosan with H₂ O₂ catalysed by phosphotungstate. **Carbohydrate Polymers**, Kidlington, v. 72, p. 500-505, 2008.

HUANG, Y. et al. In vitro characterization of chitosan–gelatin scaffolds for tissue engineering. **Biomaterials**, Amsterdam, v. 26, p. 7616-7627, 2005.

ILYINA, A. V. et al. Enzymic preparation of acid-free-water-soluble chitosan. **Process Biochemistry**, London, v. 35, p. 563-568, 2000.

KAHN, H. **Difração de raios-x**. Disponível em:

<http://www.angelfire.com/crazy3/qfl2308/1_multipart_xF8FF_2_DIFRACAO.pdf>. Acesso em: 09 ago. 2013.

KALLEMPUDI, S. S.; GURBUZ, Y. A nanostructured-nickel based interdigitated capacitive transducer for biosensor applications. **Sensors and Actuators B: Chemical**, Lausanne, v. 160, p. 891-898, 2011.

KAYA, V. M.; PICARD, G. Stability of chitosan gel as entrapment matrix of viable *Scenedesmus bicellularis* cells immobilized on screens for tertiary treatment of wastewater. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 56, p. 147-155, 1996.

KHAN, A. et al. Structural and antimicrobial properties of irradiated chitosan and its complexes with zinc. **Radiation Physics and Chemistry**, Kidlington, v. 91, p. 138-142, 2013.

KHOSHGOZARAN-ABRAS, S. et al. Mechanical, physicochemical and color properties of chitosan based-films as a function of Aloe vera gel incorporation. **Carbohydrate Polymers**, Kidlington, v. 87, p. 2058-2062, 2012.

KIM, C. H. et al. Modeling the low-voltage regime of organic diodes: origin of the ideality factor. **Journal of Applied Physics**, College Park, v. 110, p. 093722-0 - 093722-8, 2011.

KLAUK, H. (Ed.). **Organic electronics: materials, manufacturing, and applications**. New York Wiley-vch, 2006. 446 p.

KOBAYASHI, K. et al. Crystal transition between hydrate and anhydrous β -chitin monitored by synchrotron X-ray fiber diffraction. **Carbohydrate Polymers**, Kidlington, v. 79, p. 882-889, 2010.

KOIDE, S. S. Chitin-chitosan: properties, benefits and risks. **Nutrition Research**, New York, v. 18, p. 1091-1101, 1998.

KONG, M. et al. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: a state of the art review. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 144, p. 51-63, 2010.

KUMAR, M. N. V R. A review of chitin and chitosan applications. **Reactive and Functional Polymers**, Amsterdam, v. 46, p. 1-27, 2000.

LAVALL, R. L.; ASSIS, O. B. G.; CAMPANA-FILHO, S. P. β -Chitin from the pens of *Loligo* sp.: extraction and characterization. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 98, p. 2465-2472, 2007.

LAVERTU, M. et al. High efficiency gene transfer using chitosan/DNA nanoparticles with specific combinations of molecular weight and degree of deacetylation. **Biomaterials**, Amsterdam, v. 27, p. 4815-4824, 2006.

LI, J. et al. Production and characterization of thick, thin and ultra-thin chitosan/PEO films. **Carbohydrate Polymers**, Kidlington, v. 83, p. 375-382, 2011.

LI, Q. et al. Electrolytic conductivity behaviors and solution conformations of chitosan in different acid solutions. **Carbohydrate Polymers**, Kidlington, v. 63, p.272-282, 2006.

LI, R. et al. Antimicrobial N-halamine modified chitosan films. **Carbohydrate Polymers**, Kidlington, v. 92, p. 534-539, 2013.

LI, X. et al. Physical, mechanical and biological properties of poly(ϵ -caprolactone)–poly(ethylene glycol)–poly(ϵ -caprolactone) (CEC)/chitosan composite film. **Carbohydrate Polymers**, Kidlington, v. 82, p. 904-912, 2010.

LIMA, C. G. A. et al. DC conductivity and dielectric permittivity of collagen–chitosan films. **Materials Chemistry and Physics**, Lausanne, v. 99, p. 284-288, 2006.

LU, L. C.; WANG, C. I.; SYE, W. F. Applications of chitosan beads and porous crab shell powder for the removal of 17 organochlorine pesticides (OCPs) in water solution. **Carbohydrate Polymers**, Kidlington, v. 83, p. 1984-1989, 2011.

LUO, X. L. et al. A glucose biosensor based on chitosan–glucose oxidase–gold nanoparticles biocomposite formed by one-step electrodeposition. **Analytical Biochemistry**, Philadelphia, v. 334, p. 284-289, 2004.

LUO, X. L. et al. Electrochemically deposited chitosan hydrogel for horseradish peroxidase immobilization through gold nanoparticles self-assembly. **Biosensors and Bioelectronics**, Amsterdam, v. 21, p. 190-196, 2005.

MA, J.; SAHAI, Y. Chitosan biopolymer for fuel cell applications. **Carbohydrate Polymers**, Kidlington, v. 92, p. 955-975, 2013.

MA, J.; SAHAI, Y.; BUCHHEIT, R. G. Evaluation of multivalent phosphate cross-linked chitosan biopolymer membrane for direct borohydride fuel cells. **Journal of Power Sources**, Lausanne, v. 202, p. 18-27, 2012.

MARROQUIN, J. B.; RHEE, K. Y.; PARK, S. J. Chitosan nanocomposite films: enhanced electrical conductivity, thermal stability, and mechanical properties. **Carbohydrate Polymers**, Kidlington, v. 92, p. 1783-1791, 2013.

MARTÍNEZ-CAMACHO, A. P. et al. Chitosan composite films: thermal, structural, mechanical and antifungal properties. **Carbohydrate Polymers**, Kidlington, v. 82, p. 305-315, 2010.

McCREERY, R. L. Molecular electronic junctions. **Chemical of Materials**, Washington, v. 16, p. 4477-4496, 2004.

MENGÍBAR, M. Á. L. **Obtención y caracterización de quitosanos modificados: ingredientes funcionales con aplicaciones tecnológicas y biológicas en la industria alimentaria**. 2011. 245 f. Tese (Doutorado) - Departamento de Nutrición, Bromatología Y Tecnología de Los Alimentos, Universidad Complutense De Madrid Facultad De Veterinaria, Madrid, 2012.

MOBARAK, N. N. et al. Conductivity enhancement via chemical modification of chitosan based green polymer electrolyte. **Electrochimica Acta**, Kidlington, v. 92, p. 161-167, 2013.

MORGADO, J. et al. Self-standing chitosan films as dielectrics in organic thin-film transistors. **Express Polymer Letters**, Budapest, v. 7, p. 960-965, 2013.

MORIMOTO, M. et al. Synthesis of novel chitosan with chitosan side chains. **Carbohydrate Polymers**, Kidlington, v. 84, p. 727-731, 2011.

NORIEGA, S. E.; SUBRAMANIAN, A. Consequences of neutralization on the proliferation and cytoskeletal organization of chondrocytes on chitosan-based matrices. **International Journal of Carbohydrate Chemistry**, New York, v. 2011, p. 1-13, 2011.

ODACI, D.; TIMUR, S.; TELEFONCU, A. A microbial biosensor based on bacterial cells immobilized on chitosan matrix. **Bioelectrochemistry**, Amsterdam, v. 75, p. 77-82, 2009.

OGAWA, Y. et al. Crystal analysis and high-resolution imaging of microfibrillar α -chitin from *Phaeocystis*. **Journal of Structural Biology**, Maryland Heights, v. 171, p. 111-116, 2010.

OGAWA, Y. et al. Infrared study on deuteration of highly-crystalline chitin. **Carbohydrate Polymers**, Kidlington, v. 90, p. 650-657, 2012.

PARK, J. H. et al. Targeted delivery of low molecular drugs using chitosan and its derivatives. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Amsterdam, v. 62, p. 28-41, 2010.

PARVEEN, S.; SAHOO, S. K. Long circulating chitosan/PEG blended PLGA nanoparticle for tumor drug delivery. **European Journal of Pharmacology**, Amsterdam, v. 670, p. 372-383, 2011.

PASSONI, M. et al. Recovery of local density of states using scanning tunneling spectroscopy. **Physical Review B Condensed Matter and Materials Physics**, College Park, v. 79, p.045404-1-045404-11, 2009.

PAVIA, D. L. et al. **Introdução à espectroscopia**. 4. ed. Washington: Ligia Cantarelli, 2010.

PENICHE, C.; ARGÜELLES-MONAL, W.; GOYCOOLEA, F. M. Chitin and chitosan: major sources, properties and applications. In: BELGACEM, M. N.; GANDINI, A. **Monomers, polymers and composites from renewable resources**. Amsterdam: Elsevier, 2008. cap. 25, p. 517-542.

PENICHE, C. A. **Estudios sobre quitina y quitosana**. 2006. 89 f. Tese (Doutorado) - Curso de Química, Universidad de La Habana Facultad de Química, La Habana, 2006.

PERSSON, J. E.; DOMARD, A.; CHANZY, H. Single crystals of α -chitin. **International Journal of Biological Macromolecules**, Amsterdam, v. 14, p. 221-224, 1992.

PILLAI, C. K. S.; PAUL, W.; SHARMA, C. P. Chitin and chitosan polymers: chemistry, solubility and fiber formation. **Progress in Polymer Science**, London, v. 34, p. 641-678, 2009.

PUCIĆ, I.; JURKIN, T. FTIR assessment of poly(ethylene oxide) irradiated in solid state, melt and aqueous solution. **Radiation Physics and Chemistry**, Kidlington, v. 81, p. 1426-1429, 2012.

- QU, J. et al. The preparation and characterization of chitosan rods modified with Fe^{3+} by a chelation mechanism. **Carbohydrate Research**, Kidlington, v. 346, p. 822-827, 2011.
- RAO, S. B.; SHARMA, C. P. Use of chitosan as a biomaterial: studies on its safety and hemostatic potential. **Journal of Biomedical Materials Research**, Hoboken, v. 34, p. 21-28, 1997.
- REDDY, V. S. et al. Carrier transport mechanism in aluminum nanoparticle embedded AlQ3 structures for organic bistable memory devices. **Organic Electronics**, Amsterdam, v. 10, p. 138-144, 2009.
- REMUÑÁN-LÓPEZ, C. et al. Design and evaluation of chitosan/ethylcellulose mucoadhesive bilayered devices for buccal drug delivery. **Journal of Controlled Release**, Amsterdam, v. 55, p. 143-152, 1998.
- RINAUDO, M. Chitin and chitosan: properties and applications. **Progress in Polymer Science**, London, v. 31, p. 606-632, 2006.
- ROBERTS, G. A. F. **Chitin chemistry**. London: The Macmillan Publishers Limited, 1992.
- RUDALL, K. M. The distribution of collagen and chitin. In: ROBERTS, G. A. F. **Chitin Chemistry**. London: The Macmillan Press Ltd, 1992. cap. 1, p. 1-45.
- RUDALL, K. M. The chitin/protein complexes of insect cuticles. In: COHN, W. E. **Advances in insect physiology**. London: Academic Press, 1963. v. 1, p. 257-313.
- S. UŁĆUMLIĆ, G.; KSHAD, A. A.; MIJIN, D. Ž. Synthesis and investigation of solvent effects on the ultraviolet absorption spectra of 1,3-bis-substituted-5,5-dimethylhydantoins. **Journal Serbian Chemical Society**, Belgrade, v. 10, p. 699-706, 2003.
- SAGOO, S. K.; BOARD, R.; ROLLER, S. Chitosan potentiates the antimicrobial action of sodium benzoate on spoilage yeasts. **Letters in Applied Microbiology**, West Sussex, v. 34, p. 168-172, 2002.
- SANKALIA, M. G. et al. Reversed chitosan–alginate polyelectrolyte complex for stability improvement of alpha-amylase: optimization and physicochemical characterization. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, Amsterdam, v. 65, p. 215-232, 2007.

SCHMIDT, T. F. et al. Enzyme activity of horseradish peroxidase immobilized in chitosan matrices in alternated layers. **Materials Science and Engineering C**, Lausanne, v. 29, p. 1889-1892, 2009.

SENCADAS, V. et al. Physical-chemical properties of cross-linked chitosan electrospun fiber mats. **Polymer Testing**, London, v. 31, p. 1062-1069, 2012.

SHAHIDI, F.; ARACHCHI, J. K. V.; JEON, Y. J. Food applications of chitin and chitosans. **Trends in Food Science & Technology**, Kidlington, v. 10, p. 37-51, 1999.

SHU, X.Z.; ZHU, K.J.. The influence of multivalent phosphate structure on the properties of ionically cross-linked chitosan films for controlled drug release. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, Amsterdam, v. 54, p.235-243, 2002.

SHU, X. Z; ZHU, K. J; SONG, W. Novel pH-sensitive citrate cross-linked chitosan film for drug controlled release. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 212, p. 19-28, 2001.

SIKORSKI, P.; HORI, R.; WADA, M. Revisit of α -chitin crystal structure using high resolution X-ray diffraction data. **Biomacromolecules**, Washington, v. 10, p. 1100-1105, 2009.

SINGH, J.; DUTTA, P. K. Preparation, circular dichroism induced helical conformation and optical property of chitosan acid salt complexes for biomedical applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, Amsterdam, v. 45, p. 384-392, 2009.

SMITHA, B.; DEVI, D. A.; SRIDHAR, S. Proton-conducting composite membranes of chitosan and sulfonated polysulfone for fuel cell application. **International Journal of Hydrogen Energy**, London, v. 33, p. 4138-4146, 2008.

STAFFOLO, M. D. et al. Chitosan interaction with iron from yoghurt using an in vitro digestive model: comparative study with plant dietary fibers. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 12, p. 4647-4660, 2011.

TANABE, T. et al. Preparation and characterization of keratin–chitosan composite film. **Biomaterials**, Amsterdam, v. 23, p.817-825, 2002.

TANGKUARAM, T. et al. Design and development of a highly stable hydrogen peroxide biosensor on screen printed carbon electrode based on horseradish peroxidase bound with

gold nanoparticles in the matrix of chitosan. **Biosensors and Bioelectronics**, Amsterdam, v. 22, p. 2071-2078, 2007.

TANUMA, H. et al. Preparation and characterization of PEG-cross-linked chitosan hydrogel films with controllable swelling and enzymatic degradation behavior. **Carbohydrate Polymers**, Kidlington, v. 80, p. 260-265, 2010.

TASSELLI, F. et al. Mechanical, swelling and adsorptive properties of dry-wet spun chitosan hollow fibers crosslinked with glutaraldehyde. **Reactive and Functional Polymers**, Amsterdam, v. 73, p.218-223, 2013.

THAKHIEW, W.; DEVAHASTIN, S.; SOPONRONNARIT, S. Physical and mechanical properties of chitosan films as affected by drying methods and addition of antimicrobial agent. **Journal of Food Engineering**, London, v. 119, p. 140-149, 2013.

THANJAM, S. et al. Course of poly(4-aminodiphenylamine)/Ag nanocomposite formation through UV-vis spectroscopy. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, Amsterdam, v. 79, p. 1256-1266, 2011.

THANPITCHA, TUSPON et al. Preparation and characterization of polyaniline/chitosan blend film. **Carbohydrate Polymers**, Kidlington, v. 64, p. 560-568, 2006.

THIRUGNANASAMBANDHAM, K.; SIVAKUMAR, V.; MARAN, J. PRAKASH. Application of chitosan as an adsorbent to treat rice mill wastewater: mechanism, modelling and optimization. **Carbohydrate Polymers**, Kidlington, v. 97, p. 451-457, 2013.

TIWARI, A. D. et al. Green synthesis and stabilization of gold nanoparticles in chemically modified chitosan matrices. **International Journal of Biological Macromolecules**, Amsterdam, v. 48, p. 682-687, 2011.

TIWARI, S.; GREENHAM, N. C. Charge mobility measurement techniques in organic semiconductors. **Optical and Quantum Electronics**, New York, v. 41, p. 69-89, 2009.

TSAIH, M. L.; CHEN, R. H. Molecular weight determination of 83% degree of decetylation chitosan with non-gaussian and wide range distribution by high-performance size exclusion chromatography and capillary viscometry. **Journal of Applied Polymer Science**, Hoboken, v. 71, p. 1905-1913, 1999.

VALENCIA, G. A. **Transporte eletrônico em biofilmes nanoestruturados para biossensores a base de enzimas**. 2013. 121 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2013.

VANICHVATTANADECHA, C.; SUPAPHOL, P.; RUJIRAVANIT, R. Preparation and Physico-Chemical Characteristics of N-Maleoyl Chitosan Films. **Macromolecular Symposia**, Weinheim, v. 264, p.121-126, 2008.

VICENTINI, N. M. et al. Prediction of cassava starch edible film properties by chemometric analysis of infrared spectra. **Spectroscopy letters**, New York, v. 38, n. 6, p. 749-767, 2005.

VOLLMER, W.; BERTSCHE, U. Murein (peptidoglycan) structure, architecture and biosynthesis in *Escherichia coli*. **Biochimica et Biophysica Acta. Biomembranes**, Amsterdam, v. 1778, p. 1714-1734, 2008.

WAN, Y. et al. Chitosan-based solid electrolyte composite membranes: I. preparation and characterization. **Journal of Membrane Science**, Amsterdam, v. 280, p. 666-674, 2006a.

WAN, Y. et al. Chitosan-based electrolyte composite membranes: II. mechanical properties and ionic conductivity. **Journal of Membrane Science**, Amsterdam, v. 284, p. 331-338, 2006b.

YANG, L. et al. A new antibody immobilization strategy based on electrodeposition of nanometer-sized hydroxyapatite for label-free capacitive immunosensor. **Talanta**, Amsterdam, v. 68, p. 40-46, 2005.

YEN, M. T.; YANG, J. H.; MAU, J. L. Physicochemical characterization of chitin and chitosan from crab shells. **Carbohydrate Polymers**, Kidlington, v. 75, p. 15-21, 2009.

ZHANG, M. et al. Structure of insect chitin isolated from beetle larva cuticle and silkworm (*Bombyx mori*) pupa exuvia. **International Journal of Biological Macromolecules**, Amsterdam, v. 27, p. 99-105, 2000.

ZHANG, Y. et al. Amperometric glucose biosensor based on direct assembly of Prussian blue film with ionic liquid-chitosan matrix assisted enzyme immobilization. **Sensors and Actuators B: Chemical**, Lausanne, v. 176, p. 978-984, 2013.

ZIANI, K. et al. Effect of the presence of glycerol and Tween 20 on the chemical and physical properties of films based on chitosan with different degree of deacetylation. **Lwt- Food Science and Technology**, London, v. 41, p. 2159-2165, 2008.

ZIEGLER, M. et al. Local density of states from constant-current tunneling spectra. **Physical Review B Condensed Matter and Materials Physics**, College Park, v. 80, p. 125402-1 – 125402-6, 2009.

ZONG, Z et al. Characterization of chemical and solid state structures of acylated chitosans. **Polymer**, London, v. 41, p.899-906, 2000.