Lilian Aparecida Fiorini Vermeersch

PROCESSAMENTO DE SUSPENSÕES AQUOSAS DE BETA-QUITINA
POR IRRADIAÇÃO DE ULTRASSOM DE ALTA INTENSIDADE:
PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE FILMES AUTOSSUSTENTÁVEIS

Dissertação apresentada ao Instituto de Química de São Carlos, da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Físico-Química.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Paulo Campana Filho.

São Carlos

2014

Dedico este trabalho aos meus pais Célia e Carlos, por serem meus maiores exemplos de coragem, garra, fé e dedicação. Por investirem em minha educação e me ensinarem como ser cidadã com seus exemplos de solidariedade, caráter e honestidade. Por me apoiarem tanto no âmbito emocional como financeiro em todas as minhas decisões. Por acreditarem em mim, ainda quando nem eu mesmo acreditava mais, por todas as palavras, pelos gestos, pelo sim e pelo não. Dedico a eles, a quem tanto amo e serei grata eternamente.

AGRADECIMENTOS

A minha irmã e sua família, Carla, Moisés e Eloá, pelo amor e apoio em todos os momentos.

A minha família, meus tios Elizabete e Deoclécio, primos e cônjuges, Fúlvio e Ilana e Sandra e Lucas, pelo apoio e ajuda na minha instalação e estadia em São Carlos.

Aos meus avós, *in memoriam*, Armando, Maira da Penha e Rosa, pelos ensinamentos e amor durante todo tempo que pudemos estar juntos. E, também, ao meu Alcindo pelo incondicional apoio.

Ao meu amigo e companheiro Orlando, que sempre me apoiou e esteve ao meu lado nos momentos mais difíceis, me confortando e proporcionando muitos aprendizados.

Aos amigos que tive a felicidade de encontrar em São Carlos, Aldinéia, Aline, Amanda, Anderson, David, Emanuella, Fernanda, Suzy e Virgínia, pela companhia, estudos, conversas, lazer e amizade.

Aos amigos de longa data que sempre torceram muito por mim, Alexandre, André e Renato e família, Ângela, Angélica e família, Débora, Cristiano, Christian, Edleusa, Élder, Everton e família, Gustavo e Natália, Liliane, Rodrigo, Roberta e Fernando e família e Robertinha.

Aos amigos do laboratório, pela convivência, ajuda e momentos de descontração, Anderson, Adriana, Bruno, Cristina, Daiana, Daniella, Danielle, Érika, Fernando, Joice, Jorge, Rachel e Tonimar.

Ao meu Professor Orientador Sérgio Paulo Campana Filho, pela orientação e ensinamentos.

Ao Professor Odílio Assis, aos pesquisadores, Daniela Lury Morgado, Douglas de Britto e Rejane Celi Goy e ao estagiário Marcos Duarte pelo valioso auxílio em minha cooperação realizada na Cnpdia EMBRAPA.

Aos técnicos do CAQUI, Márcio e André.

Aos técnicos do grupo de físico-química orgânica Luís Antônio Ramos e Márcia Dib Zambon.

Aos órgãos de fomento CAPES, CNPq E FAPESP.

Muito Obrigada!!

RESUMO

Quitina e quitosana são polissacarídeos filmogênicos biocompatíveis que exibem caráter fungicida e bactericida, o que faz com que apresentem inúmeras potenciais aplicações nas indústrias alimentícia e cosmética, e também em Medicina e Farmácia. Neste trabalho, a utilização de ultrassom de alta intensidade foi explorada com a finalidade de obter suspensões aquosas estáveis de beta-quitina (GA = 79%) as quais, combinadas ou não à solução aquosa de quitosana (GA = 4,9%), foram empregadas para a preparação de filmes autossustentáveis por *casting*. A sonicação das suspensões foi realizada em dispositivo ultrassônico Branson Sonifier 450 e os seguintes parâmetros foram fixados: i) concentração da suspensão, $C_p = 2,4 \text{ g L}^{-1}$; ii) volume de suspensão, $V = 30 \text{ mL}$; iii) tempo de sonicação = 60 min; iv) temperatura de sonicação = $65 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$; v) amplitude da irradiação = 225 W; vi) pulso de irradiação = 50%. Após a sonicação beta-quitina foi avaliada quanto aos efeitos do tratamento em sua estrutura, grau médio de acetilação e massa molar média viscosimétrica por espectroscopia na região do infravermelho, espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio e viscosimetria capilar em solução diluída, respectivamente. Os resultados revelaram a ocorrência de despolimerização da beta-quitina submetida à sonicação, visto que a sua viscosidade intrínseca foi ligeiramente inferior (16%), mas não foram observadas alterações no grau médio de acetilação e os espectros no infravermelho de beta-quitina tratada e não-tratada foram idênticos. Os filmes produzidos por *casting* foram preparados a partir de suspensão de beta-quitina submetida à sonicação (filme BQ_F), solução aquosa de quitosana (filme Q_F) e de misturas de ambas, suspensão de beta-quitina e solução de quitosana, em diferentes proporções de maneira a resultar nos filmes compostos BQ₈₀/Q₂₀, BQ₅₀/Q₅₀, BQ₂₀/Q₈₀. Análises por microscopia eletrônica de varredura e microscopia de força atômica permitiram observar a forte influência da presença de beta-quitina sobre a morfologia dos filmes, que apresentaram superfícies mais heterogêneas, de natureza granular e mais rugosas quanto maior o teor de beta-quitina, enquanto que a presença de quitosana produziu efeito contrário. Assim, os filmes BQ_F e Q_F apresentaram valores de rugosidade média quadrática (RMS) 225,0 nm e 21,6 nm, respectivamente, pois no primeiro caso há grande quantidade de partículas de beta-quitina que coalescem em aglomerados resultando em superfície acentuadamente rugosa, enquanto que no segundo caso a coalescência de lamelas de quitosana resulta em superfície muito menos rugosa. Nos filmes compostos foi observado que quitosana constitui a matriz polimérica na qual as partículas de beta-quitina são dispersas,

sendo que a rugosidade da superfície do filme é tanto maior quanto maior o teor de beta-quitina. A composição dos filmes e suas morfologias também afetaram a molhabilidade dos filmes e, assim, as medidas de ângulo de contato revelaram que o filme Q_F (100% quitosana) é o mais hidrofílico ($\theta \approx 75,4^0$), enquanto os filmes compostos BQ₂₀/Q₈₀, BQ₅₀/Q₅₀ e BQ₈₀/Q₂₀, foram mais hidrofóbicos quanto maior o teor de beta-quitina, apresentando ângulos de contato 87,5⁰, 95,6⁰ e 95,2⁰, respectivamente. As análises termogravimétricas revelaram que todos os filmes apresentaram redução na estabilidade térmica e maiores teores de água quando comparados à amostra de beta-quitina na forma de pó, o que possibilitou concluir que, de fato, o tratamento de ultrassom favorece o intumescimento das partículas enquanto o baixo grau de ordem dos filmes contribui para diminuir a estabilidade térmica. Conforme as análises de calorimetria exploratória diferencial, as interações entre as cadeias poliméricas de beta-quitina e quitosana e moléculas de água são mais intensas nos casos dos filmes quando comparados aos polissacarídeos na forma de pós, e que os filmes compostos contendo maiores teores de beta-quitina demandaram energias progressivamente maiores para a eliminação de água, evidenciando que um maior teor de unidades GlcNAc é responsável por interações mais intensas entre cadeias poliméricas e moléculas de água. Os resultados obtidos mostraram que a irradiação de ultrassom de alta intensidade não alterou a estrutura de beta-quitina irradiada, mas propiciou o processamento das suspensões para a formação de filmes sem a utilização de solventes orgânicos, e que a combinação da suspensão irradiada com solução de quitosana resulta em filmes com características dependentes da composição, favorecendo potenciais aplicações biomédicas e na área de alimentos.

Palavras-chave: Beta-quitina. Quitosana. Filmes. Ultrassom.

ABSTRACT

Chitin and chitosan are biocompatible polysaccharides that exhibit filmogenic, fungicide, and bactericide character, and which have numerous potential applications in the food and cosmetic industries and in Medicine and Pharmacy. In this work, the use of high intensity ultrasound irradiation was exploited to obtain stable aqueous suspensions of beta-chitin (GA = 79%), which combined or not with an aqueous solution of chitosan (GA = 4.9%), were employed for the preparation of self-sustained films by casting. Sonication was carried out on suspensions using an ultrasound Branson Sonifier 450 device and the following parameters were set: i) concentration of beta-chitin suspension, $C_p = 2.4 \text{ g L}^{-1}$; ii) volume of suspension, $V = 30 \text{ mL}$; iii) time of sonication = 60 min; iv) temperature of sonication = $65 \pm 1 \text{ }^\circ \text{C}$; v) amplitude of irradiation = 225 W; vi) pulse of irradiation = 50%. The effects of sonication on the structure, average degree of acetylation, $\overline{GA}$, and viscosity average molar mass of beta-chitin were evaluated by using infrared spectroscopy, nuclear magnetic resonance and capillary viscometry in dilute solution, respectively. The results revealed the occurrence of depolymerization of beta-chitin subjected to sonication, since its intrinsic viscosity was slightly lower (16%), but no changes in its average degree of acetylation ($\overline{GA}$) were observed and the infrared spectra of treated and untreated beta-chitin were identical. The films were prepared from beta-chitin suspension subjected to sonication (film BQ_F), aqueous solution of chitosan (film Q_F) and mixtures of both, beta-chitin suspension and chitosan solution in different proportions, resulting in the compounds films BQ₈₀/Q₂₀, BQ₅₀/Q₅₀, BQ₂₀/Q₈₀. Analyzes by atomic force microscopy (AFM) and scanning electron microscopy (SEM) allowed to observe the strong influence of the beta-chitin on the morphology of the films, which were more heterogeneous and exhibited granular and rougher surfaces the higher the content of beta-chitin, while the presence of chitosan produced the opposite effects. Thus, BQ_F and Q_F films showed mean square roughness (RMS) 225.0 nm and 21.6 nm, respectively. In the first case, beta-chitin particles coalesce into clusters resulting in markedly roughened surface while in the second case the coalescence of chitosan sheets results in much less rough surfaces. In compounds films it was observed that chitosan forms the polymeric matrix in which the beta-chitin particles are dispersed, and the surface roughness of the film is higher the higher the beta-chitin content. The composition and the morphology also affected the wettability of the films. Thus, the measurements of contact angle revealed that the film Q_F (100% chitosan) is the most hydrophilic ($\theta \approx 75.40$), while the compounds films BQ₂₀/Q₈₀,

and BQ₅₀/Q₅₀ BQ₈₀/Q₂₀ were more hydrophobic the higher beta-chitin content, exhibiting contact angles 87.50 °, 95.60 ° and 95.20 °, respectively. Thermogravimetric analysis showed that all films were thermally less stable and contained higher water contents as compared to beta-chitin in powder form. In fact, the ultrasound treatment favored the swelling of the particles while the low degree of order of the films contributed to decrease the thermal stability. According to differential scanning calorimetry analyzes the interactions involving polymer chains of beta-chitin and chitosan and water molecules are more intense in the case of films as compared to the polysaccharides in the form of powders. Compounds films containing higher contents of beta-chitin called for progressively higher energy for removing water, indicating that a higher content of GlcNAc units is responsible for more intense interactions between polymer chains and water molecules. The results showed that the high intensity ultrasound irradiation did not modify the structure of irradiated beta-chitin, but allowed the processing of suspensions to form films without using organic solvents. The combination of ultrasound-treated beta-chitin suspension and an aqueous solution of chitosan resulted in films with characteristics dependent on its composition, favoring potential biomedical applications and in the food area.

Keywords: Beta-chitin. Chitosan. Films. Ultrasound.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação da estrutura primária idealizada da quitina, onde n é o grau de polimerização.....	13
Figura 2 – Representação das ligações hidrogênio intra e intermoleculares no arranjo antiparalelo das cadeias da alfa-quitina.	15
Figura 3 – Representação das ligações hidrogênio intra e intermoleculares no arranjo paralelo das cadeias da beta-quitina.	16
Figura 4 – Representação esquemática da disposição das cadeias nas polimorfos alfa, beta e gama-quitina. As setas representam as cadeias poliméricas no sentido do terminal não redutor para o redutor.....	16
Figura 5 – Representação idealizada da estrutura de quitosana, onde n é o grau de polimerização.....	17
Figura 6 – Imagem do sistema elaborado para realizar a irradiação das suspensões de Beta-quitina.	27
Figura 7 – Espectros na Região do Infravermelho das amostras de beta-quitina (BQ) e filme de beta-quitina (BQ _F).....	36
Figura 8 – Espectro de RMN de ¹ H característico de beta-quitina (amostra BQ em DCl/D ₂ O 20%).	37
Figura 9 – Espectro de RMN de ¹ H de quitosana (amostra Q em DCl/D ₂ O 1%).	38
Figura 10 – Curva da viscosidade reduzida em função da concentração à diluição infinita da amostra BQ, a extrapolação da curva fornece a $[\eta]$	40
Figura 11 – Imagens (A) e (A’): superfícies do filme de beta-quitina (BQ _F) por MEV e AFM respectivamente. Imagens (B) e (B’): superfícies do filme de quitosana (Q _F) por MEV e AFM respectivamente. Imagens (C, D e E) e (C’, D’ e E’): superfícies dos filmes compostos.....	43
Figura 12 – Imagem da secção transversal dos filmes de beta-quitina (A), quitosana (B) e filmes Compostos (C) BQ ₂₀ /Q ₈₀ , (D) BQ ₅₀ /Q ₅₀ , (E) BQ ₈₀ /Q ₂₀	46
Figura 13 – Demonstração esquemática das energias interfaciais e ângulo de contato entre uma gota e uma superfície sólida ideal.....	48

Figura 14 – Curvas relacionando ângulo de contato com o tempo de análise, para a amostra Q _F	49
Figura 15 – Gráfico dos valores médios dos ângulos de contato em relação ao tempo dos filmes BQ _F , BQ ₂₀ /Q ₈₀ , BQ ₅₀ /Q ₅₀ , BQ ₈₀ /Q ₂₀ e Q _F	50
Figura 16 – Curvas TG (A) e DTG (B) típicas de beta-quitina em forma de pó.....	53
Figura 17 – Curvas TG/DTG de beta-quitina e quitosana na forma de pó, dos filmes BQ _F , Q _F e filmes compostos (BQ ₈₀ /Q ₂₀ , BQ ₅₀ /Q ₅₀ , BQ ₂₀ /Q ₈₀).	55
Figura 18 – Temperatura de máxima decomposição (T _{máx} /°C) versus teor (%) de beta-quitina nos filmes BQ _F , Q _F , BQ ₈₀ /Q ₂₀ , BQ ₅₀ /Q ₅₀ , BQ ₂₀ /Q ₈₀	57
Figura 19 – Cálculo da área do pico correspondente à eliminação de água em uma curva DSC típica de beta-quitina.	59
Figura 20 – Curvas DSC das amostras BQ (beta-quitina na forma de pó) e Q (quitosana na forma de pó), e dos filmes BQ _F (filme composto apenas por beta-quitina) e Q _F (filme composto apenas por quitosana).....	61
Figura 21 – Curvas DSC dos filmes BQ _F e Q _F , e dos filmes compostos (BQ ₈₀ /Q ₂₀ , BQ ₅₀ /Q ₅₀ , BQ ₂₀ /Q ₈₀).	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição dos filmes de beta-quitina, de quitosana e filmes compósitos ^(a)	26
Tabela 2 – Números de onda e atribuições de absorção na Região do Infravermelho de beta-quitina (BQ) e filme de beta-quitina (BQ _F).	35
Tabela 3 – Valores de grau médio de acetilação ($\overline{GA}$), viscosidade intrínseca $[\eta]$ e massa molar média viscosimétrica ($\overline{M}_v$) de quitosana, beta-quitina e filme de beta-quitina.	41
Tabela 4 - Medidas da espessura e da rugosidade média quadrática dos filmes BQ _F , Q _F , BQ ₈₀ /Q ₂₀ , BQ ₅₀ /Q ₅₀ e BQ ₂₀ /Q ₈₀	47
Tabela 5 – Valores médios de ângulos de contato dos filmes de beta-quitina (BQ), quitosana (Q) e compósitos (BQ/Q), medidos ao longo de 60 segundos.	51
Tabela 6 – Valores de temperatura inicial (T _i), final (T _f) e de máxima degradação (T _{máx}), porcentagem de perdas de massa referentes ao 1º e 2º estágio de aquecimento das amostras de beta-quitina e quitosana em forma de pó (BQ e Q), em forma de filme (BQ _F e Q _F) e filmes compostos (BQ ₈₀ /Q ₂₀ , BQ ₅₀ /Q ₅₀ , BQ ₂₀ /Q ₈₀).....	56
Tabela 7 – Energia absorvida pelas amostras BQ e Q (amostra na forma de pó) e BQ _F , Q _F , BQ ₈₀ /Q ₂₀ , BQ ₅₀ /Q ₅₀ e BQ ₂₀ /Q ₈₀ (filmes), referente ao primeiro estágio de aquecimento.....	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BQ = beta-quitina na forma de pó

Q = quitosana em pó

BQ_F = filme de composição exclusiva de beta-quitina

Q_F = filme de composição exclusiva de quitosana

BQ₈₀/Q₂₀ = filme composto por 80% beta-quitina e 20% quitosana

BQ₅₀/Q₅₀ = filme composto por 50% beta-quitina e 50% quitosana

BQ₂₀/Q₈₀ = filme composto por 20% beta-quitina e 80% quitosana

GlcNAc = unidade 2-acetamido-2-desoxi-D-glicopiranoose

GlcN = unidade 2-amino-2-desoxi-D-glicopiranoose

$\overline{GA}$ = grau médio de acetilação

$\overline{Mv}$ = massa molar média viscosimétrica

IV = espectroscopia na região do infravermelho

¹H RMN = espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio

MEV = microscopia eletrônica de varredura

AFM = microscopia de força atômica

TG = termogravimetria

DSC = calorimetria de exploração diferencial

QDaius_1 = Quitosana obtida a partir do processo DAIUS executado quitina na forma de pó

QDaius_2 = Quitosana obtida a partir do processo DAIUS executado sobre QDaius_1

Q = Quitosana extensivamente desacetilada

C_p = Concentração Polimérica

SUMÁRIO

1. Introdução.....	13
2. Objetivos	23
3. Procedimento Experimental	24
3.1. Beta-quitina.....	24
3.2. Quitosana	24
3.3. Preparação dos filmes	25
3.4. Caracterizações dos Biopolímeros	28
3.4.1. Espectroscopia na Região do Infravermelho.....	28
3.4.2. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN de ^1H)	29
3.4.3. Viscosimetria Capilar.....	30
3.5. Caracterizações dos filmes.....	32
3.5.1. Espessura.....	32
3.5.2. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	32
3.5.3. Microscopia de Força Atômica (AFM).....	33
3.5.4. Ângulo de Contato	33
3.5.5. Termogravimetria (TG).....	34
3.5.6. Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)	34
4. Resultados e discussão	35
4.1. Caracterização Estrutural dos Biopolímeros.....	35
4.2. Análise morfológica e topográfica dos filmes	41
4.3. Análise da hidrofiliabilidade dos filmes a partir da molhabilidade	47
4.4. Análises Térmicas.....	52
5. Conclusões.....	64
6. Perspectivas para trabalho futuro	66
7. Referências	

1. Introdução

Quitina e Quitosana

A quitina é um polissacarídeo abundantemente encontrado na natureza, presente em animais invertebrados de diversos filos, como *Arthropoda*, *Annelida*, *Mollusca* e *Coelenterata*, e também em alguns fungos, por exemplo, *Eusomycetes*, *Zygomycetes* e *Deuteromycetes* (CARDOSO, 2008). É um polímero semicristalino de cadeia linear, constituída por unidades 2-acetamido-2-desoxi-D-glicopirranose (GlcNAc) unidas por ligações beta(1-4) (Figura1).

Figura 1 – Representação da estrutura primária idealizada da quitina, onde n é o grau de polimerização.

Na natureza a quitina constitui estruturas e materiais de suporte conferindo defesa, proteção e resistência mecânica aos organismos nos quais ocorre, integrando, por exemplo, os exoesqueletos de artrópodes (carapaças de caranguejos, cascas de camarões) e estruturas de suporte em moluscos (gládios de lulas) (RAVI KUMAR, 2000; KURITA, 2006).

Em função do organismo no qual ocorre e dos tratamentos necessários à sua extração da biomassa, podem ser observadas variações no que diz respeito ao grau médio de polimerização da quitina e em relação à quantidade de unidades GlcNAc, ($\approx 90-95\%$) e GlcN, ($\approx 5-10\%$). Além disso, a quitina nativa, também apresenta variações em sua constituição, o que se deve à função que desempenha no organismo onde é encontrada bem como ao estágio de crescimento (CAMPANA et al., 2007).

A quitina ocorre como estruturas polimórficas alfa-, beta- e gama-quitina, sendo a última uma combinação das estruturas alfa e beta em vez de propriamente uma estrutura polimórfica (KUMIRSKA, 2010). A mais abundante é a alfa-quitina, que ocorre associada com proteínas e materiais inorgânicos, constituindo estruturas rígidas e resistentes, como cutículas de artrópodes (GOODRICH; WINTER, 2007). A polimorfa beta-quitina é encontrada em estruturas que requerem maior flexibilidade, como em gládios de lulas, os quais não contêm sais minerais nem pigmentos em quantidades significativas, tornando o processo de extração de quitina mais simples, pois apenas o procedimento de desproteinização é necessário nesse caso (CHAUSSARD; DOMARD, 2004).

As polimorfias da quitina correspondem a diferentes arranjos das cadeias poliméricas no estado sólido. De fato, quitina é um polímero semicristalino que, nos domínios cristalinos, possui suas cadeias organizadas em folhas ou lamelas e, conforme a disposição relativa das cadeias, paralelamente ou antiparalelamente umas às outras, com relação às extremidades redutoras e não redutoras, o estabelecimento de ligações hidrogênio tanto intra como intermoleculares e também interlamelares, é mais ou menos favorecido, resultando em arranjos mais ou menos compactos (FAN; SAITO; ISOGAI, 2008; ZHANG et al., 2005).

Assim, em alfa-quitina as cadeias poliméricas estão dispostas de forma antiparalela, o que favorece o estabelecimento de numerosas ligações hidrogênio intra e intermoleculares e também interlamelares, resultando em um empacotamento denso. Na Figura 2 são observadas as ligações intramoleculares $C(3')OH \cdots OC(5)$ e $C(6'1)OH \cdots O=C(7)$, e intermoleculares $C(6)O \cdots HOC(6')$ e $C(2)NH \cdots O=C(7)$ (KUMIRSKA, 2010; PILLAI et al., 2009).

Figura 2 – Representação das ligações hidrogênio intra e intermoleculares no arranjo antiparalelo das cadeias da alfa-quitina.

Na beta-quitina as cadeias estão dispostas paralelamente, o que desfavorece o estabelecimento de ligações de hidrogênio intermoleculares e principalmente interlamelares, resultando em empacotamento menos denso que o observado no caso da alfa-quitina. Em beta-quitina (Figura 3) são observadas as ligações intramoleculares $\text{C(3)OH} \cdots \text{OC(5)}$, $\text{C(2)NH} \cdots \text{O=C(7)}$ e $\text{C(6)OH} \cdots \text{O=C(7)}$, Figura 3 (KUMIRSKA, 2010; PILLAI et al., 2009).

Figura 3 – Representação das ligações hidrogênio intra e intermoleculares no arranjo paralelo das cadeias da beta-quitina.

Na gama-quitina ocorre uma combinação dos arranjos da alfa- e beta-quitina, sendo que duas cadeias em disposição antiparalela são intercaladas por uma cadeia disposta de maneira paralela, como ilustrado na Figura 4 (AGULLÓ et al., 2004; ROBERTS, 1992; CAMPANA FILHO et al., 2007).

Figura 4 – Representação esquemática da disposição das cadeias nas polimorfos alfa-, beta- e gama-quitina. As setas representam as cadeias poliméricas no sentido do terminal não redutor para o redutor.

Os diferentes arranjos das cadeias de quitina em seus domínios cristalinos, responsáveis pela existência das polimorfos, resultam nas diferentes propriedades físico-químicas que estas possuem. Como ilustrado na Figura 2, ligações hidrogênio intra e intermolecular em extensivo número são favorecidas quando as cadeias se encontram na disposição antiparalela, originando um empacotamento denso e justificando, por exemplo, a baixa capacidade da alfa-quitina de intumescer na presença de água. Por outro lado a beta-quitina, que possui as cadeias posicionadas antiparalelamente umas às outras e na qual as ligações hidrogênio intermoleculares não são favorecidas, possui um empacotamento menos denso, como consequência disso a beta-quitina é mais solúvel em solventes orgânicos comuns e também é mais susceptível a intumescimento em presença de água. Outra característica da beta-quitina é a de ser mais susceptível à reação de N-desacetilação do que a alfa-quitina (KUMIRSKA, 2010; PILLAI et al., 2009).

O principal derivado da quitina é a quitosana, copolímero composto por unidades 2-acetoamido-2-desoxi-D-glicopirranose (GlcNAc) e 2-amino-2-desoxi-D-glicopirranose (GlcN) (ZHANG et al., 2005) a qual ocorre na natureza em alguns fungos, mas geralmente é obtida em laboratórios de pesquisa bem como na indústria, através da hidrólise dos grupos acetamido da maioria das unidades GlcNAc da quitina (Figura 5).

Figura 5 – Representação idealizada da estrutura de quitosana, onde n é o grau de polimerização.

A conversão de quitina em quitosana é denominada reação de N-desacetilação, pois a reação ocorre pela eliminação de grupos acetil das unidades GlcNAc gerando unidades GlcN, sendo que a composição do copolímero resultante é variável em função do grau residual de

acetilação. O valor do grau médio de acetilação, $\overline{GA}$, que é definido como o número médio de unidades GlcNAc por cadeia polimérica, classifica o polímero como quitosana ($\overline{GA} < 50\%$) ou quitina ($\overline{GA} > 80-90\%$) (RINAUDO; MILAS; LÊ DUNG, 1993).

Embora a N-desacetilação de quitina possa ser executada por enzimas, o tratamento de quitina em meio fortemente alcalino é o processo mais utilizado para hidrolisar os grupos acetamido das unidades GlcNAc (DELEZUK, 2009). As características do produto de desacetilação, principalmente o grau médio de acetilação ($\overline{GA}$), massa molar média e distribuição das unidades GlcNAc e GlcN, são dependentes das condições em que a reação ocorre, sendo a concentração do álcali, o tempo de duração de reação e a temperatura, as variáveis mais importantes (FIAMINGO, 2011). As condições reacionais têm também efeito marcante sobre as propriedades físico-químicas, tais como solubilidade, viscosidade, e atividades biológicas (como atividade antimicrobiana), biodegradabilidade e biocompatibilidade de quitosana (BRUGNEROTTO et. al., 2001).

A solubilidade da quitosana em meios aquosos está fortemente relacionada com a acidez do meio, além de depender da sua massa molar média. Assim, em meios aquosos ácidos, o valor de $\overline{GA}$ determina a quantidade de grupos amino protonados ($-\text{NH}_3^+$) nas cadeias poliméricas, os quais se repelem mutuamente e mantêm as cadeias mais afastadas e acessíveis para a solvatação, convertendo a quitosana em um polieletrólito catiônico solúvel (AGULLÓ et. al., 2004; ROBERTS, 1992; KUMIRSKA, 2010).

Assim, quitina e quitosana apresentam propriedades distintas e diferentes aplicações nas áreas industrial e científica. A solubilidade de quitina, por exemplo, restrita a poucos sistemas solventes, como N,N-dimetilacetamida/ LiCl 5%, limita suas possibilidades de aplicações. Por outro lado a quitosana, solúvel em meios aquosos ácidos, tem numerosas aplicações nas indústrias alimentícia e de cosméticos, e também em Medicina, Farmácia, Odontologia, entre outras (GILDBERG; STENBERG, 2001; PETER, 1995; LI et al., 1992).

Quitina e quitosana têm despertado muito interesse tanto na área científica quanto na comercial devido ao elevado teor de nitrogênio ($\approx 7\%$) e as suas excelentes propriedades, tais como biocompatibilidade, biodegradabilidade, baixas toxicidade e alergenicidade, mucoadesividade, atividades antimicrobiana e hemostática, entre outras atividades biológicas. A capacidade de interação com diferentes substâncias tais como, lipídeos, proteínas, corantes,

íons metálicos, herbicidas e pesticidas, viabilizam sua aplicação em processos de concentração, recuperação, análise e separação dessas substâncias. (CAMPANA et al., 2007).

Fontes e processo de obtenção

A quitina é encontrada em diferentes classes de animais que formam o grupo dos invertebrados, compondo as suas estruturas esqueléticas, nas quais ocorre associada a outras substâncias. As principais fontes empregadas para a produção industrial de quitina são as carapaças de caranguejos e as cascas de camarão. Nas carapaças secas de crustáceos, por exemplo, a ocorrência de quitina é de 20-30%, de 30-40% da composição é de proteínas, 30-50% de carbonatos e quantidades $\leq 5\%$ são de pigmentos e lipídeos, variando com relação à espécie e local de origem da fonte (KURITA, 2006).

No processo de extração da quitina da biomassa são necessários tratamentos que visam à eliminação das substâncias associadas ao polissacarídeo de interesse. Os procedimentos geralmente compreendem a utilização de soluções ácidas na etapa de desmineralização, soluções alcalinas na etapa de desproteinização e solventes orgânicos ou agentes oxidantes para a despigmentação. O rendimento do processo de extração e a qualidade da quitina extraída dependem da natureza da matéria-prima e das condições empregadas (NO; MEYERS, 1997).

A quitosana é comumente obtida pela desacetilação da quitina em meio fortemente alcalino sob condições heterogêneas, temperaturas elevadas e longos tempos de reação, o que resulta em acentuada despolimerização, principalmente quando condições mais severas são empregadas e se a reação é sequencialmente repetida visando à preparação de quitosanas extensivamente desacetiladas (CAMAPANA-FILHO; SIGNINI, 2001).

Recentemente, Delezuk et al. (2009) desenvolveram um novo processo para obtenção de quitosana extensivamente desacetilada através da desacetilação assistida por ultrassom de alta intensidade (DAIUS). Os resultados deste trabalho mostraram que o processo DAIUS é mais eficiente que a maior parte dos processos descritos na literatura, pois permite a produção de quitosana extensivamente desacetilada, de massa molar média elevada e baixa polidispersividade, apesar de demandar tempos de reação mais curtos e temperaturas mais baixas que as empregadas nos processos convencionais.

Utilização do ultrassom de alta intensidade

O ultrassom foi definido como som em frequência além da faixa de audibilidade humana (20 – 18 kHz) por F. Galton (CARDOSO, 2003). Hoje o ultrassom é utilizado em áreas variadas como, em hospitais para exames específicos, na indústria para efetuar cortes de peças de plástico ou em tecidos e também em alarmes nas residências. Contudo, nenhuma das aplicações citadas faz uso dos efeitos que o ultrassom pode ter sobre a reatividade química (SUSLICK, 1986).

Em Química o ultrassom é empregado em uma gama de aplicações, como na impregnação de catalisadores sobre suportes sólidos, na síntese de organometálicos, em reações de polimerização, entre outras, constituindo a Sonoquímica (CARDOSO, 2003).

A Sonoquímica tem sido objeto de pesquisas nas décadas recentes, contudo, a sua história começou há muito tempo, no final de 1800, quando o fenômeno da cavitação foi observado. O primeiro Químico a reconhecer os efeitos incomuns das ondas sonoras intensas sendo propagadas através de meio líquido foi Alfred L. Loomis em 1927, mas não houve grandes avanços durante 60 anos. Em 1980 a Sonoquímica obteve maior atenção a partir do advento de geradores confiáveis de ultrassom de alta intensidade.

Os efeitos químicos do ultrassom são divididos em três áreas: i) sonoquímica de sistemas líquidos homogêneos; ii) sonoquímica de sistemas líquido-líquido e líquido-sólido heterogêneos; e iii) sonocatálises. A irradiação de ultrassom se diferencia das fontes de energia tradicionais (como calor, luz ou energia de ionização) em duração, pressão e extraordinário aquecimento e taxas de resfriamento gerados no colapso cavitacional.

Da mesma forma que toda energia sonora as ondas de ultrassom se propagam através de ciclos de compressão e expansão. Os ciclos de compressão exercem pressão positiva sobre as moléculas, aproximando-as, enquanto nos ciclos de expansão a pressão exercida é negativa, deixando as moléculas mais afastadas. Durante a ocorrência desses ciclos as forças intermoleculares do líquido podem ser vencidas pela energia aplicada e cavidades se formam (SUSLICK, 1989).

Esse fenômeno, denominado cavitação, leva a formação de cavidades com diâmetro de aproximadamente 100 µm, que virão a implodir violentamente liberando enorme quantidade

de energia. Estudos demonstraram que a implosão das cavidades (“bubble implosion”) pode elevar a temperatura e pressão locais até 5.500°C e 100 atm, respectivamente (MASON, 1990, 1997).

De acordo com a teoria mais difundida, denominada “Hot Spot”, a cavitação ocorre em micro regiões, em tempos muito curtos ($> 1 \mu s$) e produz violentos jatos de solvente que, em meios heterogêneos, promovem a colisão das partículas sólidas umas contra as outras a velocidades superiores a 1000 Km h^{-1} , causando a fragmentação das partículas e, consequentemente a redução de suas dimensões médias e aumento da área superficial (KARDOS; LUCHE, 2001) o que pode ativar as espécies para a ocorrência de reações. Tal efeito da cavitação é, aparentemente, responsável pela maior eficiência da desacetilação assistida por irradiação de ultrassom de alta intensidade (DELEZUK, 2009).

Filmes

A indústria alimentícia vem sendo cada vez mais exigida no sentido de garantir a qualidade de seus produtos com relação a alguns requisitos como segurança e higiene, o que leva tanto a indústria quanto a pesquisa a se empenharem mais e mais para responder a um mercado crescentemente exigente. Assim, o desenvolvimento de embalagens funcionais de alimentos tem conhecido enorme crescimento, elevando a milhões de toneladas a quantidade de resíduos em aterros sanitários a cada ano. Nos últimos vinte anos, por exemplo, a produção mundial de resinas plásticas aumentou cerca de 25 vezes, enquanto que menos de 5% de todo o plástico foi reciclado, acarretando um rápido acúmulo no meio ambiente (ESPITIA et al., 2013)

Biopolímeros têm sido aplicados como constituintes na formação de filmes e embalagens devido a sua principal característica: a biodegradabilidade. Assim, no segmento alimentício, materiais têm sido desenvolvidos com a finalidade de tornar possível a substituição de materiais sintéticos, que são degradáveis apenas em longo prazo, por materiais biodegradáveis e não tóxicos.

Polissacarídeos, entre eles a quitosana, lipídeos e proteínas são exemplos de biopolímeros investigados quanto a sua tendência filmogênica para aplicação na indústria de alimentos (AZEREDO et al., 2009).

Outras promissoras aplicações dos materiais à base de biopolímeros se voltam para a área de Medicina, especialmente para o desenvolvimento de bandagens e curativos. Os ferimentos que ocorrem na pele são tratados desde muito tempo com curativos e bandagens, os quais se destinam a inibir o sangramento, proteger a ferida dos agentes externos que podem irritar, inflamar ou infeccionar o local, e acelerar o processo de cicatrização. Um bom material curativo deve manter a interface da ferida umidificada, permitir trocas gasosas, não ser permeável a micro-organismos e reduzir a excreção da ferida, além de apresentar propriedades como a atoxicidade, hipoalergenicidade e aderência suficiente, de maneira a não oferecer dificuldade na remoção (JAYAKUMAR et al., 2011).

A tendência natural de aderência a superfícies (formação de filmes), caráter fungicida e bactericida, e biocompatibilidade são algumas das características que fazem com que quitina e quitosana apresentem inúmeras potenciais aplicações nas indústrias alimentícia e cosmética, e também em Medicina.

2. Objetivos

- ✓ Explorar a utilização de ultrassom de alta intensidade com a finalidade de obter suspensões aquosas estáveis de beta-quitina, as quais, combinadas ou não a solução de quitosana, permitam a obtenção de filmes autossustentáveis por *casting*;
- ✓ Empregar o método *casting* para a produção de filmes compostos por suspensões de beta-quitina irradiadas por ultrassom de alta intensidade e soluções de quitosana, em diferentes proporções;
- ✓ Caracterizar os filmes obtidos quanto à morfologia, molhabilidade, e comportamento térmico.

3. Procedimento Experimental

3.1. Beta-quitina

A beta-quitina utilizada neste trabalho, extraída de gládios de lulas, foi adquirida de KUALYBES LLC (Peru) e empregada como recebida, exceto apenas pela prévia trituração e fracionamento por tamanho de partículas.

Assim, beta-quitina foi seca em estufa a 35 °C por 6 horas, e então foi triturada em moinho de facas (modelo MA048 MARCONI) e posteriormente em moinho criogênico (modelo MM400 RETSCH). O material resultante foi submetido a fracionamento por tamanho de partículas utilizando conjunto de tamises. A fração selecionada para utilização no presente trabalho possui partículas com tamanho médio no intervalo 0,075 mm – 0,125 mm.

3.2. Quitosana

A quitosana utilizada neste trabalho foi produzida nos laboratórios do Grupo de Físico-Química Orgânica do Instituto de Química de São Carlos, USP, a partir da desacetilação de beta-quitina extraída de gládios de lulas da espécie *Loligo sampaulensis*, gentilmente cedidos pela empresa Miami Pescados (Cananéia/São Paulo).

Os gládios foram lavados e secos em estufa, logo após foram triturados em moinho de facas (modelo MA048 MARCONI) e fracionadas, sendo a fração utilizada foi apenas aquela com partículas com dimensões médias no intervalo 0,125 mm - 0,250 mm. De acordo com Kurita et al. (1992) e trabalhos já realizados no Grupo de Físico-Química Orgânica, os gládios não contêm sais minerais em quantidades significativas, o que permite dispensar a etapa de desmineralização dos gládios (LAVALL et al., 2007), sendo então apenas necessário realizar a desproteinização. Conforme relatado por Chaussard et al., (2004), 200 gramas de gládios moídos foram suspensos em 3 litros de solução aquosa de NaOH 1 mol L⁻¹ e a suspensão foi mantida sob agitação por 18 horas. A beta-quitina resultante desse tratamento foi lavada até a neutralidade das águas de lavagens, levada a estufa de circulação de ar por 24 horas a 30 °C, e depois de seca foi triturada em moinho de facas, e fracionada em conjunto de tamises. A

fração de partículas de beta-quitina com tamanho médio no intervalo 0,075 mm – 0,125 mm foram empregadas para produzir quitosana.

A desacetilação da beta-quitina foi realizada empregando o processo de desacetilação assistida por irradiação de ultrassom de alta intensidade, processo DAIUS. O dispositivo ultrasônico utilizado foi o Hielscher Sonifier UP400S ($\nu = 24$ kHz), e os parâmetros do processo DAIUS foram: i) sonda UPR sonotrodo Hielscher H22D (diâmetro ≈ 22 mm e comprimento ≈ 100 mm); ii) intensidade de irradiação: 50 % da intensidade máxima nominal do equipamento, *i.e.* 200W; iii) irradiação intermitente: ciclos de 50 % de pulsação. A beta-quitina foi suspensa em 100 mL de solução de NaOH 40 % na proporção de 1/10 (m/v), e foi vertida em reator cilíndrico de vidro com parede dupla (diâmetro interno = 3,5 cm), acoplado a um banho de circulação de água, o qual manteve a temperatura constante em 65 ± 1 °C. O sonotrodo foi mergulhado (2/3 do seu comprimento) na suspensão e a reação procedeu por 50 minutos, em seguida foi adicionado gelo (produzido com água destilada) ao meio reacional que foi imediatamente neutralizado com HCl concentrado. Após a neutralização, a quitosana resultante (QDaius_1) foi isolada por filtração e lavada sucessivamente com misturas de água/etanol (30%/70%), (20%/80%) e (10%/90%), e com etanol. Após esta etapa, a quitosana QDaius_1 seguiu para secagem em estufa a 40 °C por 48 horas e depois em estufa a vácuo por 24 horas.

Para a obtenção da quitosana extensivamente desacetilada (Q), a qual foi empregada nos estudos visando à produção de filmes, o processo DAIUS foi executado mais uma vez sobre QDaius_1, gerando a quitosana QDaius_2, à qual foi aplicado o processo DAIUS mais uma vez para resultar na amostra Q.

3.3. Preparação dos filmes

Os filmes foram obtidos por *casting* de solução de quitosana (Q) e suspensão de beta-quitina (BQ), ambas na concentração de $2,4 \text{ g L}^{-1}$, conforme as composições que constam na Tabela 1.

Tabela 1 – Composição dos filmes de beta-quitina, de quitosana e filmes compósitos^(a).

Composição	Filme	Volume de suspensão (BQ) / solução (Q)
Beta-Quitina 100%	BQ_F	25mL / 0mL
Beta-Quitina 80% / Quitosana 20%	BQ₈₀/Q₂₀	20mL / 5mL
Beta-Quitina 50% / Quitosana 50%	BQ₅₀/Q₅₀	12,5mL / 12,5mL
Beta-Quitina 20% / Quitosana 80%	BQ₂₀/Q₈₀	5mL / 20mL
Quitosana 100%	Q_F	0mL / 25mL

(a) Quitosana foi dissolvida em solução aquosa de HCl ($0,025 \text{ mol L}^{-1}$, pH = 1,602), enquanto beta-quitina foi suspensa em água destilada (pH = 4,5). Nas misturas beta-quitina/quitosana, a suspensão de beta-quitina teve o pH ajustado para $\text{pH} \approx 4,5$

Todos os filmes foram preparados a partir do volume de 25 mL, os quais foram depositados em placa circular de poliestireno estéril com dimensões de 60 x 15 mm e foram levados à estufa na temperatura de 65 °C por três dias, para a completa evaporação do solvente.

Os filmes contendo beta-quitina foram preparados a partir de suspensões aquosas do polissacarídeo ($C_p = 2,4 \text{ g L}^{-1}$) as quais foram previamente tratadas com irradiação de ultrassom de alta intensidade. Assim, a suspensão aquosa de beta-quitina teve o pH ajustado para 4,5 mediante adição de solução de ácido clorídrico (HCl) na concentração $0,05 \text{ mol L}^{-1}$, foi submetida a irradiação de ultrassom de alta intensidade utilizando o equipamento BRANSON SONIFIER 450. A suspensão foi vertida em um reator com parede dupla de vidro, com capacidade para 30 mL, mantida em temperatura de $65 \pm 1 \text{ °C}$ através de banho circulante de óleo e mantida sob agitação para possibilitar a irradiação homogênea de todo volume de suspensão. O tempo de tratamento foi de 60 minutos, a 50 % da intensidade máxima do equipamento e com ciclos de 50 % de pulsação, na Figura 6 pode se observar o sistema utilizado.

Figura 6 – Imagem do sistema elaborado para realizar a irradiação das suspensões de Beta-quitina.

As soluções que originaram os filmes de quitosana foram preparadas através da solubilização da quitosana em $\text{HCl } 0,025 \text{ mol L}^{-1}$. A suspensão de quitosana ($C_p = 2,4 \text{ g L}^{-1}$) foi mantida sob agitação magnética por 24 h, até total dissolução, tendo o pH final corrigido para 4,5, mediante adição de solução de NaOH ou de HCl.

Para a preparação dos filmes compostos, *i.e.* contendo beta-quitina e quitosana em sua composição, alíquotas de suspensão de beta-quitina e de solução de quitosana, separadamente preparadas, foram colocadas em um béquer e mantidas sob agitação magnética de baixa velocidade para promover a dispersão e homogeneização. Após essa etapa seguiu-se o procedimento já descrito anteriormente para a produção dos filmes. Diferentes proporções destes biopolímeros foram utilizadas para preparar os filmes compostos (Tabela 1).

3.4. Caracterizações dos Biopolímeros

As caracterizações de beta-quitina e quitosana focaram na determinação estrutural empregando espectroscopia no infravermelho e espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio, sendo que o uso desta última técnica permitiu também a determinação do grau médio de acetilação ($\overline{GA}$) dos biopolímeros. Viscosimetria em solução diluída foi empregada para a determinação de viscosidade intrínseca e massa molar média viscosimétrica ($\overline{Mv}$), permitindo avaliar a ocorrência de despolimerização em consequência do tratamento de ultrassom durante o processo DAIUS e na preparação das suspensões de beta-quitina para produção dos filmes.

3.4.1. Espectroscopia na Região do Infravermelho

As análises de Espectroscopia na Região do Infravermelho foram realizadas com a finalidade de caracterizar os grupos funcionais típicos de quitina e para verificar se ocorreram modificações estruturais devidas à ação do ultrassom de alta intensidade. Os espectros da beta-quitina de partida e após a execução do tratamento de ultrassom foram adquiridos a partir de pastilha de beta-quitina/KBr e do filme BQ, preparado a partir de suspensão previamente irradiada, respectivamente.

A beta-quitina triturada foi macerada utilizando gral e pistilo de ágata, e adicionada a brometo de potássio (KBr) de grau espectroscópico na proporção de 1:100 gramas (amostra/KBr). A mistura foi homogeneizada e seca em estufa a vácuo na temperatura de 30 °C por 24 horas, sendo em seguida obtida a pastilha (espessura $\approx$ 8 mm) após prensagem em prensa manual CARVER LABORATORY PRESS modelo 3648.

O filme BQ, obtido a partir de suspensão de beta-quitina previamente irradiada, foi recortado ($\approx$ 2 cm²) e seco em estufa a vácuo na temperatura de 30 °C por 24 horas.

Para realizar as análises, o equipamento BOMEM modelo MB-102 com transformada de Fourier foi utilizado com os seguintes parâmetros: acúmulo de 32 varreduras e resolução de 4 cm⁻¹, no intervalo de 4000 – 500 cm⁻¹.

3.4.2. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN de ^1H)

A Espectroscopia de Ressonância Magnética de Hidrogênio foi utilizada para a determinação do grau médio de acetilação ($\overline{GA}$) de quitosana e de beta-quitina. Também foi obtido o espectro de beta-quitina após a execução do tratamento de ultrassom para avaliar os efeitos da irradiação de ultrassom alta intensidade sobre beta-quitina. Em função da natureza do biopolímero, e, portanto de sua solubilidade, foram empregados diferentes solventes para a aquisição dos espectros.

Quitosana

Aproximadamente 10 mg de quitosana foram adicionados a 1 mL de solução HCl/D₂O (1% v/v) e a mistura foi mantida sob agitação magnética constante, a temperatura ambiente durante 24 horas para total dissolução.

Beta-quitina

Aproximadamente 10 mg de beta-quitina foram adicionados a 1 mL de solução DCI/D₂O (20% v/v) e a mistura foi mantida sob agitação magnética constante a 70 °C durante 18 horas para total dissolução. Para a aquisição do espectro de beta-quitina, previamente irradiada com ultrassom de alta intensidade (item 3.3), a suspensão do biopolímero em água foi congelada em nitrogênio líquido e liofilizada. Aproximadamente 10 mg do material recuperado após liofilização foram adicionados a 1 mL de solução DCI/D₂O (20% v/v), e a mistura foi mantida sob agitação magnética constante a 70 °C durante 18 horas para total dissolução.

Para a aquisição de todos os espectros, as soluções obtidas foram transferidas para tubos apropriados ($\phi = 5$ mm) e os respectivos espectros foram gerados. O espectrofotômetro utilizado foi AGILENT 400/45 A 70 °C, o pulso utilizado foi de 4,45 mS (45 °), acumulando 256 varreduras e o parâmetro LB foi de 0,20 Hz.

3.4.3. Viscosimetria Capilar

A técnica de Viscosimetria Capilar foi utilizada para determinar a viscosidade intrínseca das amostras de quitosana e beta-quitina, sendo que neste último caso também foi analisada a amostra de beta-quitina isolada da suspensão aquosa previamente submetida à irradiação de ultrassom de alta intensidade, de maneira a permitir a avaliação da ocorrência de despolimerização. A partir do valor de viscosidade intrínseca, e conhecidos os valores das constantes “k” e “a” da equação de Mark–Houwink–Sakurada, é possível determinar a massa molar média viscosimétrica ($\overline{M}_v$) do polímero. Em função da natureza do polímero, beta-quitina ou quitosana, solventes diferentes foram empregados para a preparação das soluções empregadas nas análises por viscosidade.

Quitosana

Aproximadamente 20 mg de quitosana (previamente seca em estufa a vácuo, a 30 °C por 6 horas) foram suspensos em 25 mL de solução de ácido acético 0,6 mol L⁻¹ e a suspensão foi mantida sob agitação magnética constante durante 24 horas. Em seguida foram adicionados 25 mL de acetato de sódio 0,4 mol L⁻¹ e a agitação procedeu por mais 24 horas. A solução resultante foi filtrada sob pressão positiva em membrana com diâmetro dos poros de 0,45 µm (Millipore – White SCWP).

Beta-quitina

A beta-quitina de partida e a amostra isolada a partir suspensão submetida ao tratamento de ultrassom foram dissolvidas em sistema solvente N,N-dimetilacetamido/5% LiCl. Assim, aproximadamente 7,5 mg de amostra foram suspensos em 30 mL de N,N-dimetilacetamido/5% LiCl, e a suspensão foi mantida sob agitação magnética durante 24 horas à temperatura ambiente para total dissolução.

Alíquotas de 15 mL da solução do biopolímero (beta-quitina ou quitosana) foi transferida para um viscosímetro capilar de vidro (do tipo Ubbelohde, $\phi = 0,53$ mm) e as

medidas de tempo de escoamento foram determinadas a $25,00 \pm 0,01$ °C em viscosímetro AVS-350 acoplado a um módulo diluidor automático AVS-20, ambos da Schott-Geräte.

Tampão ácido acético $0,3 \text{ mol L}^{-1}$ /acetato de sódio $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ (pH = 4,5) e N,N-dimetilacetamido/LiCl 5% foram empregados para as sucessivas diluições das soluções de quitosana e beta-quitina, respectivamente.

Os valores de tempo de escoamento empregados para as determinações de viscosidade intrínseca correspondem à média de três determinações independentes que não apresentaram variação maior que 0,5%. Foi feita a correção de Hagenbach (SIGNINI et al., 2002) para os valores de tempo de escoamento da solução (t_c) e tempo de escoamento do solvente (t_0), conforme a Equação 1.

$$\Delta t_{HC} = \frac{E}{Kt_2} \quad (1)$$

sendo:

Δt_{HC} = correção de Hagenbach para o tempo de escoamento;

t = tempo de escoamento médio;

E/K = constante relacionada com o diâmetro do capilar utilizado.

Assim, após a correção, os tempos de escoamento utilizados (t') foram obtidos por (equação 2):

$$t' = t - \Delta t_{HC} \quad (2)$$

Empregando as condições e os equipamentos citados e considerando os intervalos de concentração das soluções de quitosana e beta-quitina, a seguinte aproximação é válida (Equação 3):

$$\eta_{rel} \cong \frac{t_c'}{t_0'} \quad (3)$$

sendo,

η_{rel} = viscosidade relativa da solução de quitosana (ou beta-quitina) de concentração C;

t_c' = tempo de escoamento corrigido da solução de quitosana (ou beta-quitina) de concentração C (corrigido);

t_0' = tempo de escoamento corrigido do solvente.

Para a determinação da viscosidade intrínseca das amostras, a viscosidade relativa (η_{rel}) (Equação 3) das soluções foi mantida no intervalo de 1,2 - 1,8, caracterizando o sistema diluído. A equação de Huggins foi empregada para a determinação da viscosidade intrínseca pela extrapolação da curva (η_{rel})/C *versus* C à diluição infinita.

3.5. Caracterizações dos filmes

3.5.1. Espessura

A espessura dos filmes foi avaliada com auxílio de um paquímetro digital marca Pro-Max modelo NKS (Japão) com resolução de 0,01 mm. Para as medidas de espessura foram avaliados quatro pontos aleatórios de cada amostra e a média aritmética foi calculada para expressar a espessura média dos filmes.

3.5.2. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A Microscopia Eletrônica de Varredura foi empregada com a finalidade de avaliar a morfologia da superfície e da estrutura interna dos filmes de quitosana, beta-quitina, e filmes compostos.

As amostras foram previamente secas em estufa a vácuo a 30 °C por seis horas, e aquelas utilizadas para captura das imagens da superfície dos filmes foram recobertas com fina camada de ouro (espessura $\approx$ 30 nm), e então colocadas sobre fita adesiva (dupla-face) de carbono e fixadas em porta-amostra de alumínio. Já o preparo das amostras para a captura das imagens da secção transversal dos filmes, incluiu a etapa de congelamento em nitrogênio líquido para permitir que o filme pudesse ser fraturado, e então foi recoberto com fina camada de ouro (espessura $\approx$ 30nm), colocado sobre fita adesiva (dupla-face) de carbono e fixado em porta-amostra transversal de alumínio.

O equipamento utilizado para a captura das imagens foi microscópio eletrônico de varredura digital LEO-440, nas condições de corrente e potência de feixe de elétrons de 0,75 mA e 15 kV, respectivamente e detector de elétrons secundário (S1)

3.5.3. Microscopia de Força Atômica (AFM)

A microscopia de força atômica foi utilizada para avaliar a topografia e rugosidade dos filmes de quitosana (Q), beta-quitina (BQ) e filmes compostos.

Pedaços de filmes de aproximadamente 4 cm² foram recortados e depositados sobre fita dupla-face fixada em porta-amostra. As análises dos filmes foram realizadas no equipamento Nanoman V da Veeco, com área de varredura de 5 μ m e compensação Z de 7,5 μ m. Foram utilizadas agulhas Veeco MSCT e RTESP e modo de operação intermitente.

3.5.4. Ângulo de Contato

Medidas de ângulos de contato, no modo da gota séssil, entre a superfície dos filmes e o solvente escolhido (água desionizada) foram realizadas com a finalidade de avaliar a superfície do material em relação à molhabilidade e hidrofobicidade.

Tiras retangulares dos filmes de quitosana (Q), beta-quitina (BQ) e de filmes compostos com aproximadamente 1 cm de largura por 5 cm de comprimento foram recortadas e depositadas em fita dupla-face fixada em porta-amostra. Gotas de água desionizada foram depositadas sobre a superfície horizontal das amostras fazendo uso de microseringa. A

medida dos ângulos de contato entre a gota e a superfície do material analisado (durante o tempo de “espalhamento” do líquido sobre a superfície da amostra) foi realizada no equipamento KSV Instruments CAM 101 Optical Contact Angle.

Após a deposição da gota (5 μL) de água desionizada sobre a amostra, o ângulo de contato foi medido durante um intervalo de 60 segundos. Cada amostra de filme teve duas tiras recortadas aleatoriamente e em cada tira foram realizadas 6 medidas independentes de ângulo de contato. Assim, os valores de ângulo de contato dos filmes analisados correspondem à média de 12 determinações independentes.

3.5.5. Termogravimetria (TG)

A termogravimetria foi utilizada com a finalidade de verificar a estabilidade térmica das amostras e identificar eventos decorrentes do aquecimento.

As análises termogravimétricas dos filmes de quitosana (Q), beta-quitina (BQ) e de filmes compostos foram realizadas no equipamento TGA-50 da Shimadzu. Aproximadamente 10,0 mg do filme foram depositados em porta-amostra de platina e a amostra foi analisada em atmosfera de nitrogênio (vazão = 50 mL min^{-1}), no intervalo de 20° a 800 °C com razão de aquecimento de 20 °C min^{-1} .

3.5.6. Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

A técnica de Calorimetria Exploratória Diferencial foi utilizada com a finalidade de detectar e mensurar quantitativamente eventos decorrentes do aquecimento da amostra.

O equipamento utilizado para a análise foi o calorímetro exploratório diferencial Shimadzu DSC-50, aproximadamente 5,0 mg de amostra foram depositados em porta amostra de alumínio e a amostra foi analisada em atmosfera de nitrogênio (vazão = 50 mL min^{-1}), no intervalo de 20° a 400 °C com razão de aquecimento de 20 °C min^{-1} .

4. Resultados e discussão

4.1. Caracterização Estrutural dos Biopolímeros

Identificação de grupos funcionais

Uma das mais importantes aplicações da Espectroscopia na Região do Infravermelho é a informação sobre a estrutura das moléculas investigadas. Ligações químicas, quando expostas a radiações eletromagnéticas, são capazes de absorver energia, cuja absorção ocorre em porções específicas do espectro eletromagnético, sendo característico de cada ligação e permitindo assim identificar a presença de grupos funcionais na estrutura molecular (PAVIA; LAMPMAN; KRIZ, 1979).

A partir da análise dos espectros da beta-quitina e do filme de beta-quitina (Figura 7), foi possível identificar os modos de vibração característicos das amostras, Tabela 2.

Tabela 2– Números de onda e atribuições de absorção na Região do Infravermelho de beta-quitina (BQ) e filme de beta-quitina (BQ_F).

Amostras		Atribuições
ν (cm ⁻¹)		
BQ	BQ _F	
3600-3000	3500-3000	Deformação axial de O-H e NH
2980-2800	2980-2800	Deformação axial de C-H
1660-1550	1660-1550	Deformação axial de C=O e deformação angular de N-H (bandas de amidas I e II)
1450-1375	1450-1375	Deformação angular de C-H
1350-1250	1325-1250	Deformação axial de C-N
1130-1000	1130-1000	Deformação axial de C-O

Figura 7 – Espectros na Região do Infravermelho das amostras de beta-quitina (BQ) e filme de beta-quitina (BQ_F).

É observada, na região onde ocorrem as bandas devidas às vibrações de deformação axial da ligação C=O ($\nu \cong 1660 \text{ cm}^{-1}$), uma banda de absorção, $\nu \cong 1666 \text{ cm}^{-1}$, característica da beta-quitina, a qual é atribuída aos grupos C=O envolvidos em ligações hidrogênio intermoleculares com grupos NH (CAMPANA-FILHO et al., 2007).

A análise dos espectros (Figura 7) e dos dados da Tabela 2 mostra que há grande coincidência de bandas, o que permite concluir que as amostras analisadas possuem os mesmos grupos funcionais. De fato, a principal diferença entre os espectros diz respeito à resolução, que é melhor no caso do espectro obtido a partir do filme BQ_F.

Sendo assim, pode ser concluído que o tratamento da suspensão de beta-quitina, visando à preparação do filme não provocou alterações estruturais no biopolímero, preservando assim os grupos funcionais típicos de beta-quitina.

Grau médio de acetilação e Viscosidade Intrínseca

No estudo de polímeros, informações sobre a microestrutura dos materiais são importantes, pois permitem estabelecer relações estrutura - propriedades. A técnica da espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio de alta resolução é versátil e confiável, por este motivo é aplicada para fornecer informações qualitativas e quantitativas sobre a estrutura estudada.

Os sinais característicos encontrados em espectros de quitina e quitosana são: i) em 2.0 – 2.1 ppm, correspondente aos hidrogênios metílicos presentes nos resíduos GlcNAc; ii) em 3.1 – 3.2 ppm, correspondente ao hidrogênio ligado ao carbono 2 dos anéis de glicopirranose; iii) em 3,5 – 4,0 ppm, correspondentes aos hidrogênios ligados aos carbonos 2 – 6 das unidades glicopiranosídicas; e iv) em 4,6 ppm e 4,8 ppm, respectivamente, correspondentes aos hidrogênios ligados aos carbonos anoméricos (C1) nas unidades GlcN e GlcNAc, respectivamente (KASAAI, 2010).

Os espectros das amostras BQ e BQ_F (não mostrado) são idênticos, evidenciando que o tratamento de ultrassom não provocou alterações estruturais em beta-quitina.

Figura 8 – Espectro de RMN de ¹H característico de beta-quitina (amostra BQ em DCl/D₂O 20%).

Figura 9 – Espectro de RMN de ^1H de quitosana (amostra Q em $\text{DCl}/\text{D}_2\text{O}$ 1%).

A comparação dos espectros de beta-quitina (Figura 8) e quitosana (Figura 9) revela a menor intensidade dos sinais registrados em 2,0 ppm, característico dos hidrogênios metílicos dos grupos acetamido, e em 4.6 ppm, característico do hidrogênio ligado a C1 em unidades GlcNAc, no espectro de quitosana, evidenciando a menor quantidade de unidades GlcNAc nesse último caso.

A partir da análise dos espectros de RMN ^1H das amostras de quitosana, beta-quitina e do filme de beta-quitina (BQ_F), o grau médio de acetilação ($\overline{\text{GA}}$) dos polissacarídeos foi determinado (Equação 4).

$$\text{GA}(\%) = \left(\frac{\frac{A_{\text{CH}_3}}{3}}{\frac{A_{\text{H}2-\text{H}6}}{6}} \right) \times 100 \quad (4)$$

sendo:

A_{CH_3} : Valor da integral referente ao sinal dos hidrogênios metílicos dos grupos acetamido ($\approx 2,1$ ppm)

$A_{H_{2-6}}$: Valor da integral referente à soma dos sinais dos hidrogênios ligados aos carbonos 2-6 do anel glicopiranosídico (3,9 – 3,0 ppm).

Quando se trata de solução de polieletrólitos, não havendo interações macromoleculares (sistema diluído) e quando existir a presença de sal em excesso, a viscosidade da solução pode ser descrita como função da viscosidade intrínseca do polímero e de sua concentração, e assim a relação de Huggins é aplicável (HUGGINS, 1942), Equação 5.

$$\frac{\eta_{sp}}{C} = [\eta] + k_H \cdot [\eta]^2 \cdot C \quad (5)$$

onde:

$\frac{\eta_{sp}}{C}$ = viscosidade reduzida (mL g^{-1});

$[\eta]$ = viscosidade intrínseca (mL g^{-1});

k_H = constante de Huggins;

C = concentração da solução (g mL^{-1}).

De acordo com a Equação 5, a viscosidade intrínseca ($[\eta]$) é determinada pela extrapolação da curva de viscosidade reduzida *versus* concentração à diluição infinita. A Figura 10 mostra a curva empregada para a determinação da viscosidade intrínseca da amostra de beta-quitina isolada a partir do filme BQF.

Figura 10 – Curva da viscosidade reduzida em função da concentração à diluição infinita da amostra BQ, a extrapolação da curva fornece a $[\eta]$.

A viscosidade assim determinada satisfaz a relação de Mark-Houwink (Equação 6) e, desta forma, a massa molar média viscosimétrica ($\overline{M}_v$) do polímero pode ser determinada.

$$[\eta] = K' \overline{M}_v^\alpha \quad (6)$$

Onde K' e α são constantes para um dado polímero, solvente e temperatura

As massas molares médias viscosimétricas das amostras analisadas foram determinadas pelo emprego da Equação 6, a partir dos valores de viscosidade intrínseca ($[\eta]$) das amostras e utilizando os valores das constantes de Mark-Houwink (α e K') propostos por Rinaudo e colaboradores, e de acordo com o valor de grau médio de acetilação ($\overline{GA}$) no caso da quitosana (RINAUDO et al., 1993; SIGNINI et. al., 1999). Valores das constantes empregados para a determinação de M_v de beta-quitina são aqueles descritos em Poirier e Charlet (2002).

Os dados encontrados ($\overline{GA}$ e $\overline{M}_v$) através das técnicas descritas anteriormente estão na Tabela 3.

Tabela 3 – Valores de grau médio de acetilação ($\overline{GA}$), viscosidade intrínseca $[\eta]$ e massa molar média viscosimétrica ($\overline{M}_v$) de quitosana, beta-quitina e filme de beta-quitina.

Amostra	$\overline{GA}$	$[\eta]$ (mL mg ⁻¹)	$\overline{M}_v$ (g mol ⁻¹)
Q	4,9%	2,069±0,047	619.504±19.159
BQ	79%	1,423±0,045	354.719±10.996
BQ_F	77%	1,206±0,038	298.020±8.647

Os valores de viscosidade intrínseca $[\eta]$, e consequentemente de massa molar viscosimétrica ($\overline{M}_v$), da amostra BQ_F são menores ($\approx 16\%$) do que aqueles da amostra BQ, indicando a ocorrência de despolimerização, o que pode ser atribuído à ação do ultrassom de alta intensidade. Por outro lado, considerando o erro intrínseco ($\approx 10\%$) da determinação de $\overline{GA}$ empregando espectroscopia RMN, os valores de grau de acetilação das amostras BQ e BQ_F são praticamente iguais, o que permite concluir que beta-quitina não sofreu desacetilação em decorrência do tratamento com ultrassom.

4.2. Análise morfológica e topográfica dos filmes

Os filmes de beta-quitina, quitosana e filmes compostos foram avaliados quanto à microestrutura por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Microscopia de Força Atômica (AFM).

A primeira técnica (MEV) é amplamente utilizada, pois possui grande profundidade de foco permitindo observar detalhes estruturais na escala micrométrica e nanométrica. Seu princípio é a irradiação de um fino feixe de elétron sobre a área do material analisado, o resultado da interação elétrons-superfície da amostra (elétrons secundários, elétrons retro espalhados, raios X característicos, etc) é captado e produz informações sobre topografia da superfície e composição do material analisado.

A técnica AFM tem como princípio a medida de forças ou interações em escala atômica, entre uma ponteira e a superfície da amostra, cuja aplicação se estende a uma gama

de materiais. A detecção da superfície realiza-se visando à criação de sua imagem, permitindo ao analista saber sobre a topografia e rugosidade do material.

As imagens das superfícies dos filmes de beta-quitina (BQ_F), quitosana (Q_F) e filmes compostos, podem ser observadas na Figura 11.

É observado que o filme contendo apenas beta-quitina (Figuras 11 (A) e (A')) apresenta superfície com aspecto heterogêneo e rugoso ($RMS = 225 \text{ nm}$), enquanto a superfície do filme contendo apenas quitosana (Figuras 11 (B) e (B')) apresenta a maior homogeneidade e a menor rugosidade média quadrática ($RMS = 21 \text{ nm}$).

Os filmes compostos $BQ/Q_{20/80}$ (Figuras 11 (C) e (C')), $BQ/Q_{50/50}$, (Figuras 11 (D) e (D')), e $BQ/Q_{80/20}$, (Figuras 11 (E) e (E')), os quais contêm quantidades progressivamente maiores de beta-quitina, aparentam menor homogeneidade e evidente aumento da rugosidade. A avaliação objetiva da rugosidade média quadrática dos filmes em função da composição das suspensões a partir das quais foram preparados é discutida a partir da análise de Microscopia de Força Atômica (AFM), mas as análises de MEV permitem concluir que a composição dos filmes, ou seja, a quantidade relativa de beta-quitina e quitosana, afeta fortemente a morfologia superficial, resultando em menor homogeneidade e maior rugosidade quanto maior a quantidade de beta-quitina.

Figura 11 – Imagens (A) e (A’): superfícies do filme de beta-quitina (BQ_F) por MEV e AFM respectivamente. Imagens (B) e (B’): superfícies do filme de quitosana (Q_F) por MEV e AFM respectivamente. Imagens (C, D e E) e (C’, D’ e E’): superfícies dos filmes compostos.

De fato, a imagem mostrada na Figura 11 (A), referente ao filme BQ_F, sugere que este seja constituído por aglomerados de partículas de dimensões variáveis caracterizando a rugosidade da superfície, Figura 11 (A'). Os demais filmes, nos quais o teor de beta-quitina é gradativamente diminuído, são aparentemente menos rugosos, devido, provavelmente, à presença de número progressivamente menor de aglomerados de partículas de beta-quitina.

Uma explicação plausível para a morfologia observada nas análises de MEV se baseia no fato de que a beta-quitina é insolúvel no meio aquoso no qual se encontra suspenso (HU et al., 2007) e, assim, a irradiação de ultrassom, devido à ocorrência de cavitação, provoca a diminuição do tamanho médio das partículas de beta-quitina, resultando no aumento da área superficial e favorecendo o intumescimento das partículas, como reportado na literatura (ALMEIDA et al., 2010).

De fato, como consequência do fenômeno mencionado, a suspensão de beta-quitina irradiada com ultrassom de alta intensidade exibe notável estabilidade. Assim, a irradiação de ultrassom causa maior exposição das superfícies e a fragmentação das partículas, facilitando o seu intumescimento, e também gera cargas nestas superfícies, de maneira que a estabilização das suspensões irradiadas se deve provavelmente ao efeito eletrostérico devido à presença de cargas que se repelem, e do volume aumentado das partículas intumescidas, os quais dificultam a agregação das partículas (ALMEIDA et al., 2011).

Entretanto, após a transferência da suspensão para placa de Petri e, à medida que o solvente é eliminado por evaporação, levando finalmente à formação de um filme, a contração das partículas é favorecida bem como as interações interpartículas, resultando na formação de aglomerados (YUSOF et al., 2004). Assim, considerando a distribuição de tamanhos médios de partículas na suspensão (ALMEIDA et al., 2011), os aglomerados também apresentam dimensões variáveis e conferem rugosidade à superfície do filme contendo apenas beta-quitina, como evidenciado pelas análises de AFM. Todos os filmes que possuem beta-quitina em sua composição apresentaram morfologia granular e diferentes rugosidades superficiais de acordo com o teor de beta-quitina presente. O filme contendo apenas beta-quitina (BQ_F) apresenta superfície com distribuição granular heterogênea, o que resulta em áreas de relevo e também de depressão que podem ser observadas por toda a extensão analisada. Os filmes compostos (BQ/Q) apresentam áreas granulares em menor número quando comparados ao filme BQ_F, e também áreas menos rugosas, nas quais a ocorrência de relevos e depressões é menos evidente.

Por outro lado, os filmes que contêm quitosana foram obtidos a partir da solubilização do polímero em meio aquoso ligeiramente ácido ($\text{pH} \approx 4,5$), sendo que a concentração total de polímeros foi mantida idêntica àquela da suspensão que gerou o filme BQ_F, porém parte do material insolúvel (partículas de beta-quitina) foi substituído por quitosana. Assim nas suspensões que geraram os filmes compostos (beta-quitina/quitosana) havia menor teor de partículas insolúveis de beta-quitina e, portanto, os filmes resultantes também possuem menor quantidade de partículas, e também superfícies menos rugosas devido ao fato de se formarem aglomerados em menor número.

Além disso, a morfologia dos filmes contendo quitosana, principalmente a menor rugosidade aparente (Figura 11), resulta do fato que a quitosana exerce o papel de matriz polimérica no filme obtido por *casting*, enquanto as partículas de beta-quitina estão dispersas na dita matriz. Assim, a presença de quitosana em forma solúvel na suspensão de beta-quitina favorece a dispersão mais homogênea das partículas de beta-quitina nos filmes obtidos, desfavorecendo as interações interpartículas que podem resultar em agregação e, portanto, resulta em filmes mais homogêneos e menos rugosos. No caso do filme obtido a partir de solução aquosa de quitosana (Figuras 11 (B) e (B')) a superfície têm aparência homogênea e baixa rugosidade aparente, não sendo observados aglomerados, ao contrário dos outros, uma vez que não possui beta-quitina em sua composição. A explicação para este fato é a ótima interação entre as cadeias de quitosana e as moléculas do solvente na solução utilizada para a formação do filme.

Tais considerações são corroboradas pelas imagens de MEV das secções transversais dos filmes (Figura 12).

Figura 12 – Imagem da secção transversal dos filmes de beta-quitina (A), quitosana (B) e filmes Compostos (C) BQ₂₀/Q₈₀, (D) BQ₅₀/Q₅₀, (E) BQ₈₀/Q₂₀.

Com o acréscimo de quitosana nas suspensões a partir das quais os filmes compostos foram formados, a estruturação passa a ser lamelar, o que pode ser observado nas Figuras 12 (B), (C), (D) e (E).

As imagens das secções transversais dos filmes compostos (Figura 12 (C), (D) e (E)) sugerem que a formação dos filmes ocorreu com interposição de camadas formadas por

lamelas de quitosana e aglomerados de partículas de beta-quitina. Por outro lado, a imagem do filme contendo apenas beta-quitina (Figura 12 (A)) indica que sua formação se deu pela coalescência de aglomerados de partículas, enquanto a formação do filme composto exclusivamente por quitosana (Figura 12 (B)) se deu pela coalescência de lamelas de quitosana.

Tabela 4 - Medidas da espessura e da rugosidade média quadrática dos filmes BQ_F, Q_F, BQ₈₀/Q₂₀, BQ₅₀/Q₅₀ e BQ₂₀/Q₈₀.

Filme	RMS (nm)	Espessura (μm)
BQ _F	225,0	0,045 ± 0,006
BQ ₈₀ /Q ₂₀	191,0	0,040 ± 0,008
BQ ₅₀ /Q ₅₀	188,0	0,025 ± 0,006
BQ ₂₀ /Q ₈₀	138,5	0,020 ± 0,008
Q _F	21,6	0,013 ± 0,005

Os dados da Tabela 4 mostram que o filme mais rugoso é também o mais espesso, confirmando que na formação do filme BQ_F, tanto a maior quantidade de partículas de beta-quitina presente quanto à ausência da matriz formada por lamelas de quitosana (não adicionada), resultam em filme mais espesso. Os filmes com quantidades progressivamente maiores de quitosana são menos espessos, devido à deposição de partículas de beta-quitina (em quantidades progressivamente menores) na matriz formada por quitosana, onde se acredita que as ditas partículas sejam acomodadas e distribuídas com mais homogeneidade, quanto maior o teor de quitosana e menor a quantidade de beta-quitina.

4.3. Análise da hidrofilicidade dos filmes a partir da molhabilidade

A medida do ângulo de contato entre uma superfície sólida e um líquido depositado em sua superfície, é um dos métodos utilizados para estimar a tensão superficial sólido-líquido (γ_{sl}). Em uma situação ideal (Figura 13) onde a superfície se apresente quimicamente

homogênea, plana, rígida e livre de interações causadas por adsorção de líquido ou vapor, existirá um equilíbrio entre as tensões interfaciais designadas como sólido-líquido (γ_{sl}); líquido-vapor (γ_{lv}) e sólido-vapor (γ_{sv}), as quais estão relacionadas na equação de Young, Equação 7 (YILDIRIM et al., 1999; KWOK; NEUMANN, 1999)

Figura 13 – Demonstração esquemática das energias interfaciais e ângulo de contato entre uma gota e uma superfície sólida ideal.

(Fonte: KWOK; NEUMANN, 1999, Adaptada)

$$\gamma_{lv}\cos\theta_Y = \gamma_{sv} - \gamma_{sl} \quad (7)$$

onde:

θ_Y é o ângulo de contato medido (ângulo de contato de Young)

γ é a energia interfacial

Em situações reais, onde as superfícies apresentam desvios da condição ideal, pode haver alterações locais de energias superficiais proporcionando, assim, a obtenção de valores de ângulo de contato diferentes dos obtidos em condição de equilíbrio (ideal), em virtude da diferença na interação do solvente com a superfície, o que influencia a molhabilidade. Os dois principais fatores que causam o fenômeno anteriormente citado são: i) a não homogeneidade

topográfica, causada pela rugosidade do substrato ou porosidade superficial; e ii) a não homogeneidade química devido à presença de contaminantes, segregação e inclusões na superfície do sólido (LUZ et al., 2008)

A medida do ângulo de contato é o resultado da interação entre o líquido e a camada mais superficial do material analisado. Os ângulos variam à medida que, de acordo com a interação existente entre as duas fases estudadas, o líquido se espalha no sólido molhando-o (MAHMOOD et al., 2009). Neste trabalho o emprego desta técnica possibilitou a avaliação da superfície dos filmes em relação à hidrofiliicidade e à caracterização topográfica.

Os valores dos ângulos de contato obtidos para cada gota depositada na amostra analisada foram plotados em gráfico a fim de representar a relação ângulo-tempo e a partir dos resultados obtidos foi possível traçar uma curva que representa a média de todas as medidas de uma dada amostra. Um perfil de como a curva representante da média de todas as medidas foi obtido é mostrado na Figura 14.

Figura 14 – Curvas relacionando ângulo de contato com o tempo de análise, para a amostra Q_F.

Beta-quitina e quitosana possuem grupos polares em suas cadeias poliméricas. A beta-quitina se apresenta particulada na estrutura do filme, cuja formação é devida à grande interação entre grupos polares presentes nas cadeias poliméricas deste polissacarídeo, o que proporciona a esse material a tendência à coalescência, e que sugere restringir sua participação em interações entre amostra e superfície. Já a quitosana, quando em meio ácido como é o caso da solução que forma o filme Q_F e também os filmes compostos (BQ₈₀/Q₂₀,

BQ₅₀/Q₅₀ e BQ₂₀/Q₈₀), possui grupos amino protonados ($-\text{NH}_3^+$) em sua estrutura, o que gera cargas ao longo das cadeias poliméricas, promovendo a repulsão entre elas e desfavorecendo a coalescência.

Como resultados das diferentes características dos polissacarídeos, anteriormente mencionadas, acredita-se, analisando os resultados das medidas dos ângulos de contato entre a água e a superfície dos filmes, que as interações a partir de ligações hidrogênio entre a superfície das amostras e a água, existentes em maior intensidade nos filmes contendo quitosana, promovam o espalhamento do líquido mais apreciavelmente do que quando se avalia as interações existentes entre água e filmes contendo beta-quitina, como se observa nos resultados expressos na Figura 15 e na Tabela 5.

Figura 15 – Gráfico dos valores médios dos ângulos de contato em relação ao tempo dos filmes BQ_F, BQ₂₀/Q₈₀, BQ₅₀/Q₅₀, BQ₈₀/Q₂₀ e Q_F.

Os filmes, em geral, iniciam a medidas com ângulos de maior valor, os quais diminuem gradativamente com o passar do tempo. Este comportamento sugere que há interação entre a superfície dos filmes e a água, pois com o decorrer do tempo, a gota se espalha e o ângulo de contato medido diminui. É observado que, para todos os filmes, exceto para o filme Q_F, $\Delta\theta$ em função do tempo não foi superior a 10° e, é notado também, que não houve mudança brusca dentro da faixa de variação (Tabela 5).

Sugere-se, portanto, que não existam poros na superfície dos filmes, uma vez que a presença destes causaria a absorção do líquido, e uma variação brusca no ângulo medido em um curto intervalo de tempo.

Tabela 5 – Valores médios de ângulos de contato dos filmes de beta-quitina (BQ), quitosana (Q) e compósitos (BQ/Q), medidos ao longo de 60 segundos.

Filme	$\theta_1^{(a)}$	$\theta_{30}^{(b)}$	$\theta_{60}^{(c)}$
BQ_F	89,34 ± 2,76	86,51 ± 1,76	84,69 ± 1,61
BQ₂₀/Q₈₀	95,60 ± 5,91	89,88 ± 5,19	87,53 ± 5,34
BQ₅₀/Q₅₀	103,73 ± 2,02	100,20 ± 3,43	95,61 ± 5,91
BQ₈₀/Q₂₀	104,10 ± 2,32	99,63 ± 1,37	95,24 ± 2,71
Q_F	101,72 ± 3,47	84,34 ± 3,53	75,42 ± 4,59

Sendo (a) o ângulo medido no tempo 1 segundo, (b) o ângulo medido no tempo 30 segundos e (c) o ângulo medido no tempo 60 segundos.

O comportamento do filme BQ_F, o qual exibe pequena variação nos valores dos ângulos medidos no intervalo de 60 s ($\Delta\theta \approx 5^\circ$) permite concluir que este é menos hidrofílico quando comparado aos filmes que possuem quitosana em suas composições. Este resultado corrobora com a natureza do material, uma vez que a beta-quitina por ser um polissacarídeo semicristalino possui solubilidade desprezível em água (MAHMOOD et al., 2009). Com o aumento do teor de quitosana na composição do filme a variação do ângulo de contato também se tornou mais importante, o que foi observado para os filmes BQ₂₀/Q₈₀, BQ₅₀/Q₅₀ e BQ₈₀/Q₂₀, pois nesses casos $\Delta\theta \approx 10^\circ$. É notado que o filme Q_F, o qual possui apenas quitosana é o que apresenta maior variação ($\Delta\theta \approx 25^\circ$), em concordância com dados encontrados na literatura (KUREK et al., 2014).

Além das diferentes composições químicas dos filmes, suas diferentes morfologias superficiais, principalmente no que diz respeito à rugosidade, também influenciam no comportamento da molhabilidade das superfícies das amostras analisadas.

De fato a rugosidade do filme BQ_F, o qual possui maior rugosidade média quadrática (RMS = 225 nm), influenciou no espalhamento da água sobre a superfície da amostra, uma vez que pela hidrofobicidade já conhecida da beta-quitina era esperado, com base na literatura (MAHMOOD et al., 2009), que os ângulos iniciais fossem maiores do que aqueles obtidos na análise, indicando o não espalhamento e, conseqüentemente, a não interação entre superfície e o líquido. Foi observado, porém (Tabela 5), que o filme BQ_F apresentou o menor valor de θ_{1s} , e apresentou também a menor $\Delta\theta$ quando comparado com os outros filmes, os quais sem exceção têm quitosana na composição. Foi concluído, portanto, que a topografia rugosa da amostra BQ_F contribuiu para um espalhamento inicial da gota maior do que o associado à hidrofobicidade da beta-quitina, em virtude de a superfície não ser plana. Assim foi observado o espalhamento do líquido até que fosse atingido o limite de movimento causado pela heterogeneidade do substrato e, após este momento o líquido não se espalha mais, não havendo mudança significativa do ângulo medido.

4.4. Análises Térmicas

A análise térmica é definida como “um grupo de técnicas por meio das quais uma propriedade física de uma substância e/ou de seus produtos de reação é medida em função da temperatura, enquanto essa substância é submetida a uma programação controlada de temperatura e sob uma atmosfera especificada”. (CANEVAROLO, 2003)

A utilização da Termogravimetria está relacionada principalmente à avaliação da estabilidade térmica da amostra, dos compostos intermediários e do produto final, analisados. É possível realizar análises qualitativas e quantitativas, como estabelecer a temperatura ou faixa de temperatura em que fenômenos como a vaporização, decomposição e oxidação ocorrem e quantificar a massa correspondente a cada evento térmico.

Na curva TG típica de beta-quitina em forma de pó (Figura 16 (A)) é mostrado o tratamento que permite a determinação das temperaturas inicial (T_i) e final (T_f) de um dado evento de degradação térmica, enquanto a correspondente curva DTG (Figura 16 (B)) foi empregada para a determinação da temperatura de máxima degradação ($T_{m\acute{a}x}$).

Figura 16 – Curvas TG (A) e DTG (B) típicas de beta-quitina em forma de pó.

As curvas termogravimétricas das amostras estudadas neste trabalho (Figura 17) podem ser divididas em dois estágios principais, sendo que no primeiro estágio (25° - 100 °C) ocorre a eliminação de água fracamente ligada ao material, e no segundo estágio, que se inicia aproximadamente em 200° C, os eventos observados correspondem a reações de decomposição (térmica e/ou oxidativa), vaporização e eliminação de produtos voláteis (NETO

C. G. T. et al). Um terceiro estágio ($>400^{\circ}\text{C}$) pode ser observado, o qual corresponde à degradação dos produtos do estágio anterior de decomposição térmica dos materiais analisados.

De acordo com a literatura, a pirólise de polissacarídeos se inicia através de quebras aleatórias das ligações glicosídicas, sendo seguida de decomposição adicional, e levando à formação de ácido acético, ácido butírico, e ácidos não graxos, nos quais os carbonos C2, C3 e C6 são predominantes. Assim, em temperaturas superiores a faixa de temperatura correspondente ao 1º estágio do aquecimento ($25^{\circ}\text{C} - 100^{\circ}\text{C}$), ocorrem reações que envolvem a perda de grupos acetila e, provavelmente, também a quebra das ligações glicosídicas.

Figura 17 – Curvas TG/DTG de beta-quitina e quitosana na forma de pó, dos filmes BQ_F, Q_F e filmes compostos (BQ₈₀/Q₂₀, BQ₅₀/Q₅₀, BQ₂₀/Q₈₀).

A partir da análise das curvas termogravimétricas (Figura 17), que geraram os dados da Tabela 6 foi observado que o teor de umidade das amostras BQ (10%) e Q (9%) são semelhantes, enquanto os valores de temperatura inicial de decomposição e temperatura de máxima decomposição são maiores para BQ (292 °C e 341 °C) em comparação a Q (241 °C e 283 °C), assim como a porcentagem de perda de massa (BQ = 59% e Q = 45%) referente ao 2º estágio da análise. Tais diferenças no comportamento térmico de beta-quitina e quitosana são atribuídas à quantidade expressivamente maior de unidades GlcNAc em BQ (GA=79%) em comparação a Q (GA=4,9%), que resulta em maior estabilidade térmica da beta-quitina e também à perda de maior quantidade de fragmentos voláteis, como ácido acético e ácido butírico. (BRITTO; CAMPANA FILHO, 2007)

Também, de acordo com a literatura (DELEZUK, 2009), beta-quitina apresenta maior cristalinidade que quitosana e o grau de ordem do material e a estabilidade térmica estão correlacionados, pois a energia adquirida pelas moléculas possibilita o rompimento das ligações intermoleculares e consequentemente os movimentos das cadeias poliméricas. Entretanto, polímeros com baixo grau de ordenação, isto é baixo grau de cristalinidade, possuem tendência ao enovelamento, o que limita a movimentação macromolecular e também a dissipação de energia térmica, culminando em rompimentos de ligações em temperaturas mais baixas (FIAMINGO, 2011).

Tabela 6 – Valores de temperatura inicial (T_i), final (T_f) e de máxima degradação ($T_{máx}$), porcentagem de perdas de massa referentes ao 1º e 2º estágio de aquecimento das amostras de beta-quitina e quitosana em forma de pó (BQ e Q), em forma de filme (BQ_F e Q_F) e filmes compostos (BQ₈₀/Q₂₀, BQ₅₀/Q₅₀, BQ₂₀/Q₈₀).

Amostra	Perda de massa			Perda de massa	
	1º estágio (25-100 °C) (%)	T_i (°C)	$T_{máx}$ (°C)	T_f (°C)	2º estágio ($T_f - T_i$ °C) (%)
BQ	10	292	341	367	59
Q	09	241	283	317	45
BQ_F	13	267	365	397	49
BQ₈₀/Q₂₀	14	236	254	385	42
BQ₅₀/Q₅₀	15	236	250	351	38
BQ₂₀/Q₈₀	19	234	251	305	35
Q_F	19	234	251	291	33

A partir da análise dos valores de $T_{\text{máx}}$ (Tabela 6) relativos aos filmes BQ_F e Q_F em comparação com aqueles relativos à beta-quitina e quitosana na forma de pó, é observado que em ambos os casos ocorre queda da estabilidade térmica, o que pode ser atribuído ao fato que os filmes apresentam ordenação significativamente menor.

Nos casos dos filmes compostos (BQ_{80}/Q_{20} , BQ_{50}/Q_{50} , BQ_{20}/Q_{80}) é observado que à medida que o teor de quitosana é aumentado, a temperatura inicial de decomposição e a perda de massa no segundo estágio de decomposição diminuem (Tabela 6), sendo que $T_{\text{máx}}$ atinge valor constante a partir da composição correspondente a 20% de quitosana (Figura 18).

Figura 18 – Temperatura de máxima decomposição ($T_{\text{máx}}/^{\circ}\text{C}$) versus teor (%) de beta-quitina nos filmes $BQ_F, Q_F, BQ_{80}/Q_{20}, BQ_{50}/Q_{50}, BQ_{20}/Q_{80}$.

De acordo com o que foi discutido na análise morfológica e topográfica dos filmes (item 5.2), a formação dos filmes compostos a partir do *casting* se dá pela interposição de lamelas formadas por cadeias de quitosana e aglomerados de beta-quitina, o que deixa as superfícies das partículas de beta-quitina menos acessíveis a se decompor. E desta forma, com menos volatilização de fragmentos oriundos das unidades GlcNAc a porcentagem de perda de massa referente a este estágio é diminuída, indicando que quantidade menor de produto de decomposição polimérica se deve a restrição de mobilidades das cadeias.

Também foi observado (Figura 17 e Tabela 6) que os teores de umidade dos filmes compostos são, maiores, quanto maior for a quantidade de quitosana ($BQ_{20}/Q_{80} = 19\%$ e $Q_F = 19\%$) em comparação com os filmes que contém maior quantidade de beta-quitina na composição ($BQ_F = 13\%$ e $BQ_{80}/Q_{20} = 14\%$), o que corrobora com a análise de molhabilidade (medidas de ângulo de contato, item 5.3), pois filmes contendo maior quantidade de quitosana apresentaram maior hidrofiliabilidade que os filmes contendo maior quantidade de beta-quitina, o que possibilita maior adsorção de moléculas de água por este material. Além disso, a acessibilidade de água é maior nos filmes com maiores teores de quitosana, pois nesses casos o grau de ordenação, i. e. cristalinidade, é menor visto que beta-quitina apresenta cristalinidade maior do que quitosana.

Em contrapartida a perda de massa referente ao 2º estágio é menor para os filmes BQ_{20}/Q_{80} e Q_F (Tabela 6) em comparação com os filmes BQ_F e BQ_{80}/Q_{20} . A explicação para este comportamento está relacionada à menor quantidade de unidades GlcNAc presentes nas cadeias poliméricas de quitosana, que gera menor quantidade de resíduos voláteis no 2º estágio do aquecimento. O comportamento oposto é observado para as amostras BQ_F e BQ_{80}/Q_{20} , os quais exibem maior perda de massa referente ao 2º estágio do aquecimento, enquanto o filme BQ_{50}/Q_{50} , o qual possui teores iguais de beta-quitina e quitosana, apresenta propriedades intermediárias.

A Calorimetria Exploratória Diferencial foi utilizada para identificar eventos endotérmicos e/ou exotérmicos, além de permitir calcular as energias envolvidas nestes eventos, entretanto no presente trabalho somente a energia envolvida no processo de eliminação de água foi calculada, como mostrado na Figura 19, correspondente à curva DSC típica de beta-quitina.

Figura 19 – Cálculo da área do pico correspondente à eliminação de água em uma curva DSC típica de beta-quitina.

Nas curvas DSC das amostras analisadas (Figura 20 e Figura 21) são observados dois eventos endotérmicos, sendo que o primeiro corresponde à eliminação da água fracamente ligada ao material, ocorre em temperatura inferior a 140 °C, enquanto o segundo, que corresponde a sinal mais alargado no caso de beta-quitina quando comparado aos filmes compostos e ao filme de quitosana, ocorre quando a temperatura é superior a aproximadamente 240⁰C, e corresponde à degradação das cadeias poliméricas. Também é nitidamente observado em todos os casos, exceto em beta-quitina, evento exotérmico no intervalo 220 °C – 260 °C que não está associado a perdas de massa, conforme as curvas TG/DTG (Figura 16). Nesse caso é observado que o teor de beta-quitina na composição do filme afeta tanto a forma do pico como sua localização, sendo que o filme BQ_F (100% beta-quitina) apresenta o pico menos definido e que ocorre em maior temperatura (≈252⁰C), enquanto na curva DSC do filme Q_F (100% quitosana) ocorre em temperatura inferior (≈224⁰C), e aqueles correspondentes aos filmes compostos ocorrem no intervalo 225 °C – 245 °C. Considerando que não foi observada perda de massa significativa no intervalo de

temperatura no qual foi observado o evento exotérmico, este pode estar associado ao rearranjo das cadeias poliméricas e moléculas remanescentes de água, com o estabelecimento de novas interações intermoleculares.

No sentido de compreender como a composição dos filmes afeta as interações entre as cadeias poliméricas e as moléculas de água, ênfase é dada na discussão que se segue aos dados relacionados à temperatura e energia relativas ao processo de eliminação de água (Tabela 7).

Tabela 7 – Energia absorvida pelas amostras BQ e Q (amostra na forma de pó) e BQ_F, Q_F, BQ₈₀/Q₂₀, BQ₅₀/Q₅₀ e BQ₂₀/Q₈₀ (filmes), referente ao primeiro estágio de aquecimento.

Amostra	T(°C) ^(a)	Energia absorvida (J.g⁻¹) ^(b)
Água	99	226,0
BQ	≈ 96	571,8
Q	≈ 93	422,4
BQ_F	≈ 124	1668,0
Q_F	≈ 136	1587,9
BQ₂₀/Q₈₀	≈ 133	1227,8
BQ₅₀/Q₅₀	≈ 135	2014,6
BQ₈₀/Q₂₀	≈ 128	2559,1

a)temperaturas determinadas nos pontos de mínimo dos picos endotérmicos no intervalo 90°C – 140°C.

b)energias calculadas tomando como referência a água pura.

A energia absorvida durante a eliminação de água da amostra BQ foi 571,8 J g⁻¹ e da amostra Q foi 422,4 J g⁻¹, aproximadamente o dobro da energia de vaporização da água pura a 99 °C, que é 226,0 J g⁻¹. Visto que neste último caso trata-se da energia necessária para que sejam vencidas as interações existentes apenas entre moléculas de água, é possível concluir que as interações entre os grupos polares (-OH, -HNC(O)CH₃, -NH₂) presentes nas cadeias de beta-quitina e quitosana e as moléculas de água presentes na estrutura dos polímeros são mais numerosas e intensas. (NIETO; PENICHE-COVAS, 1990).

Figura 20 – Curvas DSC das amostras BQ (beta-quitina na forma de pó) e Q (quitosana na forma de pó), e dos filmes BQ_F (filme composto apenas por beta-quitina) e Q_F (filme composto apenas por quitosana).

Entretanto, a energia envolvida na eliminação de água é maior no caso da amostra BQ do que da amostra Q (Tabela 7), o que pode ser atribuído à maior quantidade de unidades GlcNAc na beta-quitina do que na quitosana. De fato, os grupos acetamido presentes nestas unidades são fortemente polares e interagem intensamente com moléculas de água, necessitando, portanto, de grande quantidade de energia para que essas moléculas de água se libertem do arranjo em que se encontram e ocorra a vaporização.

É também notada pequena diferença na posição dos picos relativos à eliminação da água das amostras BQ e Q (Tabela 7), porém nos casos dos filmes, independentemente de suas composições, as temperaturas são muito superiores ($>120^{\circ}\text{C}$), revelando a ocorrência de interações mais fortes nesses casos, o que também se reflete em maiores valores da energia associada à eliminação de água a partir dos filmes. Assim, os filmes apresentaram picos no intervalo $120^{\circ}\text{C} - 140^{\circ}\text{C}$ e as energias absorvidas no processo de vaporização de água dos filmes Q_F, BQ₂₀/Q₈₀, BQ₅₀/Q₅₀, BQ₈₀/Q₂₀ e BQ_F foram de $1587,9 \text{ J g}^{-1}$, $1227,8 \text{ J g}^{-1}$, $2014,6 \text{ J g}^{-1}$ e $2559,1 \text{ J g}^{-1}$ e $1668,0 \text{ J g}^{-1}$, respectivamente.

Figura 21 – Curvas DSC dos filmes BQ_F e Q_F, e dos filmes compostos (BQ₈₀/Q₂₀, BQ₅₀/Q₅₀, BQ₂₀/Q₈₀).

Além disso, é também observado que os valores de energia de vaporização de água a partir dos filmes compostos que contêm maior quantidade de beta-quitina (BQ₅₀/Q₅₀ e BQ₈₀/Q₂₀) são maiores quando comparados àqueles que contêm maior presença de quitosana (BQ₂₀/Q₈₀).

Uma possível explicação para estes comportamentos, no caso da comparação da amostra BQ_F com a amostra BQ, é a ação do ultrassom de alta intensidade sobre a beta-quitina em suspensão aquosa, que resulta na estabilização da suspensão como consequência da redução do tamanho médio das partículas, aumentando a área superficial e a capacidade de intumescimento. Assim, o teor de água do filme BQ_F é 30% superior àquele da beta-quitina em forma de pó (Tabela 6), *i. e.* que não foi submetida à sonicação, evidenciando a maior acessibilidade devido ao tratamento de ultrassom. Em relação aos filmes compostos, é proposto que o maior teor de quitosana, contribui para aumentar o teor de umidade desses materiais como consequência do fato de se tratar de materiais de baixa cristalinidade em comparação com beta-quitina. Por outro lado, as variações de temperatura e energia associadas à eliminação de água dos filmes compostos sugerem que interações específicas envolvendo as partículas de beta-quitina e cadeias de quitosana afetam as interações do material com as moléculas de

água. Assim, no caso do filme BQ₂₀/Q₈₀, no qual há excesso de quitosana na composição, a possibilidade das cadeias de quitosana recobrirem as partículas de beta-quitina pode explicar a menor energia envolvida na eliminação de água, pois se trataria principalmente de moléculas exteriores às partículas. Entretanto, nos filmes com maiores teores de beta-quitina (BQ₅₀/Q₅₀ e BQ₈₀/Q₂₀) o recobrimento das partículas seria muito menos completo e as maiores energias associadas à eliminação de água seriam decorrentes de interações mais numerosas e intensas com os grupos acetamido de beta-quitina.

5. Conclusões

Suspensões aquosas estáveis de beta-quitina foram obtidas com êxito a partir do emprego do ultrassom de alta intensidade, a partir das quais foram produzidos filmes autossustentáveis. O *casting* da suspensão de beta-quitina, e o da solução de quitosana originou o filme BQ_F e o filme Q_F, respectivamente, enquanto que o *casting* de misturas em diferentes proporções de suspensão de beta-quitina e de solução de quitosana produziu os filmes compostos BQ₈₀/Q₂₀, BQ₅₀/Q₅₀ e BQ₂₀/Q₈₀, com êxito.

Os efeitos da utilização do ultrassom de alta intensidade sobre beta-quitina foram avaliados através das análises de espectroscopia na região do infravermelho, espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio e viscosimetria capilar, cujos resultados revelaram ocorrer discreta despolimerização, enquanto que a estrutura química e o grau médio de acetilação não sofreram modificações.

Todos os filmes que possuíam beta-quitina em sua composição apresentaram morfologia granular e diferentes rugosidades superficiais de acordo com o teor de beta-quitina presente em relação ao teor de quitosana. A morfologia mais intensamente granular foi exibida pelos filmes com maior quantidade de beta-quitina, assim, os filmes que tiveram tais características minimizadas foram aqueles que possuíam maiores teores de quitosana.

De fato a variação dos teores de beta-quitina e quitosana nas composições dos filmes afetou fortemente suas formações estruturais. Ficou evidenciado nas análises de MEV das secções transversais dos filmes que, no *casting* das suspensões de beta-quitina, ocorre formação de partículas insolúveis, e que o *casting* das soluções de quitosana se dá pela formação de lamelas, por outro lado, a formação dos filmes compostos acontece pela interposição de ambas, lamelas e partículas. Portanto o maior teor de um ou de outro polissacarídeo no material imprimiu suas características de formação, corroborando com os resultados vistos nas análises de AFM, onde ficou claro que filmes com maiores teores de beta-quitina possuem maior rugosidade média quadrática que aqueles com maiores teores de quitosana.

Na avaliação da hidrofobicidade, os filmes contendo maiores teores de quitosana foram aqueles que se apresentaram menos hidrofóbicos, concordando com resultados encontrados na literatura. A natureza hidrofóbica de quitina, independente da forma

alomórfica já é conhecida, e ficou evidenciada pelos resultados das medidas de ângulos de contato entre água desionizada e a superfície dos filmes, que mostrou maiores ângulos de contato para os filmes compostos BQ₅₀/Q₅₀ e BQ₈₀/Q₂₀.

A maior estabilidade térmica de beta-quitina em relação à quitosana, assim como a maior porcentagem de perda de massa referente a decomposição polimérica estão relacionadas à presença de unidades GlcNAc, em maior quantidade no caso de beta-quitina. Tais características são influenciadas pela forma do material e, assim, os filmes apresentaram menor estabilidade térmica que os polissacarídeos na forma de pó. Devido a maior amorficidade e maior hidrofilicidade da quitosana os filmes BQ₂₀/Q₈₀ e Q_F apresentaram os maiores teores de umidade, em contrapartida produziram menor massa de resíduos voláteis correspondentes à primeira etapa da decomposição polimérica, por possuírem menor número de unidades GlcNAc. A presença de tais unidades é responsável por interações mais intensas entre o polímero e moléculas de água, conclusão obtida através das análises de calorimetria exploratória diferencial, que revelaram que as amostras contendo maiores quantidades de beta-quitina possuíam temperaturas de vaporização superiores a 100 °C e necessitaram de maiores quantidades de energia para eliminar a massa de água fracamente ligada em sua estrutura.

6. Perspectivas para trabalho futuro

Avaliação dos efeitos da irradiação do ultrassom sobre as suspensões de beta-quitina em termos do tamanho médio e carga das partículas.

Avaliação dos efeitos de composição dos filmes compostos, empregando quitosana com diferentes características, como grau de acetilação e massa molar média, sobre suas propriedades.

Caracterização de propriedades mecânicas dos filmes

Avaliação de atividade biológica dos filmes, principalmente citotoxicidade e a atividade antimicrobiana.

7. Referências

AGULLÓ, E.; PENICHE, C.; TAPIA, C.; HERAS, Á.; ROMÁN, J. S.; ARGÜLLES, W.; GOYCOOLEA, F.; MAYORGA, A.; NAKAMATSU, J.; ABRAM, A. P. **Quitina Quitosano**: obtención, caracterización y aplicaciones. Perú: Pontificia Universidad Católica Del Perú/ Fondo Editorial, 2004. 312 p.

ALMEIDA, E. V. R. ; CAMPANA FILHO, S. P. Nanoparticles Via the High Intensity Ultrasound Irradiation of Aqueous Suspensions of Chitin. In: XII INTERNATIONAL MACROMOLECULAR COLLOQUIUM, 12; INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON NATURAL POLYMERS AND COMPOSITES, 7., 2010, Gramado. **Livro de resumos...** Rio Grande do Sul, 2010. p. 1200-1201.

ALMEIDA, E. V. R. ; MARIANO, M. S. ; CAMPANA-FILHO, S. P. Nanoparticles and films from ultrasound-processed. In: INTERNATIONAL CONFERENCE OF THE EUROPEAN CHITIN SOCIETY, 10., 2011, Saint-Petersburg. **Livro de Resumos...** European Chitin Society, 2011. v. 1. p. 70.

BATTISTI, M. V.; CAMPANA FILHO, S. P.. Obtenção e caracterização de alfa-quitina e quitosanas de cascas de *Macrobrachium rosenbergii*. **Química Nova**, v. 31, p. 2014-2019, 2008.

BRITTO, D.; CAMPANA FILHO, S. P. Kinetics of the thermal degradation of chitosan. **Thermochimica Acta**, v. 465, p. 73-82, 2007.

BRUGNEROTTO, J.; LIZARDI, J.; GOYCOOLEA, F. M.; ARGÜELLES-MONAL, W.; DESBRIEÁRES, J.; RINAUDO, M. An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization. **Polymer**, v. 42, p. 3569-3580, 2001.

CAMPANA, S. P. F.; DOMARD, A. J. R.; CARDOSO, M. B.; DELEZUK, J. A. M. **Processo para preparação de quitosana por meio de desacetilação de quitina**. BR n. PI0901825-5A2, 04 maio 2009.

CANEVAROLO, S. V. **Técnicas de caracterização de polímeros**. São Carlos: Artliber, 2003. p. 117-144 .

CARDOSO, M. B. **Estudo dos efeitos da irradiação de quitina com ultrassom sobre sua desacetilação**. 2003. 53f. Dissertação (Mestrado em Físico-química) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2003.

CARDOSO, M. B. **Contribuição ao estudo da reação de desacetilação de quitina: Estudos da desacetilação assistida por ultrassom de alta potência.** 2008. 103f. Tese (Doutorado em Físico-química) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2008.

CHAUSSARD, G.; DOMARD, A. New aspects of the extraction of chitin from squid pens. **Biomacromolecules**, p. 559-564, 2004.

CHENG-HO, C.; WANG, F. Y.; MAOA, C. F.; LIAO, W. T.; HSIEH, C. D. Studies of chitosan: II Preparation and characterization of chitosan/poly(vinyl alcohol)/gelatin ternary blend films. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 43, p. 37-42, 2008.

GILDBERG, A.; STENBERG, E. A new process for advanced utilisation of shrimp waste. **Process Biochemistry**, v. 36, p. 809-812, 2001.

DELEZUK, J. A. M. **Desacetilação de beta-quitina assistida por ultra-som de alta intensidade: estudo dos efeitos da amplitude e do tempo de irradiação e da temperatura da reação.** 2009. 97f. Dissertação (Mestrado em Físico-química) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2009.

FAN, Y.; SAITO, T.; ISOGAI, A. Preparation of chitin nanofibers from squid pen β -chitin by simple mechanical treatment under acid conditions. **Biomacromolecules**, v. 9, p. 1919-1923, 2008.

FIAMINGO, A. **Membranas porosas de N,O-carboximetilquitosana/quitosana para aplicação na prevenção de adesões pericárdicas pós-cirúrgicas.** 2011. 141f. Dissertação (Mestrado em Físico-química) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2011.

GOODRICH, J. D.; WINTER, W. T. α -Chitin Nanocrystals Prepared from Shrimp Shells and Their Specific Surface Area Measurement. **Biomacromolecules**, v. 8 p. 252-257, 2007.

HU, X.; DU, Y.; TANG, Y.; WANG, Q.; FENG, T.; YANG, J. ; KENNEDY, J. F. Solubility and property of chitin in NaOH/urea aqueous solution. **Carbohydrate Polymers**, v. 70, p. 451-458, 2007.

HUGGINS, M. L. Theory of solutions of high polymers. **Journal of the American Chemical Society**, v. 64, p. 1712-1719, 1942.

KARDOS, N.; LUCHE, J.-L. Sonochemistry of carbohydrate compounds. **Carbohydrate Research**, v. 332, p. 115-131, 2001.

KASAAI, M. R. Determination of the degree of N-acetylation for chitin and chitosan by various NMR spectroscopy techniques: A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 79, p. 801–810, 2010.

KUMIRSKA, J.; CZERWICKA, M.; KACZYŃSKI, Z.; BYCHOWSKA, A.; BRZOZOWSKI, K.; THÖMING, J.; STEPNOWSKI, P. Application of spectroscopic methods for structural analysis of chitin and chitosan. **Marine Drugs**, v. 8, p. 1567-1636, 2010.

KUREK, M.; GALUS, S.; DEBEAUFORT, F. Surface, mechanical and barrier properties of bio-based composite films based on chitosan and whey protein. **Food Packaging and Shelflife**, v.1, p. 56-67, 2014.

KURITA, K.; NISHIMURA, S. I.; ISHII, S.; TOMITA, K.; TADA, T.; SHIMODA, K. Characteristic properties of squid chitin. In: BRINE, C. J.; SANDFORD, P. A.; ZIKAKIS, J. P. (Ed.). **Advances in chitin and chitosan**. London: Elsevier Applied Science, 1992. p. 188-195.

KURITA, K. Chitin and chitosan: functional biopolymers from marine crustaceans. **Marine Biotechnology**, v. 3, p. 203-223, 2006.

KWOK D,Y.; NEUMANN, A.W. Contact angle measurement and contact angle interpretation. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 81, p. 167-249, 1999.

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

LI, Q.; DUNN, E.T.; GRANDMAISON, E.W.; GOOSEN, M.F.A. Applications and properties of chitosan. **Journal of Bioactive and Compatible Polymers**, v. 7, p. 370-397, 1992.

LUZ, A. P.; RIBEIRO, S.; PANDOLFELLI, V. C. Artigo revisão: Uso da molhabilidade na investigação do comportamento de corrosão de materiais refratários. **Cerâmica**, v. 54, p. 174-183, 2008.

MASON, T.J. A general introduction to sonochemistry. In: MASON, T. J. (Ed.). **Sonochemistry: the uses of ultrasound in chemistry**. London: The Royal Society of Chemistry, 1990. p. 1-18.

MASON, T.J. Ultrasound in synthetic organic chemistry. **Chemical Society Reviews**, v. 26, p. 443-451, 1997.

NETO C.G.T.; GIACOMETTI J.A.; JOB A.E.; FERREIRA F.C.; FONSECA J. L. C.; PEREIRA M. R. Thermal Analysis of Chitosan Based Networks. **Carbohydrate Polymers**, v. 62, p. 97-103, 2005.

NIETO J. M.; PENICHE-COVAS C.; PADRON G. Characterization of chitosan by pyrolysis-mass spectrometry, thermal analysis and differential scanning calorimetry. **Thermochimica Acta**, v. 176, p. 63-68, 1991.

NO, H. K.; MEYERS, S. P. Preparation of chitin and chitosan. In: MUZZARELLI, R. A. A.; PETER, M. G. (Ed.). **Chitin handbook**. Grottammare: European Chitin Society, 1997. p. 475-489.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S. **Introduction to spectroscopy**. New York: Saunders College, 1979. 513 p.

PETER, M.G. Applications and environmental aspects of chitin and chitosan. **Journal of Macromolecular Science - Pure & Applied Chemistry**, v. A32, p. 629-640, 1995.

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

POIRIER, M.; CHARLET, G. Chitin fractionation and characterization in N,N-dimethylacetamide/lithium chloride solvent system. **Carbohydrate Polymers**, v. 50, p. 363-370, 2002.

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

RINAUDO, M.; MILAS, M.; LÊ DUNG, P. Characterization of chitosan influence of ionic strength and degree of acetylation on chain expansion. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.15, p.281-285, 1993.

ROBERTS, G. A. F. **Chitin chemistry**. London: Mc Millan, 1992. 350 p.
SIGNINI, R. **Estudos das relações estruturas/propriedades de quitina e quitosana**. 2002. 168 f. Tese (Doutorado em Físico-Química) - Departamento de Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2002.

SIGNINI, R.; CAMPANA FILHO, S. P. On the preparation and characterization of chitosan hydrochloride. **Polymer Bulletin**, v. 42, p. 159-166, 1999. Disponível em: <<http://springerlink.metapress.com/content/u99yf9ycqpcb3y2/fulltext.pdf>>. Acesso em: 20 fev. 2014.

SUSLICK, K.S.; HAMMERTON, D.A.; CLINE JUNIOR, R.E. The sonochemical hot spot. **Journal of the American Chemical Society**, v. 108, p. 5641-5642, 1986.

ZHANG, Y.; XUE, C.; XUE, Y.; GAO, R.; ZHANG, X. Determination of the degree of deacetylation of chitin and chitosan by X-ray powder diffraction . **Carbohydrate Research**, v. 340, p. 1914-1917, 2005.

ZIA, K. M.; BARIKANI, M.; KHALID, A. M.; HONARKAR, H.; EHSAN-UL-HAQ. Surface characteristics of UV-irradiated chitin-based polyurethane elastomers. **Carbohydrate Polymers**, v. 77, p. 621-627, 2009.

YUSOF, N. L. B. M.; LIMB, L. Y.; KHORA, E. Flexible chitin films: structural studies. **Carbohydrate Research**, v. 339, p. 2701-2711, 2004.

YILDIRIM ERBIL, H.; MCHALE, G.; ROWAN, S. M.; NEWTON, M. I. Determination of the receding contact angle of sessile drops on polymer surfaces by evaporation. **Langmuir**, v.15, p. 7378-7385, 1999.