



**Carla Alexandra Nunes de Sousa Santos** **Propriedades de Filmes de Quitosano – Influência do grau de acetilação e da massa molecular do biopolímero**



**Carla Alexandra Nunes de Sousa Santos** **Propriedades de Filmes de Quitosano – Influência do grau de acetilação e da massa molecular do biopolímero**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de mestre em Química e Qualidade dos Alimentos, realizada sobre a orientação do Doutor José António Lopes da Silva, Professor Auxiliar, e da Doutora Ivonne Delgadillo Giraldo, Professora Associada com Agregação, ambos do Departamento de Química

## **o júri**

presidente

Doutora Ivonne Delgadillo Giraldo  
Professora Associada com Agregação da Universidade de Aveiro (Co-Orientadora)

Doutora Cristina Luísa Miranda Silva  
Professora Auxiliar da Universidade Católica Portuguesa

Doutora Ana Margarida Viegas de Barros Timmons  
Professora Auxiliar da Universidade de Aveiro

Doutor José António Teixeira Lopes da Silva  
Professor Auxiliar da Universidade de Aveiro (Orientador)

## **agradecimentos**

O meu agradecimento ao Doutor José António Lopes da Silva, orientador deste trabalho pelo seu apoio e pela disponibilidade que revelou para a discussão e esclarecimento de dúvidas. E por toda a compreensão que demonstrou na resolução de problemas.

À Doutora Ivonne Delgadillo, co-orientadora deste trabalho pelo seu apoio, assim como pelas críticas construtivas que elaborou durante a realização deste trabalho.

Às minhas colegas de laboratório, Sónia Regina Monteiro, Cláudia Tavares, Sónia Carneiro pelo seu apoio, disponibilidade, carinho e confiança.

Às demais, Andreia Dias, Cláudia Almeida, Dulce Helena, Isabel Correia, Cláudia Nunes pelo vosso apoio, amizade e incentivo.

Ao Nuno Almeida pelo seu apoio incondicional, imensa paciência, carinho, entusiasmo e compreensão que sempre me transmitiu.

Aos meus Pais e Irmãos (*Rui e André*) por todo o apoio, paciência, compreensão e confiança que sempre demonstraram.

## Palavras-chave

Quitosano, filmes, grau de acetilação, massa molecular, pota

## resumo

As características estruturais do quitosano dependem de diversos factores, incluindo a origem da quitina de onde é obtido e o método utilizado para essa obtenção. O objectivo deste trabalho foi estudar a influência de duas características estruturais do quitosano, o grau de acetilação e a massa molecular, consideradas como as mais importantes para as propriedades filmogénicas deste biopolímero. Neste trabalho extraiu-se quitina a partir de estiletos de pota (*Illex argentinus*) sob condições alcalinas. O quitosano foi preparado por desacetilação da quitina num rácio 1:20 (m/v) em 40% NaOH sobre atmosfera de azoto usando diferentes tempos de reacção. Quitosanos com diferentes massas moleculares (Mv; 1512-14.04 kDa) foram produzidos por reacção com ácido nitroso, usando diferentes concentrações do agente oxidante. Os quitosanos obtidos foram analisados por FT-IR, raios-X e RMN-<sup>13</sup>C. O estudo do comportamento reológico e da solubilidade dos diferentes quitosanos foi realizado em dois solventes diferentes: ácido acético 0.1 mol/L e ácido acético 0.5 mol/L/ cloreto de sódio 0.25 mol/L. Os resultados obtidos mostram que o GA e a Mv influenciam as propriedades dos quitosanos em solução.

Prepararam-se filmes de quitosano, com diferentes graus de acetilação e diferentes massas moleculares, por evaporação do solvente (ácido acético 0.1 mol/L) e neutralização com solução diluída de NaOH. Estudaram-se diferentes propriedades dos filmes assim obtidos, incluindo a morfologia, propriedades mecânicas, grau de inchamento, permeabilidade ao vapor de água e opacidade.

Os resultados obtidos mostram que as diferentes características do quitosano influenciaram as propriedades dos filmes. A capacidade do filme para se deformar (% de alongação) aumentou à medida que decresce o grau de acetilação. A permeabilidade ao vapor de água e o grau de inchamento aumentam à medida que o grau de acetilação aumenta. A massa molecular, na gama analisada, influencia significativamente o módulo de Young e a alongação das membranas, diminuindo à medida que diminui a massa molecular. A absorção de água e a permeabilidade ao vapor de água aumentam à medida que aumenta a massa molecular. Os valores de permeabilidade obtidos revelam que os filmes de quitosano transmitem moderadamente o vapor de água, quando comparados com polímeros sintéticos e com filmes de proteínas.

**Key -words**

Chitosan, membranes, degree of acetylation, molecular weight, shortfin squid

**abstract**

The structural characteristics of chitosan depend on several factors such as the origin from where the chitin is extracted and the extraction methods. The main objective of this work was to study the influence of two structural characteristics of chitosan: the degree of acetylation (DA) and the molecular weight (Mw), considered the most important for the filmogenic properties of this biopolymer. In this work the chitin was extracted from shortfin squid pens (*Illex argentinus*) under alkaline conditions. The chitosan was prepared by deacetylation of chitin in a ratio of 1:20 (w/v) in 40% NaOH, under nitrogen atmosphere, using different reaction times. Chitosans with different molecular weight (MW) were produced by reaction with nitrous acid, using different concentrations of this agent. The chitosans were analyzed by FT-IR, <sup>13</sup>C-NMR and X-ray diffraction. The solubility and the rheological properties of the different chitosans were evaluated in two different solvents: acetic acid 0.1 mol/L and acetic acid 0.5 mol/L/sodium chloride 0.25 mol/L. The results show that the DA and the MW strongly influence the solution properties of the chitosan.

Chitosan films were prepared with different degrees of acetylation and different molecular weight by a casting technique using acetic acid (0.1 mol/L) as solvent and neutralizing with dilute NaOH. The properties of the films like the morphology, mechanical properties, swelling index, water vapor permeability (WVP) and opacity were studied. The results obtained show that all film properties were affected by the different chitosan characteristics. The acetylation of the amino group of the glucosamine units was found to have a significant influence on the tensile properties. The film's ability to stretch (% of elongation) increases as the degree of acetylation decreases. The WVP and the swelling index increases as the DA increases.

The MW, within the range analyzed, showed a significant influence on the Young's modulus and elongation of the membranes; the higher the molecular weight the higher was the elongation and the rigidity of the membranes (Young's modulus). The WVP and the swelling index were also affected by the MW; both properties increase as the MW increases. The values of WVP determined for the chitosan membranes show that they moderately transmit water vapor when compared to synthetic and proteins membranes.

## **Abreviaturas e Símbolos**

GA - Grau de acetilação

Mv - Massa molecular

$E_1$  e  $E_2$  - Componente módulo elástico

$t_1$  e  $t_2$  - Tempos de relaxação

$E_e$  - módulo de relaxação limite

$E(t)$  - módulo de tensão de relaxação

HR- Humidade relativa

QP- quitosano obtido a partir de quitina extraída de estiletos de pota

QSG- quitosano comercial da sigma

Qprim- quitosano comercial da primex

GD- Grau de desacetilação

LPDE- polietileno de baixa densidade

HPDE- polietileno de alta densidade

WPI- isolado de proteína de soro do leite

PVC- cloreto de polivinil

WVP- Permeabilidade ao vapor de água

**ÍNDICE**

JURI	III
AGRADECIMENTOS	IV
RESUMO	V
ABSTRACT	VI
ABREVIATURAS	VII

**OBJECTIVOS** **5****CAPITULO 1- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA** **7**

<b>1.1 QUITINA E QUITOSANO</b>	<b>7</b>
1.1.1 OCORRÊNCIA	7
1.1.2 IMPORTÂNCIA DO APROVEITAMENTO DOS SUBPRODUTOS DA INDÚSTRIA PESQUEIRA	8
1.1.3 APLICAÇÕES	9
<b>1.2 OBTENÇÃO DE QUITOSANO - DESACETILAÇÃO DA QUITINA</b>	<b>13</b>
1.2.1 CONDIÇÕES DA REACÇÃO	14
<b>1.3 CARACTERIZAÇÃO DA QUITINA/ QUITOSANO</b>	<b>16</b>
1.3.1 GRAU DE <i>N</i> -ACETILAÇÃO	16
1.3.2 CRISTALINIDADE	19
1.3.3 MASSA MOLECULAR	20
1.3.4 SOLUBILIDADE E PROPRIEDADES EM SOLUÇÃO	23
<b>1.4 FILMES E REVESTIMENTOS</b>	<b>26</b>
1.4.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS	26
1.4.2. PLASTIFICANTES	29
1.4.3 POTENCIALIDADES DO QUITOSANO COMO FILMES/REVESTIMENTOS	30
1.4.4 PROPRIEDADES DOS FILMES	32

**CAPITULO 2- MATERIAIS E MÉTODOS** **41**

<b>2.1 ESCOLHA DA FONTE</b>	<b>41</b>
<b>2.2 MATERIAIS</b>	<b>41</b>
2.2.1 OBTENÇÃO DE QUITINA A PARTIR DE ESTILETES	42
2.2.2 DESACETILAÇÃO DA QUITINA- OBTENÇÃO DE QUITOSANO	43



2.2.3	FRAGMENTAÇÃO OXIDATIVA - OBTENÇÃO DE QUITOSANOS COM DIFERENTES MASSAS MOLECULARES	44
<b>2.3</b>	<b>CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS</b>	<b>47</b>
2.3.1	CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA: HUMIDADE, PROTEÍNAS, CINZAS	47
2.3.2	ANÁLISE POR INFRAVERMELHO - DETERMINAÇÃO DO GRAU DE ACETILAÇÃO	47
2.3.3	DETERMINAÇÃO DA MASSA MOLECULAR	49
2.3.4	DETERMINAÇÃO DA SOLUBILIDADE DAS AMOSTRAS DE QUITOSANO	50
2.3.5	ANÁLISE REOLÓGICA	51
2.3.6	OUTRAS TÉCNICAS UTILIZADAS: DIFRAÇÃO DE RAIOS-X, RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE ESTADO SÓLIDO ( $^{13}\text{C}$ ), ANÁLISE ELEMENTAR	52
<b>2.4</b>	<b>PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES DE QUITOSANO</b>	<b>53</b>
2.4.1	PREPARAÇÃO DOS FILMES	53
2.4.2	ENSAIOS DE ABSORÇÃO (“SWELLING”)	54
2.4.3	ENSAIOS MECÂNICOS	54
2.4.4	DETERMINAÇÃO DA PERMEABILIDADE AO VAPOR DE ÁGUA (WVP)	56
2.4.5	OPACIDADE	59
<b><u>CAPITULO 3- RESULTADOS E DISCUSSÃO</u></b>		<b>61</b>
<b>3.1</b>	<b>CARACTERIZAÇÃO DA QUITINA</b>	<b>61</b>
3.1.1	CRISTALINIDADE	62
3.1.2	ANÁLISE POR INFRAVERMELHO E RMN DE ESTADO SÓLIDO ( $^{13}\text{C}$ )	64
3.1.3	GRAU DE ACETILAÇÃO	66
3.1.4	MASSA MOLECULAR	67
3.1.5	VISCOSIDADE	67
<b>3.2</b>	<b>OBTENÇÃO DE QUITOSANO</b>	<b>68</b>
3.1.6	ORDEM E VELOCIDADE DE DESACETILAÇÃO	72
3.1.7	TRATAMENTO ALCALINO VS MASSA MOLECULAR	76
<b>3.2</b>	<b>CARACTERIZAÇÃO DE QUITOSANOS</b>	<b>77</b>
3.2.1	CRISTALINIDADE	77
3.2.2	ANÁLISE DOS ESPECTROS DE IV	79
3.2.3	DESPOLIMERIZAÇÃO	81
3.2.4	SOLUBILIDADE DAS AMOSTRAS	83
<b>3.3</b>	<b>COMPORTAMENTO REOLÓGICO</b>	<b>86</b>
3.3.1	INFLUÊNCIA DO GRAU DE ACETILAÇÃO	86
3.3.2	INFLUÊNCIA DA MASSA MOLECULAR	90
<b>3.4</b>	<b>COMPORTAMENTO DOS FILMES</b>	<b>92</b>

3.4.1	OPACIDADE E ESPESSURA	93
3.4.2	ABSORÇÃO DE ÁGUA DESTILADA	94
3.4.3	ABSORÇÃO DE TAMPÃO ÁCIDO	97
3.4.4	COMPORTAMENTO MECÂNICO	99
3.4.5	COMPORTAMENTO VISCOELÁSTICO	104
3.4.6	PERMEABILIDADE AO VAPOR DE ÁGUA	107

**CAPÍTULO 4- CONCLUSÕES** **111**

**CAPÍTULO 5- BIBLIOGRAFIA** **115**



## OBJECTIVOS

Filmes e revestimentos edíveis possibilitam a extensão do tempo de prateleira e a melhoria da qualidade de produtos alimentares, funcionando como barreira à transferência de massa, suporte a determinados ingredientes e/ou melhorando a sua integridade mecânica. Filmes preparados com base em biopolímeros podem exibir diversas vantagens, entre as quais, o serem muitas vezes biodegradáveis e possuírem propriedades barreira, mecânicas e anti-microbianas satisfatórias. Filmes preparados com base em quitosano, demonstraram já inúmeras propriedades interessantes e com potencial utilização em diversas áreas, incluindo no revestimento de produtos alimentares (Baldwin *et al*, 1995; Shahidi *et al*, 1999; Agulló *et al*, 2003). No entanto, pouco é conhecido acerca da relação entre as propriedades moleculares e estruturais deste polissacarídeo e as propriedades dos filmes a partir dele preparados. O objectivo principal deste trabalho foi o estudo da influência do grau de acetilação e da massa molecular do quitosano sobre determinadas propriedades dos filmes obtidos a partir das diferentes amostras deste biopolímero. Especial relevo foi dado a quitosano obtido a partir de uma fonte relativamente nova de quitina – o endo-esqueleto de lulas e potas.



## CAPITULO 1- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1.1 Quitina e Quitosano

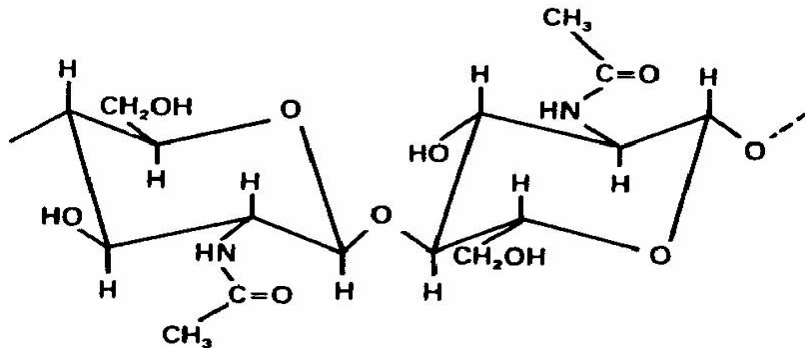
#### 1.1.1 Ocorrência

A quitina, poli[ $\beta$ -(1-4)-2-acetamida-2-deoxi-D-glucopirranose] (figura 1-1) é o componente orgânico mais abundante na estrutura esquelética de muitas das classes que formam o grupo dos invertebrados, como por exemplo os artrópodes, os anelídeos e os moluscos. A quitina encontra-se também presente em fungos como os ascomicetos, zigomicetos, basidiomicetos e deuteromicetos e em algas como as diatomáceas. É a segunda substância orgânica mais abundante a seguir à celulose, actuando como material de suporte e defesa para os organismos que a possuem. A quitina associa-se de maneira diferente nas diversas matrizes onde se encontra. Nos insectos e nos crustáceos, por exemplo, encontra-se unida às proteínas. No caso dos fungos associa-se no solo com polissacarídeos, entre eles a celulose.

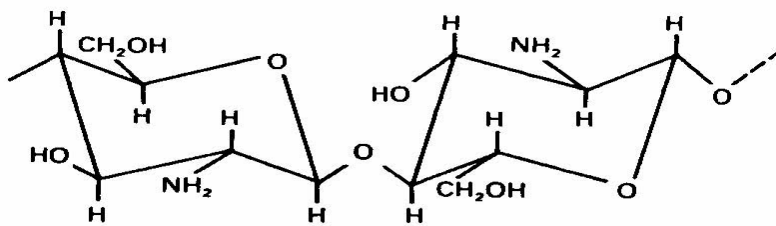
Devido à sua larga distribuição na natureza, são possíveis diferentes fontes para este biopolímero. No entanto, comercialmente é obtida essencialmente a partir de crustáceos (cascas de camarão, caranguejo, lagostins, etc.), dada a rentabilidade do processo, devido às largas quantidades disponíveis desta fonte, essencialmente subprodutos de indústrias de processamento alimentar. As cascas e crostas de crustáceos consistem principalmente em proteínas (30-40 %), carbonato e fosfatos de cálcio (30-50 %) e quitina (20-30 %). Estas proporções variam de espécie para espécie e com o período do ano de colheita (No e Meyers, 1995).

O quitosano (figura 1-2) é obtido a partir de quitina, correspondendo à forma desacetilada deste polissacarídeo. O método de preparação de quitina e quitosano varia com a fonte e origina diferenças na composição da amostra final obtida. Estudos com cascas de crustáceos mostraram claramente que as propriedades estruturais mais importantes destes produtos, i.e. massa molecular e grau de acetilação, variam com as diferentes condições de processamento, tais como, a concentração das soluções ácidas

ou básicas utilizadas, a temperatura de reacção e a presença ou não de oxigénio (Rege e Block, 1999).



**Figura 1-1** Estrutura da Quitina



**Figura 1-2** Estrutura do quitosano

### 1.1.2 Importância do Aproveitamento dos Subprodutos da Indústria Pesqueira

As quantidades crescentes de subprodutos da indústria pesqueira tais como cascas de crustáceos e de estiletos de lula tornaram-se uma preocupação uma vez que a sua biodegradação é muito lenta. As proteínas das conchas putrificam e os seus componentes enzimáticos ficam inactivos. Estes subprodutos podem servir como uma importante fonte para a produção de quitina, quitosano e de pigmentos carotenoides (Shahidi e Synowiecki, 1991). A produção global de cascas de camarão, lagostins, lagostas, caranguejos, ostras, etc., calculada em peso seco, está estimada em 1,44 milhões de toneladas (Knorr, 1991). Daí que a descoberta das inúmeras aplicações dos produtos extraídos a partir destes excedentes, em especial a quitina, tenha tido um impacto notável e, considerando ainda o facto da quitina e do quitosano serem

polímeros naturais, biodegradáveis, biocompatíveis e não tóxicos, o reaproveitamento destes subprodutos tornou-se imperativo.

### 1.1.3 Aplicações

O mercado da quitina e do quitosano tem evoluído rapidamente. Em 1990 a produção mundial anual era de cerca de 10 mil toneladas e a tendência era de uma contínua expansão principalmente à medida que se descobrem novas aplicações. Hoje em dia já se produzem cerca de 30 mil toneladas para ambos os polímeros e as regulamentações para o seu uso estendem-se a vários campos. A produção de quitosano a partir de crustáceos é economicamente rentável, especialmente se incluir a recuperação de carotenoides, para utilização, por exemplo, em aquacultura (No *et al* 1989; Kumar, 2000). Os dados disponíveis indicam que o quitosano é utilizado maioritariamente como suplemento alimentício e como agente floculante.

Actualmente, o mercado para produtos de quitosano inclui, entre outras, as áreas dos nutracêuticos, protecção de alimentos, formulações para cosméticos, aplicações médicas, aplicações em agricultura, floculação, têxteis e papel. De acordo com Kristbergson (2003) as proporções de participação no mercado são as seguintes:

- a) Nutracêuticos, 50%
- b) Aplicações como agente floculante, 17%
- c) Usos em alimentos, 10%
- d) Usos em cosméticos, 5%
- e) Agricultura, 5%
- f) E os restantes 13%, em têxteis, papel e artigos médicos

Dentro das aplicações como nutracêuticos destaca-se a importância destes produtos, derivados da glucosamina, como suplemento dietético considerado útil pela capacidade de reduzir a dor nas articulações, principalmente em doentes com artrites. O quitosano é também usado como suplemento alimentar para a redução de colesterol e de triglicéridos, devido à sua capacidade para se ligar a lípidos alimentares (Muzzarelli, 1997). Porém, a sua utilização tem também efeitos indesejáveis como a diminuição do nível de vitamina E no plasma, a redução do conteúdo em minerais nos ossos e um retardamento no crescimento.



Na agricultura a sua aplicação tem como principal objectivo o aumento do rendimento agronómico por intermédio de vários mecanismos. Foi demonstrado que sementes cobertas com soluções de quitosano melhoram a sua germinação e produzem elevados rendimentos de colheita. O quitosano permite ainda a protecção das sementes de danos mecânicos e do ataque de agentes patogénicos (Hirano, 1999; Cárdenas *et al*, 2004a).

Nos últimos anos, têm sido desenvolvidas aplicações biomédicas de quitinas e quitosanos. Isto deriva do facto de serem polímeros naturais, biodegradáveis e não tóxicos (Khor, 2002). Dentro das aplicações biomédicas destacam-se o revestimento de feridas actuando como barreira mecânica e como acelerador do processo de cicatrização, a produção de lentes de contacto (Kumar, 2000), membranas artificiais, libertação controlada de fármacos (Peniche *et al*, 2003), aplicações ortopédicas (Khor, 2002). Foi demonstrado ainda que o quitosano é um agente hemostático reduzindo consideravelmente o tempo de hemorragia (Rao e Sharma, 1997).

A quitina e o quitosano oferecem no campo alimentar uma vasta gama de aplicações incluindo bioconversão para a produção de produtos de valor adicional, preservação de alimentos da deterioração microbiana, formação de filmes biodegradáveis e clarificação e desacidificação de sumos de fruta. Os processos de deterioração como a oxidação enzimática e a auto-oxidação de lípidos, constituem uma das perdas mais importantes nos alimentos e resultam em prejuízos económicos. O quitosano pode actuar retardando estas reacções de oxidação enzimática e auto-oxidação de lípidos (Shahidi *et al*, 1999; Agullo *et al*, 2003; Thripathi e Dubey, 2004). Conforme será referido na secção 1.4.3 a aplicação de coberturas/películas de quitosanos a frutos demonstraram diversas vantagens, incluindo serem barreiras semi permeáveis ao oxigénio e ao dióxido de carbono, apresentarem propriedades antifúngicas, melhorando a qualidade e o tempo de vida útil dos frutos tratados (El-Gaouth *et al*, 1991; Zhang e Quantick, 1997; Romanazzi *et al*, 2002; Han *et al*, 2004).

A tabela 1-1 apresenta um resumo das diversas aplicações alimentares da quitina e do quitosano.

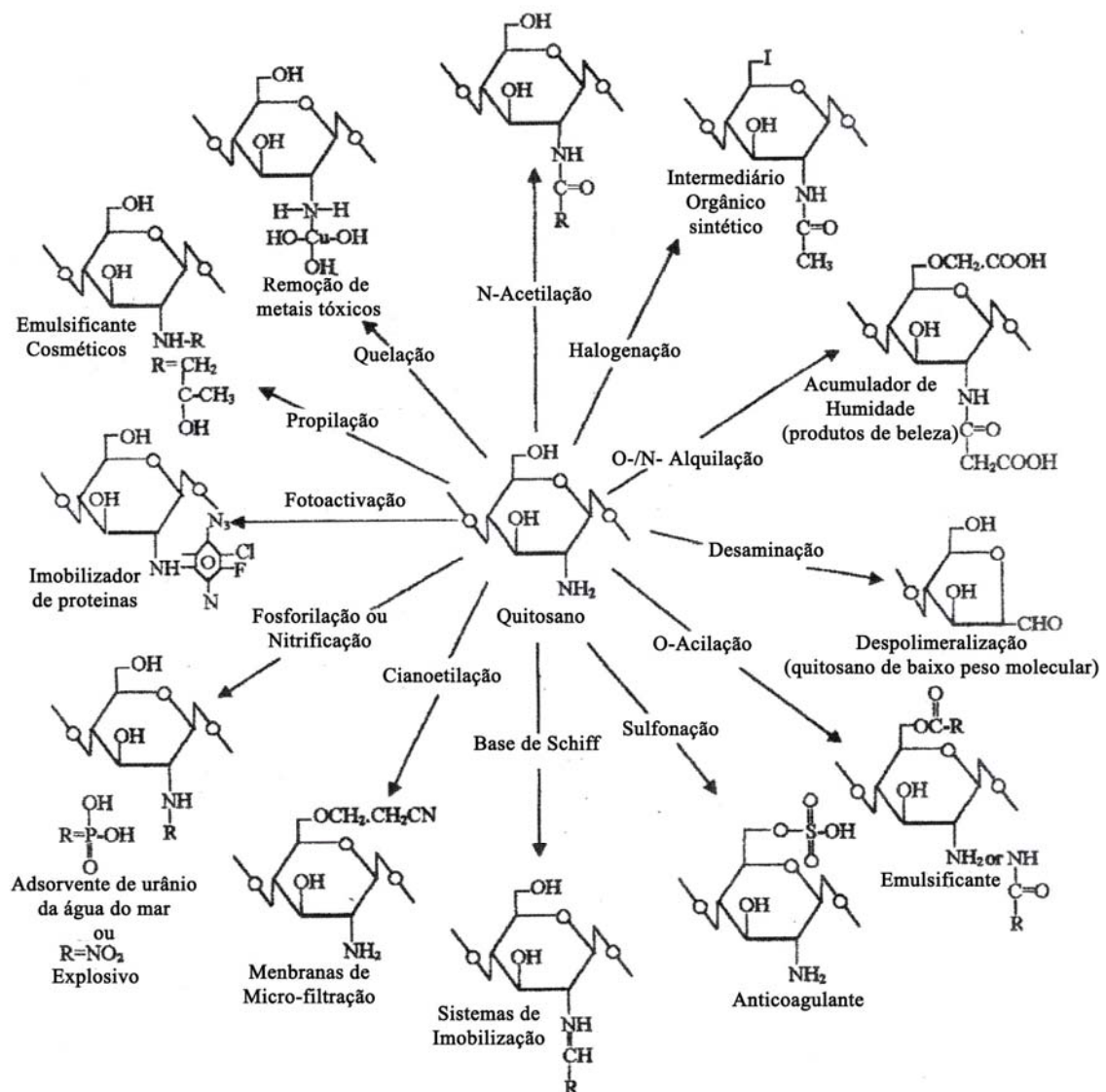
**Tabela 1-1** Aplicações da quitina, quitosano e derivados na indústria alimentar

Área de aplicação	Exemplos
Agente antimicrobiano	Bactericida, fungicida
Filmes edíveis	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Controlo de transferência de humidade, entre os alimentos e o ambiente envolvente.</li> <li>• Libertação controlada de: <ul style="list-style-type: none"> <li>- substâncias anti-microbianas</li> <li>- antioxidantes</li> <li>- nutrientes, aromas e drogas</li> </ul> </li> <li>• Redução da pressão parcial de oxigénio</li> <li>• Controlo da: <ul style="list-style-type: none"> <li>- taxa de respiração</li> <li>- temperatura</li> <li>- oxidação enzimática de frutos</li> </ul> </li> </ul>
Aditivo	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Clarificação e desacidificação de frutos e de bebidas</li> <li>• Intensificador do sabor</li> <li>• Controlador da textura</li> <li>• Agente emulsificante</li> <li>• Agente estabilizante de cor</li> </ul>
Qualidade nutricional	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fibra dietética</li> <li>• Efeito hipocolesterémico</li> <li>• Aditivo de comida para peixe</li> <li>• Redução da absorção de lípidos</li> <li>• Produção de SCP (<i>single cell protein</i>)</li> </ul>
Recuperação de materiais sólidos de águas residuais da indústria alimentar	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Floculante</li> <li>• Fraccionamento de agar</li> </ul>
Purificação de águas	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Recuperação de iões metálicos, pesticidas, fenóis</li> <li>• Remoção de corantes</li> </ul>
Outras aplicações	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Imobilização de enzimas</li> <li>• Encapsulação de nutracêuticos</li> </ul>

A maioria dos polissacarídeos que ocorrem naturalmente, p.ex. celulose, dextrana, pectina, agarose, carrageninas, são ácidos ou neutros em solução. Em contraste, a quitina e o quitosano são exemplos de polissacarídeos básicos. A presença de grupos amina e a possibilidade de se ionizarem positivamente são características importantes destes polissacarídeos.

Nos quitosanos o azoto encontra-se maioritariamente na forma de amina primária. Assim, as reacções do quitosano são reacções típicas de aminas, entre as quais, a reacção de *N*-acilação e a formação de bases de Schiff são as mais importantes (Kumar, 2000). Devido à sua elevada reactividade, é possível a obtenção de diversos derivados do quitosano, os quais podem apresentar propriedades vantajosas em diferentes aplicações.

Na figura 1-3 encontram-se representados alguns derivados de quitosanos e e suas principais aplicações.



**Figura 1-3** Derivados e aplicações de quitosanos (adaptado de Tharanathan e Kittur, 2003)

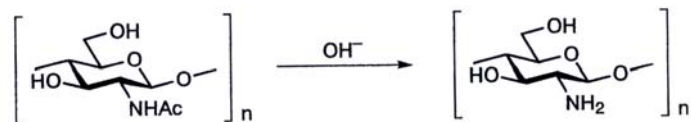
## 1.2 Obtenção de Quitosano - Desacetilação da Quitina

A principal reacção de derivatização da quitina é a hidrólise dos grupos acetilamida obtendo-se o quitosano (figura 1-4). A hidrólise ocorre em meios ácidos ou básicos, mas geralmente exclui-se a hidrólise ácida devido à susceptibilidade da degradação da quitina (hidrólise das ligações glicosídicas).

Esta reacção de desacetilação exige condições alcalinas fortes, devido essencialmente a três factores: 1) A baixa reactividade devido à configuração *trans* dos substituintes acetamida, respeitante ao grupo hidroxilo do anel piranosídico da unidade monomérica; 2) a presença de ligações de hidrogénio entre os grupos carbonilo e amida das cadeias adjacentes; e 3) ao empacotamento das cadeias na estrutura cristalina da quitina que não permite o acesso dos iões  $\text{HO}^-$ .

Normalmente é também necessário submeter as soluções alcalinas concentradas de quitina a temperaturas elevadas de forma a ocorrer a reacção de desacetilação em extensão conveniente. Sabe-se que a concentração de NaOH e a temperatura produzem um efeito significativo no grau de acetilação (Methacanon *et al*, 2003) e na massa molecular dos quitosanos obtidos (Tsaih e Chen, 2003a), enquanto a aplicação de forças mecânicas durante o processo parece não ter um efeito significativo (Rege e Block, 1999).

O critério utilizado para distinguir a quitina do quitosano é a solubilidade deste último em soluções ácidas diluídas. O quitosano não é, por isso, uma unidade química única e definida, mas sim uma família de polissacarídeos que variam entre si na sua composição e tamanho molecular.



**Figura 1-4** Reacção de desacetilação da quitina.

A conversão da quitina em quitosano pode realizar-se segundo duas metodologias distintas: desacetilação homogénea e desacetilação heterogénea. A desacetilação

termo-alcalina heterogénea, a temperaturas elevadas e curtos tempos, processa-se com a quitina sólida dispersa em meio alcalino e ocorre preferencialmente na região amorfa do polímero. Actualmente é este o tratamento mais usado à escala industrial.

A desacetilação homogénea começa primeiramente por um pré-tratamento de inchamento -“*pre-swelling*”- e a eventual dissolução completa da quitina a frio ( $\approx 0^{\circ}\text{C}$ ) mediante a utilização de uma relação de 1:10 (m/m) da quitina e de NaOH. A desacetilação ocorre depois à temperatura ambiente durante longos períodos de tempo. Assim, permite-se que a reacção não ocorra em determinados sítios da cadeia e que o ataque aos grupos amida seja mais uniforme.

A qualidade e as propriedades do quitosano final, tais como, pureza, viscosidade, grau de acetilação, massa molecular e estrutura polimorfa, podem variar grandemente dependendo das condições em que a reacção ocorre.

### 1.2.1 Condições da reacção

Independentemente da desacetilação se produzir sobre condições homogéneas ou heterogéneas a reacção implica sempre o uso de soluções alcalinas concentradas e de tempo e/ou temperatura de reacção relativamente elevados. Já foram propostos vários métodos para desacetilar a quitina, mas muitos produzem a extensiva degradação do polímero. Isto pode dever-se à utilização de ácidos, que para além de desacetilarem a quitina produzem também uma extensa degradação/hidrólise da cadeia do polímero, ou à presença de oxigénio no meio de reacção. Os grupos *N*-acetilo não devem por isso ser hidrolizados por reagentes ácidos. Para evitar a degradação/hidrólise das cadeias do polímero é comum realizar a reacção sob atmosfera de azoto (Kurita *et al*, 1993, Rege e Block, 1999) e/ou introduzir um agente redutor como o tiofenol (Domard e Rinaudo, 1983) ou o borohidreto de sódio (Rhazi *et al*, 2000).

Factores como a concentração do reagente alcalino, a temperatura, o tempo de reacção, tratamentos prévios da quitina e o tamanho das partículas, afectam a extensão da reacção (No e Meyers, 1995). Foram sugeridos tratamentos com soluções de hidróxido de sódio e de potássio concentradas (40- 50 %) geralmente a  $100^{\circ}\text{C}$  ou temperaturas mais elevadas para desacetilação da quitina, mas estas produzem despolimerização das cadeias do polímero. Na tabela 1-2 apresentam-se algumas das condições já descritas na literatura para obtenção de quitosano a partir da quitina

**Tabela 1-2** Condições de desacetilação de quitinas obtidas a partir de várias fontes

Fonte	Atmosfera	Agente alcalino	Temperatura	Tempo	Razão (m/V)	Referência
Cascas de camarão	azoto	NaOH 50%	140°C	9 horas	1:20	Tsaih e Chen, 2003a
Cascas de caranguejo	azoto	NaOH 50%	75°C	10 horas	1:3.2	Ottoy <i>et al</i> , 1998
Cascas de caranguejo	tiofenol + azoto	NaOH (40%-50%)	> 100°C	várias horas	---	Domard e Rinaudo, 1983
Estiletos de lula	--	NaOH 40%	80°C	várias horas	1:20	Kurita <i>et al</i> , 1993
Estiletos de lula	azoto	NaOH 50%	90°C	6 horas	---	Goycoolea <i>et al</i> , 1997
Cascas de caranguejo	azoto	NaOH 50 %	80°C	4-24h	---	Rege e Block, 1999
Cascas de camarão	ar	KOH 40% *	80°C	---	---	Brousignac, 1968
Estiletos de lula	azoto	NaOH 50%	60°C	---	1:15	Chamdupai <i>et al</i> , 2004

\* Em etanol (30 %, m/m) e monoetilenoglicol (30 %, m/m)

Tolaimate *et al* (2000) compararam o processo de desacetilação proposto por Kurita *et al* (1993) e o descrito por Brousignac (1968) e concluíram que o método proposto por Kurita *et al* (1993) é mais adequado para obter quitosano com elevada massa molecular e uma vasta gama de graus de acetilação. Com o método proposto por Brousignac é possível obter quitosanos com baixo grau de acetilação e massas moleculares mais baixas.

Cardoso *et al* (2001) testaram o efeito da sonicação em quitinas comerciais de caranguejo e concluíram que quando submetidas ao processo de desacetilação, as amostras submetidas ao tratamento de sonicação apresentaram-se mais desacetiladas

que as amostras originais de quitina, apesar de não existirem alterações no espectro de infravermelho, mostrando que o tratamento de sonicação activou a quitina para a reacção de desacetilação.

Goycoolea *et al* (1997) estudaram o efeito da radiação microondas na desacetilação de quitina com o intuito de reduzir os extensos tempos de reacção característicos das reacções mais usuais. Assim, estudaram as características físico-químicas de quitosanos obtidos a partir de três métodos diferentes: 1) Desacetilação heterogénea (NaOH 50 %, 90 °C, 6 horas, sob atmosfera de azoto); 2) desacetilação homogénea (NaOH 11 %, 0 °C, 25 °C, 77 h) e 3) um método alternativo, no qual o quitosano foi disperso em NaOH 30 % e sujeito a radiação microondas, aproximadamente 2.45 GHz, durante 22 minutos. Estes investigadores concluíram que a desacetilação pelo método alternativo produzia quitosanos mais desacetilados mas com menor massa molecular que os quitosanos obtidos pelos outros métodos.

### **1.3 Caracterização da quitina/ quitosano**

Determinadas características estruturais do quitosano e da quitina desempenham um papel determinante nas propriedades destes biopolímeros e nas suas potenciais aplicações, incluindo a solubilidade e as suas propriedades em solução, interacção com outros compostos e propriedades de formação de filmes e géis. Estas características incluem, entre outras, o grau de acetilação, a cristalinidade e a massa molecular.

#### **1.3.1 Grau de *N*-acetilação**

Apesar das designações químicas específicas, os nomes quitina e quitosano, correspondem a uma família de polímeros em que varia o conteúdo de grupos acetilo, sendo este quantificado pelo denominado grau de *N*-acetilação (GA). O grau de acetilação influencia grandemente o comportamento destes polímeros, nomeadamente a reactividade e a solubilidade (como já foi referido). A determinação do grau de

acetilação é uma das análises de rotina realizadas no controlo da produção de quitina e quitosano (Duarte *et al*, 2002).

Existem inúmeras técnicas para determinar o grau de acetilação. Duarte *et al* (2004) referiram cerca de 50 métodos diferentes publicados para esta determinação. Entre as diversas técnicas possíveis encontram-se a espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN),  $^1\text{H}$  de estado líquido (Rinaudo *et al*, 1992; Varum *et al*, 1991) e  $^{13}\text{C}$  (Raymond *et al*, 1993; Ebert e Fink, 1996; Heux *et al*, 2000) e  $^{15}\text{N}$  (Yu *et al*, 1999) de estado sólido, espectrofotometria do ultra violeta (Muzzarelli e Rocchetti, 1985; Pedroni *et al*, 2003), infravermelho (Miya, 1980; Baxter *et al*, 1992; Shigmasa *et al*, 1996; Brugnerotto *et al*, 2001; Duarte *et al*, 2002), incluindo infravermelho próximo (Rathke e Hudson, 1993), dicroísmo circular (Domard, 1987), cromatografia de permeação em gel com detecção por ultra-violeta (Aiba, 1986), cromatografia líquida de alta pressão (Niola *et al*, 1993), análise elementar (Roberts, 1992) e diversos métodos de titulação baseados nas propriedades ácido-base e polielectrolíticas destes polissacarídeos (Roberts, 1992; Raymond *et al*, 1993; Roberts, 1997). Muitos destes métodos apresentam algumas desvantagens, incluindo a duração da análise, o custo, a precisão reduzida, limitações quanto à gama de graus de acetilação onde é válida a sua utilização e/ou a necessidade de solubilização da amostra, o que nem sempre é possível.

As técnicas de RMN, de próton para amostras em solução e de carbono-13 (utilizando polarização cruzada no ângulo mágico ( $^{13}\text{C}$  CP/MAS)) para amostras sólidas, têm demonstrado ser aquelas mais exactas para a determinação do GA, sendo por isso consideradas técnicas absolutas de referência (Duarte *et al*, 2001; Heux *et al*, 2000).

Em amostras sólidas, a técnica mais utilizada para determinação do grau de acetilação tem sido a espectroscopia de infravermelho (IV). Esta técnica é adequada para análises de rotina uma vez que é rápida e de relativamente baixo custo, embora não permita a determinação directa do GA. O uso do IV para esta determinação requer a construção de uma recta de calibração a partir da razão de absorvâncias (A) de determinadas bandas características, uma banda de prova (BP) que muda de intensidade com o grau de acetilação e uma banda de referência (BR) que não muda de intensidade com o grau de acetilação, e de valores de GA determinados através de uma técnica absoluta. As absorvâncias das BP e BR são geralmente determinadas a



partir do método da linha de base. Diversas bandas de absorção, de prova e de referência, para determinação do GA foram já propostos na literatura (Miya *et al*, 1980; Baxter *et al*, 1992; Shigemasa *et al*, 1996; Duarte *et al*, 2002).

As bandas de IV características, mais frequentemente utilizadas para a determinação do GA para amostras de quitina e quitosano, estão resumidas na tabela 1-3 e estão assinaladas como bandas de referência ou bandas de prova.

**Tabela 1-3** - Bandas de absorvância em infravermelho e tipos de ligação para moléculas de quitina/quitosano

<b>Tipo de ligação</b>	<b>Banda (cm<sup>-1</sup>)</b>	<b>Tipo de banda</b>
Estiramento axial de O-H	3440 a 3480	Banda de referência
Estiramento de N-H	3269	Banda de prova
Estiramento axial de C=O de amida I	1661 a 1671	Banda de prova
Estiramento axial de C-H	2878	Banda de referência
Deformação angular de N-H amida de II	1561	Banda de prova
Deformação angular simétrica de CH <sub>3</sub>	1380 a 1383	Banda de prova
Deformação axial de -CN de grupos amino	1425	Banda de prova
Deformação axial de -CN de grupos amino	1308 a 1380	Banda de referência

📖 Adaptado de Duarte *et al* (2002), Santos *et al* (2003), Shigemasa *et al* (1996) e Miya *et al* (1980)

### 1.3.2 Cristalinidade

A estrutura da quitina tem sido extensivamente estudada por difracção de raios X. A cristalinidade deste biopolímero é importante para as funções que desempenha, nomeadamente como polissacarídeo estrutural nas espécies animais onde se encontra.

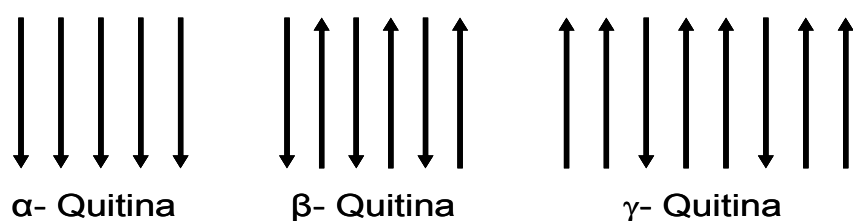
A quitina isolada a partir de diferentes fontes apresenta estruturas diferentes a nível de cristalinidade. Até hoje foram encontradas 3 formas polimórficas de  $\alpha$ -,  $\beta$ - e  $\gamma$ -quitina, as quais diferem entre si pela diferente disposição das cadeias, dentro das regiões cristalinas.

As quitinas extraídas a partir das cascas de caranguejos e camarões possuem estrutura  $\alpha$ , na qual as cadeias principais dispõem-se de forma anti-paralela, existindo fortes ligações intermoleculares de hidrogénio (figura 1-5 e 1-6) (Ottoy *et al*, 1996; Kittur *et al*, 2002). A sua estrutura altamente cristalina não permite a sua solubilização em solventes orgânicos, ácidos e/ou bases.

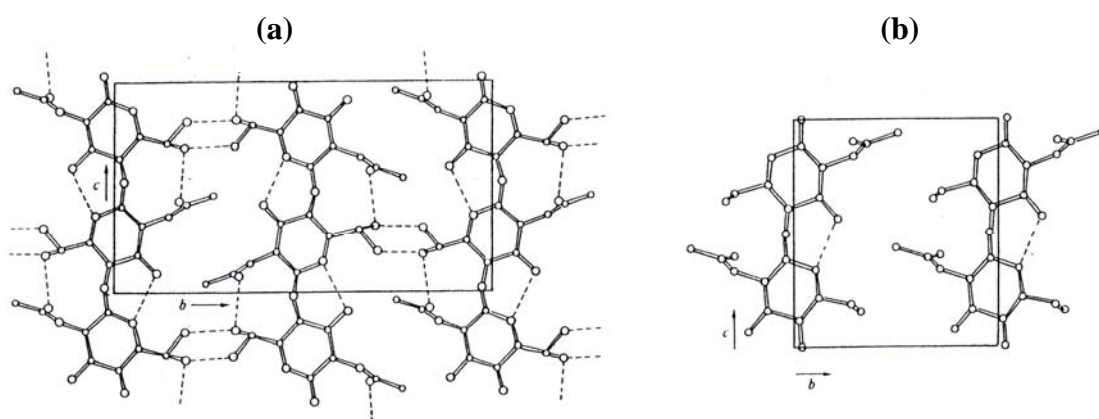
A  $\beta$ -quitina pode ser obtida a partir de estiletes de lula, onde as cadeias de quitina se dispõem de forma paralela, com forças intermoleculares mais fracas (Kurita *et al*, 1993) Pouca atenção tem sido dada à  $\beta$ -quitina, mas esta possui propriedades específicas que podem ser de grande interesse. Por exemplo, ao contrário da  $\alpha$ -quitina, a  $\beta$ -quitina é solúvel em ácido fórmico e em alguns ácidos minerais, apresenta uma maior afinidade para vários solventes e uma maior reactividade quando comparada com a  $\alpha$ -quitina (Austin *et al*, 1989)

A  $\gamma$ -quitina é a menos encontrada e considera-se ser uma mistura das outras duas formas existentes, possuindo o arranjo paralelo e o anti- paralelo (Kurita, 2001).

Rashidova *et al* (2004) estudaram a cristalinidade de quitinas obtidas a partir de três fontes distintas: crustáceos, fungos (*Pleurotus ostreatus*) e crisálida do bicho da seda (*Bombyx mori*). Concluíram que a quitina obtida a partir de crustáceos é altamente cristalina indicando uma estrutura altamente ordenada, enquanto que a quitina obtida a partir da crisálida do bicho da seda (*Bombyx mori*) é apenas moderadamente cristalina e a obtida a partir do fungo *Pleurotus ostreatus* apresenta uma cristalinidade muito baixa indicando uma estrutura pouco organizada.



**Figura 1-5** Orientação das cadeias poliméricas das diferentes quitinas



**Figura 1-6** Estrutura da  $\alpha$ ,  $\beta$ , -quitina, (a) e (b), respectivamente.

### 1.3.3 Massa molecular

A massa molecular ( $M_v$ ) da quitina e do quitosano é um factor importante na caracterização destes polímeros. No entanto, a determinação desta característica é dificultada pelo problema da solubilização da amostra e pela ambiguidade estrutural ligada à distribuição dos grupos acetilo (Muzzarelli, 1996). Existem vários métodos para determinar a massa molecular, entre eles, a viscosimetria, dispersão de luz e cromatografia de permeação de gel (GPC).

Quer a viscosimetria quer a GPC são de fácil utilização e custo relativamente baixo, os resultados obtidos estão empiricamente relacionados com a massa molecular, uma vez que dependem essencialmente do volume hidrodinâmico da macromolécula, sendo necessário uma calibração relativa a uma técnica absoluta.

As técnicas viscosimétricas baseiam-se na determinação da viscosidade intrínseca do polímero e na utilização da equação de Mark-Houwink, a qual relaciona a massa molecular com a viscosidade intrínseca (equação 1-1).

$$[\eta] = KM_v^a \quad \text{equação 1-1}$$

Nesta equação (equação 1-1),  $[\eta]$  é a viscosidade intrínseca da solução,  $K$  e  $a$  são constantes a determinada temperatura e para determinado sistema (polímero-solvente) e estão relacionadas com a conformação da macromolécula, e  $M_v$  é a massa molecular viscosimétrica.

Na tabela 1-4 apresentam-se alguns exemplos das constantes de Mark-Houwink obtidas para quitinas dissolvidas no solvente aprótico *N,N*-dimetilacetamida (DMAc) com cloreto de lítio. Na Tabela 1-5 encontram-se alguns exemplos dos solventes e respectivos parâmetros de Mark-Houwink encontrados na literatura para quitosanos.

A dispersão de luz é um método absoluto para determinar a massa molecular. Este método baseia-se no uso de múltiplos ângulos de luz que são difractados pela amostra. A determinação de  $M_v$  baseia-se no tratamento de gráficos de Zimm, criados a partir de múltiplas medições de múltiplas diluições (Chen e Tshai, 1998). Contaminações com pó ou mesmo a tendência para a agregação das moléculas de quitosano e quitina podem interferir na determinação.

**Tabela 1-4** Parâmetros da equação de Mark-Houwink para quitinas

Solvente	$a$	$K$ *	Referência
DMAc/LiCl (0.5%)	0,6	0,0183	Striegel e Timpa, 1995
DMAc/LiCl (5%)	0,95	$7,6 \times 10^{-5}$	Poirier e Charlet, 2002
DMAc/LiCl (5%)	0,88	$2,1 \times 10^{-4}$	Terbojevich e Cosani, 1997
DMAc/LiCl (5%)	0.69	$2.4 \times 10^{-3}$	Terbojevich <i>et al</i> , 1988

\* com  $[\eta]$  em dL/g

**Tabela 1-5** Parâmetros da equação de Mark-Houwink para quitosanos

Solvente	<i>a</i>	<i>K</i> *	Referência
AcOH (0.5M)/NaCl (0.25M)	0,657	2,14 x 10 <sup>-1</sup>	Rege e Block, 1999
AcOH(0.2M)/ NaOAc (0.1M)	0,81	1,680	Wang <i>et al</i> , 1991
AcOH(0.1M) /NaCl(0.2M)	0,93	0,181	Roberts e Domszy, 1982
AcOH(0.3M) /NaOAc (0.2M)	0,76	8,2-7,4	Rinaudo <i>et al</i> , 1993
AcOH (0.5M)/NaOAc (0.2M)	0,76	3,5 x 10 <sup>-4</sup>	Terbojevich <i>et al</i> , 1997

\* com  $[\eta]$  em dL/g

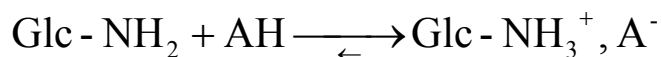
Muitas das propriedades funcionais do quitosano são afectadas pela massa molecular do polissacarídeo. Quitosanos com elevada massa molecular permitem um aumento mais pronunciado da viscosidade das soluções onde sejam incorporados. No entanto, em determinadas aplicações, nem sempre uma massa molecular elevada é desejável. Uma das desvantagens associadas a uma massa molecular elevada é a menor solubilidade da amostra, se considerarmos graus de acetilação semelhantes.

Quitosanos com baixa massa molecular, entre cerca de 5 a 10 kDa, por vezes denominados quito-oligómeros, permitem ultrapassar muitas dessas desvantagens e possuem mesmo, em determinados casos, propriedades funcionais mais atractivas (Kumar et al, 2004). Têm sido utilizados nos campos alimentar, farmacêutico e agrícola devido à sua capacidade anti-tumoral (Senel e McClure, 2004), propriedades antifúngicas e antimicrobianas (Tsai et al, 2000; Tharanathan e Kittur, 2003) e determinados efeitos fisiológicos, por exemplo, efeitos hipocolesterolémicos e minimizadores da progressão da diabetes (Muzzarelli, 1996; Kondo et al, 2000). Nas plantas pensa-se que os quito-oligómeros permitem obter, gradualmente, a formação de enzimas (como a  $\beta$ -1,3- glucanase e quitinase) das paredes estruturais de fungos (Hirano, 1999; Kumar et al, 2004).

### 1.3.4 Solubilidade e propriedades em solução

A quitina é altamente hidrofóbica e é insolúvel em água e na maioria dos solventes orgânicos. É geralmente solúvel em hexafluoracetona e hexafluoroisopropanol, em conjugação com soluções aquosas de ácidos minerais, e em dimetilacetamida/cloreto de lítio (5%) (Kurita, 2001). O quitosano, o produto desacetilado da quitina, é solúvel em ácidos diluídos tal como o acético, fórmico, láctico, etc.

Como já foi anteriormente referido, o quitosano é maioritariamente produzido por desacetilação da quitina obtida a partir de várias fontes. A diminuição do grau de acetilação e o aumento da quantidade de grupos amina livres, potencialmente ionizáveis, fazem com que o quitosano seja solúvel em soluções ácidas diluídas de  $\text{pH} < 6$ . Devido a se tratar de um polielectrólito, cuja densidade de carga está dependente do grau de acetilação do polímero, as suas propriedades em solução são influenciadas pelo  $\text{pH}$  e força iónica do meio. Um baixo grau de acetilação (GA) corresponde por isso a um polímero altamente carregado em soluções ácidas (Rinaudo *et al*, 1988). Em condições iónicas do meio semelhantes, o valor médio de GA controla a solubilidade em água em termos das interacções intermoleculares entre os grupos *N*-acetilo, mas também das propriedades hidrofílicas da glucosamina livre. Num meio ácido diluído, o seguinte equilíbrio desempenha o papel mais importante:



A solubilidade do quitosano aumenta quando as repulsões electrostáticas correspondentes às cargas positivas são mais importantes que as interacções atractivas devidas às interacções de baixa energia, tais como pontes de hidrogénio ou interacções hidrofóbicas. Esta solubilidade é também favorecida pela hidratação de vários sítios, maioritariamente aqueles que se encontram carregados. Como consequência, o rácio  $\text{NH}_3^+/\text{NH}_2$ , que está directamente relacionado com a carga do polímero, é muito importante.

Quando o grau de acetilação aumenta, a gama de solubilidade aumenta por duas razões. Primeiro, pelo aumento do impedimento estérico devido ao aumento dos grupos acetilo e depois, possivelmente, por aumento do valor do  $\text{pK}$  intrínseco. Como consequência, quitosanos com graus de acetilação perto de 50% são solúveis em água.

A solubilidade depende igualmente da distribuição dos grupos *N*-acetilo ao longo da cadeia principal de resíduos de glucosamina (Rinaudo e Domard, 1988).

Uma característica comum à maioria dos polissacarídeos é a sua capacidade de aumentar a viscosidade do meio aquoso onde se incorporam, essencialmente devido à sua elevada massa molecular. É o caso da quitina e do quitosano que devido à sua elevada massa molecular, formam soluções com elevada viscosidade com vários ácidos orgânicos (Rinaudo *et al*, 1993).

O quitosano em soluções ácidas comporta-se como um polielectrólito, apresentando uma conformação mais estendida devido à repulsão entre os grupos funcionais com cargas de igual sinal. A intensidade destas forças repulsivas depende:

- 1- Do número, posição e grau de dissociação dos grupos ionizáveis, sendo por isso o pH do meio um factor importante;
- 2- da força iónica da solução e da natureza dos contra- iões.

O primeiro grupo de factores contribui para um aumento da viscosidade intrínseca com o aumento da densidade de carga da macromolécula. O segundo grupo apresenta também um papel importante na viscosidade de polielectrólitos; usualmente a viscosidade intrínseca varia linearmente com o inverso da raiz quadrada da força iónica- relação de Pals e Hermans (equação 1-2). Esta relação entre a viscosidade intrínseca ( $\eta$ ) e a força iónica ( $I$ ) foi comprovada ser válida para quitosanos (Rinaudo e Domard, 1998).

$$[\eta] = [\eta]_{\infty} + \frac{S}{\sqrt{I}} \quad \text{equação 1-2}$$

Sendo  $S$  uma constante e  $[\eta]_{\infty}$  a viscosidade intrínseca a força iónica infinita, correspondente à viscosidade intrínseca de uma macromolécula não iónica com a mesma massa molecular e conformação que o biopolímero polielectrólito. O aumento da força iónica leva à diminuição da repulsão electrostática entre os grupos carregados, resultando na contracção da macromolécula e consequentemente, na diminuição da viscosidade intrínseca. De acordo com esta interpretação, verifica-se experimentalmente o aumento do expoente da equação de Mark-Houwink devido à

conformação mais estendida adoptada pelo biopolímero polieletrólito quando a força iónica diminui (Lapasin e Pricl, 1995).

Apesar de na literatura se poderem encontrar vários estudos sobre as propriedades de soluções diluídas de quitosanos, estudos sobre as propriedades reológicas de soluções concentradas de quitinas e quitosanos são raros. O comportamento reológico de soluções de polímeros depende da massa molecular e da sua concentração em solução.

Admite-se que a viscosidade específica na região newtoniana, pelo menos na ausência de repulsões electrostáticas, está relacionada com o parâmetro de interpenetração macromolecular  $C[\eta]$ :

$$\eta_{sp} = C[\eta] + k'(C[\eta])^2 + \dots + B(C[\eta])^n \quad \text{equação 1-3}$$

Os dois primeiros termos correspondem à relação de Huggins, válido para o regime diluído e  $k'$  é a constante de Huggins, dependente da forma das moléculas e da qualidade do solvente.

A variação da viscosidade em função da taxa de deformação apresenta duas zonas distintas. A baixas taxas de deformação a viscosidade é independente da deformação - o comportamento é Newtoniano. A partir de um valor crítico de deformação, a viscosidade decresce e varia com a taxa de deformação de acordo com uma lei de potência (equação 1-4),

$$\eta = K(\dot{\gamma})^n \quad \text{equação 1-4}$$

O efeito da concentração do biopolímero sobre a viscosidade, a taxas de deformação nulas, é geralmente interpretado através do tratamento do gráfico  $\log \eta_{sp}$  versus  $\log c[\eta]$ . A transição entre os regimes diluído e concentrado não ocorre para uma concentração bem definida, correspondendo sim a uma gama de concentrações conhecida como região semi-diluída ( $C^* < C < C^{**}$ ). O início do comportamento reofluidificante é caracterizado por uma concentração crítica a que corresponde uma taxa de deformação ( $\dot{\gamma}$ ) a qual depende da massa molecular do



polímero e da concentração da solução (Desbrières, 2002). Foi demonstrado que se obtém uma única curva de  $\eta_{sp}$  vs  $C[\eta]$  para quitosanos para qualquer concentração, grau de acetilação e massa molecular do polímero (Rinaudo e Domard, 1988). Signini e Campana-Filho (2002) determinaram as concentrações críticas relativas aos domínios diluídos/semi-diluídos ( $C^*[\eta]$ ) e semi-diluídos/concentrado ( $C^{**}[\eta]$ ) de 1 e 9; respectivamente, estes valores estão na gama dos valores determinados para cadeias semi-rígidas (Milas *et al*, 1990). Os mesmos investigadores mostraram que soluções de quitosanos com massas moleculares mais baixas apresentam comportamento Newtoniano mesmo a taxas de deformação elevadas.

Shepherd *et al* (1997) estudaram as propriedades reológicas de quitosanos obtidos a partir de lulas e de quitosanos de outras fontes e concluíram que as soluções de quitosanos de lulas apresentavam comportamento reofluidificante distinto, enquanto que soluções de quitosano de outras fontes apresentaram comportamento aproximadamente newtoniano. Os mesmos investigadores concluíram ainda que as soluções de quitosanos de lula apresentam viscosidades muito elevadas e com tensões de inércia mais elevadas que o das outras soluções.

Chen e Tsaih (1998) concluíram que quitosanos com massas moleculares baixas apresentam conformações mais estendidas e mais rígidas do que os quitosanos com elevada massa molecular. Baxter *et al* (2005) estudaram a influência do ultra-sons de elevada intensidade nas propriedades viscoelásticas, de quitosanos e concluíram que à medida que aumenta o tempo de tratamento com os ultra-sons verifica-se um decréscimo da tensão de corte em função da taxa de deformação. Este decréscimo está relacionado com o decréscimo de viscosidade intrínseca e consequente redução da massa molecular.

## **1.4 Filmes e revestimentos**

### **1.4.1. Considerações gerais**

Nos países industrializados as embalagens alimentares representam cerca de 50 % do total de embalagens produzidas. De facto, nos últimos anos tem-se assistido a grandes mudanças nos hábitos alimentares em consequência da alteração dos estilos de vida,

que têm favorecido um considerável aumento da oferta em alimentos pré-preparados e conservados.

Os polímeros sintéticos, nomeadamente os plásticos, desempenham papel importante nesta área. A ausência de biodegradabilidade destes produtos assim como uma consciencialização sobre a poluição ambiental e a tentativa de reduzir o lixo em geral, levaram à procura de novas alternativas biodegradáveis. Pode afirmar-se que a biodegradabilidade não é apenas um requerimento funcional mas também um atributo ambiental muito importante (Kester e Fennema, 1986). Para além dos problemas ambientais, os filmes de polietileno de alta densidade, por exemplo, um material usualmente utilizado na protecção de alimentos, possui desvantagens como a ocorrência de fermentação, devido a depleção de oxigénio, e a condensação de água devido a flutuações na temperatura de armazenamento, o que pode provocar o aparecimento de fungos (Krochta e Mulder-Jonhson, 1997).

Filmes edíveis e biodegradáveis de polímeros oferecem um sistema de embalagem alternativo, sem custos ambientais. Apesar de uma total substituição dos plásticos sintéticos não ser possível através dos filmes biodegradáveis, uma vez que não é possível essa substituição para algumas aplicações específicas, essa substituição é óbvia e prática. Nos últimos dez anos, o interesse e a actividade de investigação neste tipo de filmes tem sofrido especial atenção. Estes filmes não visam substituir os materiais de embalagem não edíveis e sintéticos, como já foi referido. A utilidade dos filmes edíveis recai sobre a capacidade de agir como um adjunto para melhorar a qualidade dos alimentos, através do controlo da transferência de massa, melhoria da integridade dos produtos e de algumas propriedades adicionais, incluindo, em determinados casos, actividade antimicrobiana, estendendo assim o tempo de vida e melhorando a eficiência económica dos materiais de embalagem (Kester e Fennema, 1986).

Existem muitos mecanismos envolvidos em prolongar o tempo de vida dos alimentos através de revestimentos/filmes poliméricos. Estes incluem a transferência controlada de humidade entre os alimentos e o ambiente envolvente, a libertação controlada de agentes químicos (p.ex., substâncias anti-microbianas; antioxidantes), a redução da pressão parcial de oxigénio na embalagem, que resulta num decréscimo no metabolismo, o controlo da taxa de respiração, a elevada impermeabilidade a certas substâncias, como gorduras e óleos, a preservação de compostos de aroma e o reforço estrutural dos alimentos (Shahidi *et al*, 1999; Tharanathan, 2003).

Os filmes edíveis podem ser definidos como camadas finas de material edível aplicado nos alimentos por imersão/pulverização ou envolvidos em membranas pré-formadas, de forma a originar uma barreira contra a transmissão de gases, vapores e solutos, enquanto oferecem também protecção mecânica (Krochta e Mulder-Johnson, 1997). A tabela 1-6 mostra algumas das propriedades funcionais dos filmes edíveis.

**Tabela 1-6** Propriedades funcionais dos filmes edíveis

<b>Possíveis propriedades funcionais dos filmes edíveis</b>
✓ Retardam o transporte de gases (CO <sub>2</sub> , O <sub>2</sub> )
✓ Retardam a migração de óleos e gorduras
✓ Retardam o transporte de solutos
✓ Melhoram as propriedades mecânicas dos alimentos
✓ Retêm compostos voláteis
✓ Ajudam na retenção da integridade estrutural dos alimentos

📖 Adaptado de Kester e Fennema, 1986.

A maioria dos filmes edíveis contém pelo menos um componente que é um polímero de elevada massa molecular. As estruturas poliméricas de cadeia longa são necessárias para manter a matriz dos filmes com a força coesiva necessária. O aumento da coesividade estrutural resulta geralmente na redução da flexibilidade do filme, da porosidade, da permeabilidade a gases, vapores e solutos. Uma distribuição uniforme dos grupos polares ao longo da cadeia do polímero aumenta a coesão pelo aumento aparente das pontes de hidrogénio e das interacções iónicas entre as cadeias.

Uma variedade de polissacarídeos, proteínas e lípidos têm sido usados quer sob a forma de misturas, quer sozinhos, para produzir filmes e revestimentos. Polissacarídeos como os alginatos, carrageninas, pectinas, amido, derivados de celulose e quitosano foram testados para o seu potencial uso como filmes edíveis (Baldwin *et al*, 1995). Geralmente, este tipo de filmes oferece uma boa capacidade

barreira ao oxigénio e ao dióxido de carbono, mas não apresentam boas propriedades de permeabilidade ao vapor de água, entre os alimentos e o ambiente que os rodeia (Kester e Fennema, 1986).

Nos últimos tempos muitos investigadores têm estudado as potenciais aplicações de revestimentos e de filmes de quitosano. O uso deste biopolímero é especialmente atractivo uma vez que se obtém a partir de uma fonte praticamente inesgotável e em contínua renovação, para além das muitas propriedades benéficas demonstradas, conforme poderemos ver na secção 1.4.3.

Para além dos revestimentos formados sobre os produtos, este biopolímero permite igualmente a obtenção de filmes através do chamado "casting" em que a solução do biopolímero é colocada num suporte e deixada evaporar podendo depois remover-se o filme formado por destacamento. Os filmes obtidos possuem baixa espessura e propriedades barreira e mecânicas aceitáveis.

#### **1.4.2. Plastificantes**

A adição de componentes de baixa massa molecular, ou plastificantes, pode afectar a permeabilidade e a flexibilidade dos filmes formados, devido à ruptura de interacções entre as cadeias do polímero, p.ex., pontes de hidrogénio (Baldwin, 1999). Estes componentes são geralmente adicionados para diminuir a tendência dos filmes para sofrerem ruptura, aumentando a sua flexibilidade/extensibilidade. No entanto, a mudança que produzem no filme não se traduz apenas na alteração das propriedades mecânicas influenciando também as propriedades barreira, nomeadamente diminuindo a permeabilidade ao vapor de água e a outros gases, devido à natureza hidrofóbica destes componentes. Os plastificantes interagem com o polímero, aumentando o espaço intermolecular, permitindo assim uma maior mobilidade das cadeias do polímero; actuam como lubrificantes internos reduzindo as forças de fricção entre as cadeias do polímero. Os plastificantes cobrem uma vasta área de compostos incluindo ésteres, água, glicóis, fenóis, cetonas e éteres (Santosa e Padua, 1999).

### 1.4.3 Potencialidades do quitosano como filmes/revestimentos

Nos últimos anos, intensificaram-se os estudos sobre as características das membranas de quitosano para a sua aplicação na área da embalagem. Estas membranas possuem valores médios ou moderados de permeabilidade à água e actuam como barreira aos gases, diminuindo por isso a velocidade de respiração e de amadurecimento, por redução da evolução de etileno e de dióxido de carbono. Muitas das propriedades mecânicas do quitosano são comparáveis às dos polímeros comerciais de média resistência. Podem preparar-se películas mais rígidas de quitosano entrecruzando-se com outras substâncias como o glutaraldeído e outros polielectrólitos, ou com polissacarídeos como as pectinas (Hoagland *et al*, 1996).

As condições utilizadas para a produção de filmes de quitosano, incluindo o pH, a força iónica, o tipo de solvente usado e a temperatura de evaporação do solvente, são parâmetros frequentemente manipulados para alterar as propriedades mecânicas e a porosidade das membranas (Arvanitoyannis *et al*, 1998). A força iónica e/ou o pH podem ser manipulados por forma a reduzir a repulsão electrostática inter- e intramolecular entre as cadeias de quitosano, permitindo a aproximação das cadeias e o aumento das pontes de hidrogénio inter- e intramoleculares (Chen *et al*, 1994). Durante a secagem das soluções para a produção de filmes a concentração do polímero aumenta, resultando na formação de um gel. Ao mesmo tempo, a força iónica aumenta, resultando numa maior associação entre o polielectrólito e o contra ião, e no aumento do efeito de escudo dos contra iões (Bégin e Calsteren, 1999).

Os filmes e revestimentos preparados com base em quitosano apresentam diversas vantagens de aplicação na área alimentar (Muzzarelli, 1986; Agulló *et al*, 2003), incluindo a sua biodegradabilidade, propriedades anti-microbianas e propriedades barreira e mecânicas satisfatórias.

A biodegradabilidade de filmes de quitosanos foi estudada por vários investigadores. Vikhoreva *et al* (2002) concluíram que os filmes de quitosano atingem a biodegradação quase total no solo ao fim de 5-7 dias, não sendo prejudiciais para o ambiente. A velocidade de biodegradação aumenta significativamente consoante o aumento de humidade do solo (cerca de 50 %) e também quando os filmes são

colocados a profundidades mais baixas. Xu *et al* (1996) estudaram também a biodegradabilidade de filmes de quitosano (GA=15%) usando testes de simulação de solo e concluíram que estes se degradam mais depressa que o celofane.

Foram já realizados diversos estudos acerca da utilização de revestimentos de quitosano para a conservação da qualidade de vários produtos alimentares. Estes estudos permitiram concluir que revestimentos de quitosano são eficazes na extensão do tempo de vida de determinados produtos alimentares, quer por inibição de fungos (Agulló *et al*, 2003), quer por manterem diversas propriedades importantes como o aspecto, o sabor e a textura (El-Gaouth *et al*, 1991; Zhang e Quantick, 1997; Romanazzi *et al*, 2002). Foi demonstrado que os alimentos de origem vegetal tratados com quitosano melhoram de qualidade, reduzem a maturação e o tempo de deterioração e prolongam o tempo de vida útil.

Os estudos realizados com quitosanos incluem aplicações em vegetais, como couve e cenouras (Molloy *et al*, 2004), frutos, como morangos (El Gaouth *et al*, 1991, Reddy *et al*, 2000; Han *et al*, 2004), uvas de mesa (Romanazzi *et al*, 2002), cerejas (Romanazzi *et al*, 2003), citrinos e maçãs (El Gaouth *et al*, 1997 e 2000; Assis e Leoni, 2003), e determinados produtos processados como peru cozinhado e pizzas pré cozinhadas (Rodriguez *et al*, 2003), e ainda ovos (Bhale *et al*, 2003).

El Gaouth *et al* (1997) estudaram a prolongação do tempo de vida do tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) mediante a aplicação de películas de quitosano armazenadas a 20°C e demonstraram que ocorria uma redução da velocidade de respiração e da produção de etileno quando se aumentava a concentração deste polímero. Demonstraram ainda que o nível interno de dióxido de carbono aumentava, enquanto que o de oxigénio diminuía. Foi demonstrada a eficácia da combinação do tratamento de pressão e coberturas de quitosano em cerejas após colheita (Romanazzi *et al*, 2003). No caso das cerejas trata-se de um avanço considerável, uma vez que não existem fungicidas licenciados na União Europeia para o tratamento destes frutos.

Revestimentos com base em quitosano inibem também parcialmente o "browning" de lichias durante o armazenamento (Zhang e Quantick, 1997).

Galed *et al* (2004) monitorizaram, mediante ressonância magnética de imagem, o processo de maturação e deterioração de citrinos tratados com soluções de quitosanos e demonstraram a eficiência destes revestimentos no prolongamento do tempo de vida destes frutos.

Rodriguez *et al* (2003) trataram pizzas pré cozinhadas com soluções de quitosano e concluíram que os filmes do polímero aumentam o tempo de vida das pizzas; segundo os investigadores, este facto deve-se às propriedades anti-fúngicas do quitosano, em vez da sua acção como barreira à permeabilidade da água. Romanazzi *et al* (2002) concluíram que o quitosano pode ser alternativo aos fungicidas no controlo de uvas de mesa após a colheita. El Gaouth *et al* (1991) e Reddy *et al* (2000)) concluíram o mesmo quanto a morangos e cerejas. Han *et al* (2004) e El Gaouth *et al* (1991) concluíram que revestimentos de quitosanos estendem o tempo de vida de morangos uma vez que diminuem a perda de peso, retarda as perdas de cor e a acidez. As coberturas de quitosanos mostraram ainda a sua capacidade de carregar grandes quantidades de cálcio e de vitamina E, aumentando significativamente o conteúdo destes nutrientes nestes frutos (Han *et al*, 2004).

O uso de filmes de *N,O*-carboximetil-quitina para preservar frutos durante um maior período de tempo já foi aprovado em países como o Canadá e os Estados Unidos. A preparação de filmes laminados de quitosano foi também estudada por alguns investigadores, incluindo filmes de quitosano/pectina (Hoagland *et al*, 1996) e filmes de quitosano/metilcelulose (Chen *et al*, 1996). Por incorporação de lípidos é possível também diminuir a permeabilidade ao vapor de água (Wong *et al*, 1992).

A aplicação de películas pré-formadas de quitosano em alimentos não tem sido muito estudada. Na bibliografia encontram-se apenas aplicações em mangas (Srinivasa *et al*, 2002, 2004a) tendo-se concluído que o uso destas películas prolonga o tempo de vida das mangas.

#### **1.4.4 Propriedades dos filmes**

Neste trabalho, estudaram-se algumas propriedades de filmes de quitosano, tendo-se dado especial relevância à permeabilidade ao vapor de água e às propriedades mecânicas.

Seguidamente, faz-se uma breve referência ao fundamento da determinação destas propriedades. A informação disponível na literatura, referente a filmes de quitosano e

outros biopolímeros como filmes de pectina e de alginato será discutida igualmente em conjunto com os resultados obtidos neste trabalho.

#### 1.4.4.1. Permeabilidade

A selecção ou o desenvolvimento de materiais poliméricos para embalagens de alimentos implica o conhecimento do seu comportamento em solução e dos processos de transporte que através deles possam ocorrer, assim como dos muitos factores que podem influenciar estes processos. Será importante considerar, nomeadamente, a permeabilidade dos filmes ao vapor de água, gases, solutos ou lípidos. Igualmente a ter em conta será o facto da “plastificação” de polímeros por sorção de vapores ou líquidos originar o decréscimo das propriedades mecânicas e a alteração das propriedades de barreira.

A permeabilidade de uma membrana é calculada a partir de uma combinação entre a 1ª lei de Fick da difusão e da lei de Henry da solubilidade. Determina-se assim o *fluxo* de permeato através de uma membrana não porosa, assumindo que não possui imperfeições.

A taxa de transmissão ao vapor de água (WVTR) define-se como o fluxo estacionário de vapor de água, por unidade de tempo, através da área unitária do material, na direcção normal à superfície do material, sob condições definidas de temperatura e humidade. A permeância ao vapor de água consiste na taxa de transmissão de vapor de água através da área unitária do material, induzida por uma diferença unitária de pressão de vapor entre duas superfícies específicas do material, sob condições definidas de temperatura e humidade. A *permeância* é assim uma medida de fluxo que não considera a espessura do filme e é usada para a avaliação do desempenho desse filme em vez de descrever uma propriedade intrínseca do material. A permeabilidade ao vapor de água (WVP) é definida como a permeância através de uma membrana de espessura unitária. É o produto aritmético entre permeância e espessura da membrana. (Robertson, 1993).

A permeabilidade de filmes é muitas vezes imprevisível devido à ausência de uma estrutura homogénea e à natureza hidrofílica da maioria das formulações. A composição química e estrutura do polímero formador de filmes afecta a permeabilidade do filme (McHugh *et al*, 1993). Os materiais altamente polares, com um elevado grau de ligações de hidrogénio, exibem baixa permeabilidade a gases,



especialmente sob condições de baixa humidade, mas são fracas barreiras para vapor de água. Materiais não polares, como lípidos, dão origem a boas barreiras de vapor de água, mas são permeáveis a gases como o oxigénio e o dióxido de carbono. Polímeros com grupos funcionais iónicos dão origem a interacções fortes na cadeia do polímero, que restringem a movimentação da cadeia, o que geralmente se traduz em boas barreiras de oxigénio, mas também resulta em pontes de hidrogénio com a água e subsequente absorção de água, a humidades relativas elevadas, resultando em velocidades de transmissão de água elevadas (Miller e Krochta, 1997). A absorção de água rompe as interacções intermoleculares entre as cadeias do polímero, o que aumenta a permeabilidade em geral. Por esta razão estes filmes são muitas vezes permeáveis a elevadas humidades relativas. Os grupos não polares resultam numa barreira a oxigénio pouco eficaz quando presentes como cadeia lateral mas melhoram razoavelmente a permeabilidade ao vapor de água (Baldwin, 1999).

A tabela 1-7 mostra valores de permeabilidade ao vapor de água para filmes de polímeros sintéticos e filmes de polímeros naturais e biodegradáveis encontrados na literatura.

**Tabela 1-7** WVP para diferentes matrizes de filmes

<b>Filme</b>	<b>WVP (g.mm/kPa.h.m<sup>2</sup>)</b>	<b>Referência</b>
Poliéster	0.0091	McHugh <i>et al</i> , 1993
Polietileno de alta densidade (HDPE)	0.0012	McHugh <i>et al</i> , 1993
Glúten de trigo	0.385	Tanada-Palmu <i>et al</i> , 2002
Quitosano	0.07-0.17	Butler <i>et al</i> , 1996
Quitosano	4.84	Rhim <i>et al</i> , 1998
Alginato	2.35	Parris <i>et al</i> , 1995
Pectina	3.19	Parris <i>et al</i> , 1995

Como se pode constatar pelos valores exemplificados na tabela 1-7 os polímeros sintéticos possuem uma elevada capacidade de barreira ao vapor de água. Krochta e Mulder-Johnson (1997) consideraram filmes com valores de WVP entre 0,4-4 g.mm/kPa.h.m<sup>2</sup> como fracas barreiras ao vapor de água, com WVP entre 0,004 e

0,4 g.mm/kPa.h.m<sup>2</sup> filmes com propriedades barreira moderadas e filmes com WVP entre  $4 \times 10^{-4}$  e  $4 \times 10^{-3}$  g.mm/kPa.h.m<sup>2</sup> filmes com boas propriedades barreira. Usando esta escala podemos classificar os filmes dos biopolímeros referidos como barreiras fracas ao vapor de água.

#### 1.4.4.2. Propriedades Mecânicas

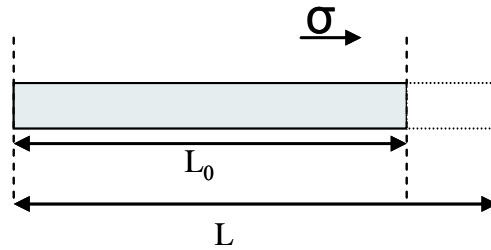
As propriedades mecânicas de filmes de biopolímeros traduzem o comportamento destes materiais quando sujeitos a uma solicitação mecânica, ou seja, quando sujeitos a uma tensão ou deformação, sendo por isso de grande importância para muitas das suas aplicações. Os parâmetros reológicos que caracterizam estas propriedades mecânicas estão relacionados com o tipo densidade das interações moleculares entre os polímeros e pela espessura dos filmes. As técnicas utilizadas para a caracterização destas propriedades envolvem geralmente ensaios de extensão uniaxial (figura 1-7). A *tensão* ( $\sigma$ ) aplicada define-se como a força (F) por unidade de área do material (A).

$$\sigma = F/A$$

**equação 1-5**

A *deformação* ( $\epsilon$ ) é definida como a mudança fraccional no comprimento do material, i.e.,  $\Delta L/L_0$ , onde  $L_0$  é o comprimento inicial e  $\Delta L$  é a variação de comprimento ( $L-L_0$ ). A percentagem de deformação (alongação) que o material suporta até sofrer ruptura está relacionada com a capacidade do filme para ser esticado; um valor elevado de alongação indica que o material absorve uma grande quantidade de energia antes de se quebrar.

Nos testes a realizar devem usar-se amostras e instrumentos adequados, de modo que o resultado experimental traduza as propriedades intrínsecas do material. As condições sob as quais estes ensaios são realizados influenciam grandemente os resultados, consoante o tamanho das amostras, pré-acondicionamento, temperatura, humidade relativa, magnitude da força ou deformação aplicadas, e velocidade de aplicação.



**Figura 1-7** Deformação uniaxial após a aplicação de uma tensão ( $\sigma$ ).

Os ensaios de caracterização podem dividir-se em três grupos: ensaios quase estáticos, ensaios transitórios e ensaios dinâmicos. Neste trabalho utilizaram-se ensaios quase estáticos (extensão uniaxial até ruptura) e transitórios (relaxação de tensão).

No caso dos ensaios quase-estáticos procura-se caracterizar a resposta instantânea dos materiais a uma determinada solitação. Usualmente a solitação consiste numa deformação aplicada a uma velocidade constante.

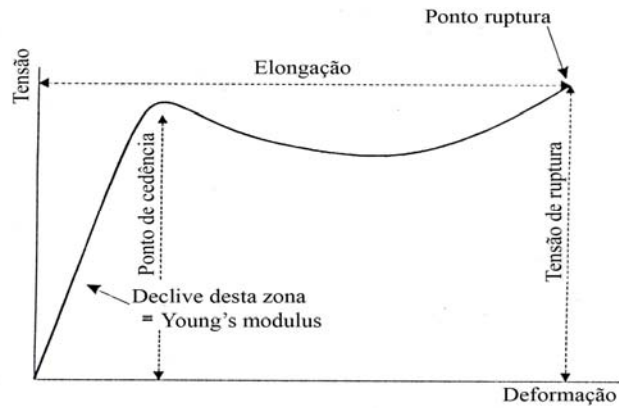
A lei básica para sólidos ideais assume que estes ao serem submetidos a uma força irão sofrer uma deformação elástica e que após a remoção dessa força retomam a sua forma original. A lei de Hooke, para sólidos ideais traduz-se pela seguinte equação:

$$\sigma = \frac{F}{A} = E \times \varepsilon \quad \text{equação 1-6}$$

Em que  $\sigma$  é a tensão média,  $F$  (N) é a força aplicada,  $A$  ( $\text{m}^2$ ) é a área inicial da secção transversal do provete,  $\varepsilon$  é a deformação ou extensão do provete, e  $E$  é o módulo de Young ou módulo de elasticidade do material (Pa).

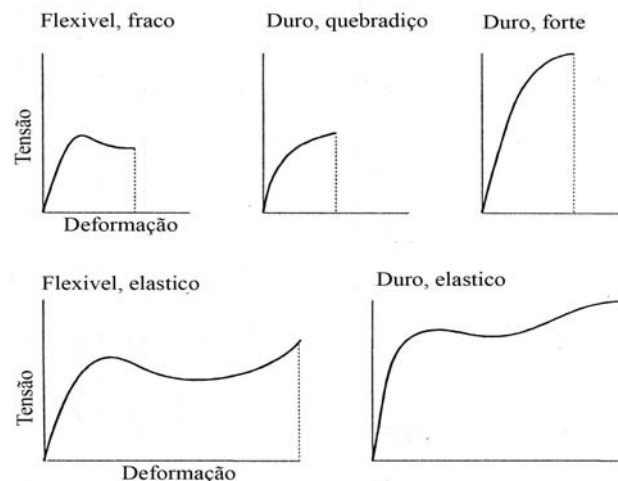
A relação anterior representa uma relação linear e, portanto, apenas válida na região onde o material tem um comportamento elástico, ou seja, na região inicial da curva tensão-deformação.

É importante ainda definir a *tensão de ruptura* e a tensão de cedência. A tensão de ruptura é o máximo de tensão que o material suporta até sofrer ruptura. *Tensão de cedência* é o ponto em que o primeiro sinal de uma deformação não elástica ocorre. Na figura 1-8 representa-se uma curva de tensão/deformação através da qual podemos identificar os parâmetros definidos.



**Figura 1-8** Exemplo de uma curva de tensão/deformação até à ruptura

Diferentes materiais apresentam diferentes propriedades mecânicas. Os filmes de metilcelulose, por exemplo, são considerados duros e quebradiços e os filmes à base de proteínas são flexíveis e suaves. A figura 1-9 apresenta exemplos do comportamento de diferentes filmes quando sujeitos a uma tensão extensional uniaxial. As diferenças observadas são atribuídas às diferentes estruturas moleculares dos filmes considerados (Chen, 1995). Por exemplo, filmes biodegradáveis produzidos a partir de proteínas do leite possuem baixa capacidade de alongação quando comparados a filmes de HDPE. Na tabela 1-8 apresentam alguns parâmetros mecânicos obtidos para determinados filmes, considerados a título exemplificativo.



**Figura 1-9** Exemplos de comportamento de diferentes filmes quando sujeitos a uma tensão uniaxial extensional.

**Tabela 1-8** Parâmetros obtidos de curvas de tensão/deformação até à ruptura de vários filmes

<b>Filme</b>	<b>Módulo de Young (MPa)</b>	<b>Tensão de ruptura (MPa)</b>	<b>Elongação (%)</b>	<b>Referência</b>
LDPE	---	31,2	156	Chen <i>et al</i> , 1995
HDPE	---	26	300	Robertson, 1993
Álcool polivinílico (PVOH)	98	12,7	116,6	Immirzi <i>et al</i> 2003
Hidroxietilcelulose	287	23,0	62,2	Immirzi <i>et al</i> 2003
WPI	---	5,76	22,7	Chen <i>et al</i> , 1995
Quitosano/Pectina	3560	81,2	3,1	Santos <i>et al</i> , 2004
Pectina	4,44	0,11	5	Parris <i>et al</i> , 1995
Quitosano (não neutro)	---	41,6	42,4	Rhim <i>et al</i> , 1998
Quitosano (neutro)	4210	95,1	7,7	Santos <i>et al</i> , 2004

LDPE= polietileno de baixa densidade; HDPE= polietileno de alta densidade; WPI= isolado de proteína de soro do leite

Pode concluir-se com base nos valores exemplificados na tabela 1-8 que filmes de quitosano apresentam elongações inferiores em relação a polímeros sintéticos, mas, por outro lado, a sua tensão de ruptura é superior a qualquer um dos filmes apresentados.

No caso dos ensaios transitórios o objectivo principal é caracterizar a dependência temporal do comportamento mecânico dos materiais.

Nos ensaios de relaxação de tensão utilizados neste trabalho, aplica-se uma deformação instantânea à amostra e a tensão necessária para manter a deformação é medida ao longo do tempo.

Podem observar-se comportamentos diferentes em testes de relaxação. Se estivermos perante um material elástico ideal, não se observa qualquer relaxação, enquanto que materiais com comportamento de líquido viscoso ideal relaxam

instantaneamente. Para materiais viscoelásticos observa-se uma relaxação gradual, em que o ponto final depende da estrutura molecular do material a ser testado.

A equação 1-7 corresponde ao modelo de Maxwell e descreve a relaxação gradual da tensão após a aplicação de uma deformação instantânea. Esta relação permite a determinação do tempo de relaxação  $\lambda_{rel}$ , grandeza que corresponde ao tempo necessário para a tensão decair para 1/e (aproximadamente 36.8%) do seu valor inicial. O tempo de relaxação ( $\lambda_{rel}$ ) é definido como  $\mu/E$ , em que  $\mu$  é a viscosidade newtoniana e E é o módulo elástico.

$$\sigma(t) = \sigma_0 e^{-t/\lambda_{rel}} \quad \text{equação 1-7}$$

Dados experimentais mostram que este modelo não tem em conta o comportamento de relaxação de tensão de muitos materiais viscoelásticos uma vez que não inclui uma tensão de equilíbrio ( $\sigma_e$ ). Outros modelos foram desenvolvidos a partir deste, quer para ter em conta a tensão residual, quer para descrever processos mais complexos que necessariamente envolvem um maior número de tempos de relaxação diferentes.

Estudos de viscoelasticidade em alimentos são frequentes; no entanto, na literatura, a aplicação destes estudos a filmes de biopolímeros não tem sido muito desenvolvida. Cuq *et al* (1996) desenvolveram um modelo viscoelástico, independente da espessura, para determinar as propriedades viscoelásticas de filmes de proteína miofibrilar de sardinha. Este método baseou-se no modelo de Maxwell generalizado. No entanto, o método incluía a ruptura do filme. Mais tarde, Chandra e Sobral (2000) aplicaram o modelo de Maxwell, o modelo de Maxwell generalizado com duas unidades em paralelo e o modelo de Burgers a filmes de proteína miofibrilar de sardinha, obtendo bons ajustes com estes dois últimos modelos.



## CAPITULO 2- MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Escolha da fonte

Os estiletes das lulas são uma boa fonte de quitina e por isso de quitosano (Kurita *et al*, 1993). Durante o processamento, os estiletes são retirados das lulas, juntamente com as vísceras; são considerados como detritos, não utilizados pela indústria de processamento do pescado, sendo por isso uma matéria-prima barata. Os crustáceos são também uma fonte de quitina (§1.1.1), mas, ao contrário dos estiletes de lulas e potas, necessitam de um tratamento mais drástico para a sua extracção e eliminação de proteínas e minerais (Shepherd *et al*, 1997; Methacanon *et al*, 2003). O tratamento alcalino, mesmo realizado em condições menos drásticas do que aquelas tradicionalmente utilizadas para a extracção de quitina a partir de crustáceos, possibilita a obtenção de amostras com baixo teor proteico e baixo teor de cinzas (Shepherd *et al*, 1997; Chamdupai *et al*, 2004). A eliminação do passo de desmineralização por tratamento ácido e a utilização de condições mais suaves para a desproteinização (menor temperatura, menor concentração de NaOH) tornam o processo de extracção de quitina a partir de estiletes, um processo mais simples e mais barato, e possibilita a obtenção de quitinas e quitosanos com massas moleculares mais elevadas.

Apesar de já ter sido determinado que os estiletes de lula contêm cerca de 35 % de quitina em peso seco, informações detalhadas acerca desta fonte são limitadas, existindo poucos trabalhos desenvolvidos para a sua caracterização.

### 2.2 Materiais

Os estiletes das potas (*Illex argentinus*) utilizados neste estudo foram recolhidas no dia de processamento dos cefalópodes (Pralisa, Vila Nova de Cerveira, Portugal) e transportados para o laboratório onde foram lavados com água corrente e deixados secar à temperatura ambiente. Ao fim de dois dias foram secos em estufa a 40 °C durante 2 horas, com circulação de ar. Os estiletes foram depois pulverizados em moinho (Retsch ZM1000), até tamanho de partícula inferior 0.5 mm.



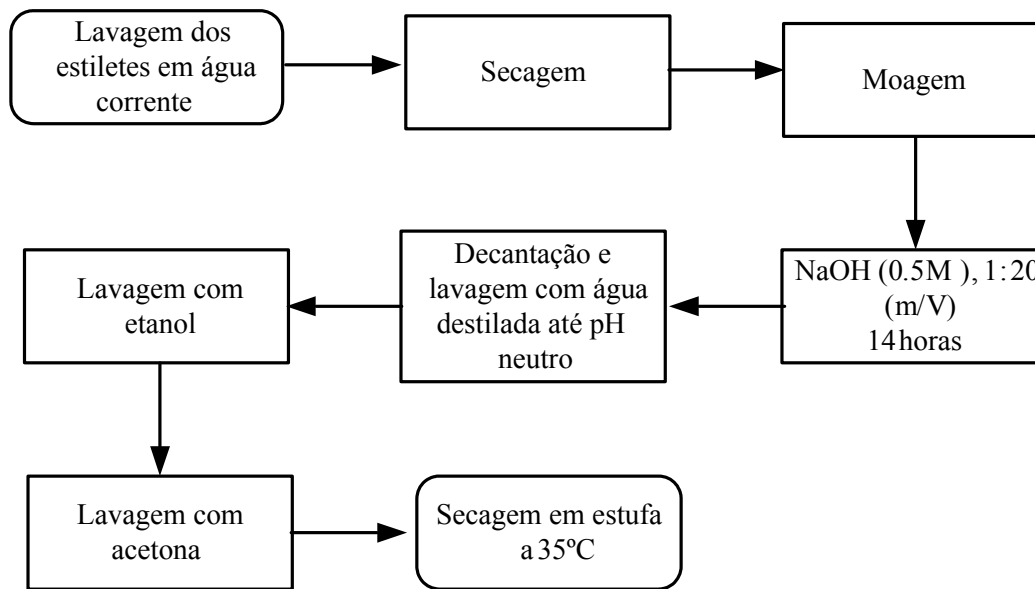
Em alguns ensaios utilizaram-se também amostras de quitina e quitosano comerciais. As amostras foram adquiridas da Sigma (Sigma-Aldrich Química SA, Sintra) e da Primex (Primex Ingredients ASA, Avaldsnes, Noruega) e encontram-se descritas na Tabela 2-1.

**Tabela 2-1** Amostras comerciais, fonte e características.

<b>Amostras comerciais</b>	<b>Fonte</b>	<b>Características descritas pelo Fornecedor</b>
Quitina Sigma (QS)	Cascas de caranguejo	----
Quitosano Sigma (QSg)	Cascas de caranguejo	GA<15 %
Quitosano Primex FG 80 (QPrim_17)	Cascas de camarão	GA $\cong$ 16,5 %
Quitosano Primex FG 85 (QPrim_15)	Cascas de camarão	GA $\cong$ 14,8 %
Quitosano Primex FG 90 (QPrim_7)	Cascas de camarão	GA $\cong$ 7,3 %

### 2.2.1 Obtenção de quitina a partir de estiletes

Estudos preliminares efectuados (Seabra *et al*, 2002; Chamdupai *et al*, 2004) indicaram que os estiletes de lulas e potas continham apenas uma pequena quantidade de minerais, tendo-se por isso eliminado o tradicional tratamento de desmineralização com ácido clorídrico. Os estiletes de potas reduzidos a pó foram tratados com uma solução de hidróxido de sódio (0.5 mol/L), numa razão de 1 g de pó para 20 mL de NaOH, durante 14 horas. Este tratamento mostrou ser eficaz na desproteínização dos estiletes (Seabra *et al*, 2002). Após este tratamento, a amostra foi lavada com água destilada até pH neutro, filtrada por filtro de placa porosa (G1) e lavada com etanol e acetona. A quitina obtida foi seca a 35 °C, em estufa com circulação de ar, durante aproximadamente 16 h. A figura 2-1 representa um esquema do tratamento dos estiletes e obtenção de quitina.



**Figura 2-1** Esquema representativo da obtenção da quitina.

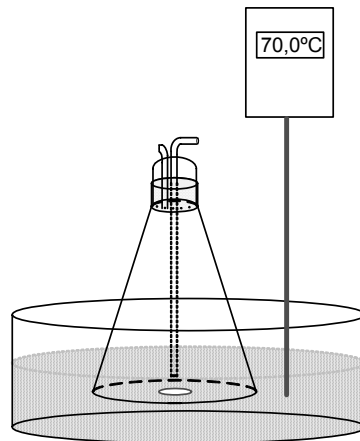
### 2.2.2 Desacetilação da quitina- Obtenção de quitosano

A quitina foi submetida a um tratamento alcalino durante diferentes períodos de tempo, de modo a se obterem quitosanos com diferentes graus de acetilação. Podemos ainda distinguir dois tipos de desacetilação: a *desacetilação por partes* ou *descontinua* e a *desacetilação continua*. A *desacetilação continua* consistiu em realizar a desacetilação durante um determinado período de tempo sem interrupções. A *desacetilação por partes* consistiu em repetir o processo de desacetilação durante intervalos de tempos mais curtos, até se obter o tempo de desacetilação desejado, i.e., a soma desses curtos tempos de reacção é equivalente ao tempo de desacetilação global.

Obtiveram-se assim diferentes quitosanos por desacetilação controlada da quitina. A desacetilação alcalina com hidróxido de sódio a 40 % (m/m), numa razão de 1:20 (sólidos/solução de NaOH), decorreu a 70°C, sob atmosfera de azoto e na presença de boro hidreto de sódio (NaBH<sub>4</sub>) 0.1 mol/L (figura 2-2). A atmosfera de azoto e o boro

hidreto de sódio minimizam a ocorrência da oxidação da amostra durante este processo (Rhazi *et al*, 2000).

As amostras assim tratadas foram depois filtradas e lavadas com água destilada e etanol (50:50) até pH neutro, seguindo-se duas lavagens com etanol e duas por acetona.



**Figura 2-2** Esquema da montagem realizada para a reação da desacetilação das amostras de quitina

Atribuíram-se as seguintes designações às amostras obtidas: QPGA27, QPGA20, QPGA13, QPGA6 e QPGA0 para as amostras de quitosano obtido a partir de quitina extraída de estiletes de pota com graus de acetilação de 27, 20, 13, 6 e 0 %, respectivamente.

### 2.2.3 Fragmentação Oxidativa - Obtenção de Quitosanos com Diferentes Massas Moleculares

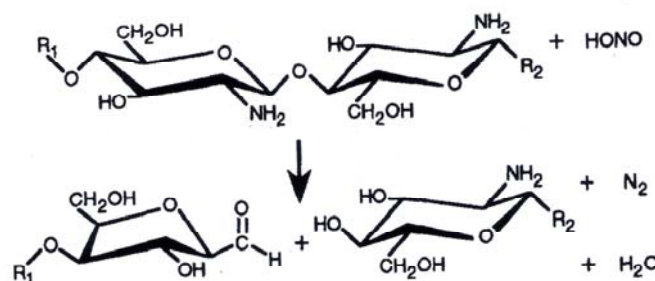
Existem, essencialmente, dois métodos hidrolíticos para preparar oligómeros de quitina e quitosano: A hidrólise enzimática e a hidrólise ácida.

A hidrólise enzimática da quitina e do quitosano pode ser realizada por acção da quitinase, da quitosanase ou da lisozima. Entre estas, a quitosanase é a enzima preferida para esta despolimerização, embora o seu custo e especificidade limitem o seu uso (Patil *et al*, 2000). Foi também descrito o uso de enzimas não específicas entre as quais a papaína (Kumar *et al*, 2004; Kumar e Tharanathan, 2004), a pepsina e a

pronase (Kumar e Tharanathan, 2004) e a lipase (Muzzarelli, 1997). Entre as proteases descritas a que demonstra maior afinidade pelo quitosano é a pepsina.

As hidrólises ácidas descritas na literatura para obtenção de quitosanos de baixa massa molecular, ou mesmo quito-oligómeros, utilizaram o ácido clorídrico concentrado (com aquecimento), o ácido nítrico ou o ácido fosfórico. A hidrólise com ácido clorídrico resulta na despolimerização completa e/ou numa elevada polidispersidade. A hidrólise com o ácido fosfórico à temperatura ambiente necessita geralmente de um elevado período de reacção, entre 1 a 6 semanas (No *et al*, 2003).

A hidrólise com ácido nítrico ( $\text{HNO}_2$ ) oferece várias vantagens. A reacção é selectiva, rápida e facilmente controlada. Para além disso, a transformação de aminas de hidratos de carbono com  $\text{HNO}_2$  tem sido usada para estudar a estrutura de açúcares e, como tal, a estequiometria e os produtos de reacção são bem conhecidos (Allan e Peyron, 1995a). A estequiometria da reacção entre o quitosano e o  $\text{HNO}_2$  está representada na figura 2-3. As espécies de  $\text{HNO}_2$  atacam os grupos amina, mas não os grupos *N*-acetilo, quebrando subseqüentemente as ligações  $\beta$ - glicosídicas. Uma mole de  $\text{HNO}_2$  é consumida por mole de grupo amina que reage e forma-se uma unidade de 2,5-anidro-D-manose no terminal redutor do polímero clivado (Tommeraas *et al*, 2001; Allan e Peyron, 1995b). Apesar de uma vasta gama de produtos desaminados serem frequentemente observados em aminas de hidratos de carbono, não se verificam outras reacções no caso dos quitosanos. Em geral, a reacção de desaminação é muito rápida, mesmo em soluções moderadamente ácidas à temperatura ambiente. Uma vez que o quitosano é solúvel em soluções ácidas diluídas, a reacção com o  $\text{HNO}_2$  é homogénea.



**Figura 2-3** Reacção do ácido nítrico com o quitosano.

O procedimento utilizado neste trabalho para obtenção de quitosanos com massas moleculares mais baixas baseou-se no método proposto por Kasaai *et al* (2001),

utilizando a hidrólise com ácido nitroso. Preparou-se uma solução 0.5 % (m/V) de quitosano com grau de acetilação de aproximadamente 0 %, em ácido acético 0.1 mol/L. A dispersão foi deixada sob agitação moderada durante a noite e posteriormente filtrada por filtro de placa porosa (G2). Adicionou-se solução de nitrito de sódio à solução de quitosano de modo a perfazer a concentração de ácido nitroso desejada e deixou-se a agitar durante 4 horas, sob atmosfera de azoto. Após este tratamento, o quitosano despolimerizado foi recuperado por precipitação com NaOH 0.1 mol/L até pH 8 e centrifugação (centrífuga Sigma 3K30) a 10 °C, durante 10 minutos, a 10 000 rpm. O precipitado obtido, colocado em copo mergulhado em banho de gelo, foi lavado com uma mistura de 150 mL água/350 mL etanol, até pH neutro, seguidamente com uma mistura de 80 mL água/420 mL etanol, etanol absoluto e, finalmente, com acetona. A amostra obtida foi seca em estufa a 35 °C, com circulação de ar, durante aproximadamente 16 horas.

As designações atribuídas às amostras obtidas a partir do tratamento descrito estão apresentadas na tabela 2-2:

**Tabela 2-2** Designações das amostras obtidas por despolimerização oxidativa com ácido nitroso e concentrações utilizadas de agente oxidante.

Amostra	Concentração de NaNO <sub>2</sub> (mol/L)	Designação final
Quitosano de pota GA $\cong$ 0%	0	QPpur
Quitosano de pota GA $\cong$ 0%	1 x 10 <sup>-4</sup>	QPFO1
Quitosano de pota GA $\cong$ 0%	5 x 10 <sup>-4</sup>	QPFO2
Quitosano de pota GA $\cong$ 0%	1 x 10 <sup>-3</sup>	QPFO3

## **2.3 Caracterização das amostras**

### **2.3.1 Caracterização química: Humidade, proteínas, cinzas**

Os teores de humidade e cinzas das amostras de quitina comercial e de potas foram determinados de acordo com o "Food Chemicals Codex" (1981). Todas as determinações foram feitas em triplicado.

Para a determinação da humidade as amostras foram colocadas numa estufa a 105°C durante a noite e, posteriormente, até se verificar uma variação de massa igual ou inferior a 0.005 g entre pesagens consecutivas.

Para a determinação das cinzas incineraram-se as amostras previamente secas com o auxílio de um bico de Bunsen e depois colocaram-se numa mufla a 650 °C durante 6 h.

A determinação de proteínas foi realizada através do método proposto pela AOAC (Association of Official American Chemists). O azoto proteico foi determinado subtraindo o valor teórico de azoto para cada quitina, considerando o respectivo grau de acetilação, ao valor de azoto total determinado pelo método de Kjeldahl. O teor proteico determinou-se com base no azoto proteico multiplicado pelo factor 6,25 (No *et al*, 1989).

### **2.3.2 Análise por infravermelho - Determinação do grau de acetilação**

Como anteriormente referido (§ 1.3.1), a espectroscopia de infravermelho oferece inúmeras vantagens para a determinação do GA uma vez que é relativamente rápida e simples, não requer o tratamento das amostras (pode trabalhar-se com amostras solúveis e insolúveis) e é uma técnica não destrutiva.

Neste trabalho, utilizou-se a espectroscopia de infravermelho (FTIR, “Fourier Transform InfraRed”, espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier) para a determinação do grau de acetilação das amostras de quitina e de quitosano em estudo.

Antes da aquisição dos espectros de FTIR as amostras foram secas a 35°C e colocadas num exsiccador com pentóxido de fósforo, por um período de 48 horas. Os espectros de FTIR das diferentes amostras de quitosano e quitina foram adquiridos na gama de números de onda entre 4000 e 500 cm<sup>-1</sup> com uma resolução de 8 cm<sup>-1</sup> (na gama do infra vermelho médio) num espectrómetro Bruker IFS com acessório Golden Gate (sistema de ATR (“Attenuated total reflection”, reflexão total atenuada) de reflexão única), com acumulação de 256 scans.

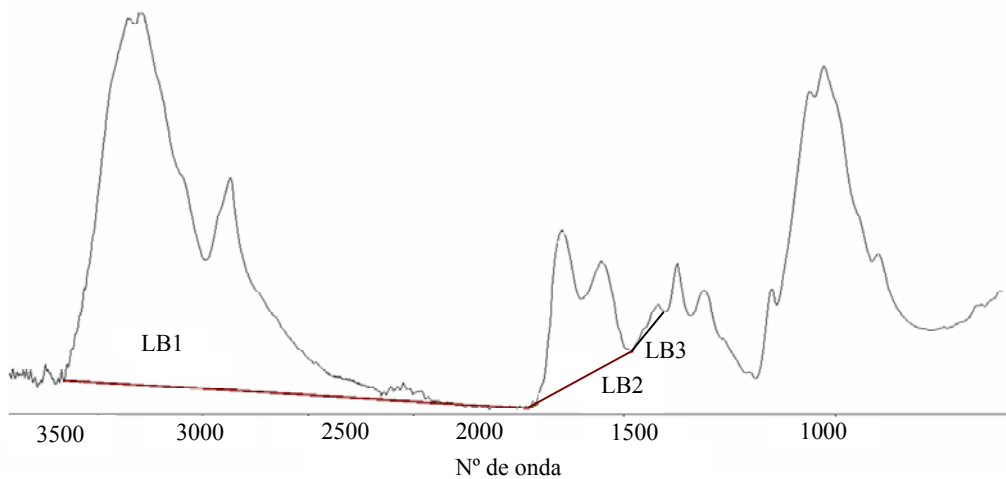
As linhas de base e as bandas de prova e de referência (ver § 1.3.1) utilizadas neste trabalho para a determinação do grau de acetilação de quitosanos foram as propostas por Baxter *et al* (1992). O grau de acetilação foi obtido pela seguinte relação:

$$GA (\%) = \frac{A_{1655}}{A_{3450}} \times 115 \quad \text{Equação 2-1}$$

Considerando-se como banda de prova (BP) a banda de absorção a 1655 cm<sup>-1</sup> e como banda de referência a banda de absorção a 3450 cm<sup>-1</sup>. A relação proposta por Baxter permite apenas o cálculo de graus de acetilação na gama dos 0 aos 55 %, pelo que, no caso das quitinas, a determinação do GA foi realizada através de uma outra relação (equação 2-2) proposta por Brugnerotto *et al* (2001).

$$GA (\%) = \frac{\frac{A_{1320}}{A_{3450}} - 0.03146}{0.00226} \quad \text{Equação 2-2}$$

As linhas de base (LB) utilizadas neste caso foram as LB1 e LB3, representadas na figura 2-4. A determinação das absorvâncias da BP e da BR foi realizada através do software Winfirst.



**Figura 2-4** Representação das linhas de base (LB)

### 2.3.3 Determinação da massa molecular

A massa molecular foi determinada por viscosimetria. A viscosimetria, embora seja um método não absoluto, é um dos processos mais utilizados para a determinação da massa molecular de polímeros. Para a determinação da viscosidade intrínseca de cada amostra realizaram-se medições do tempo de escoamento do solvente e das soluções diluídas do polímero, com um viscosímetro capilar em vidro (tipo Cannon- Fenske), em banho termostaticado a  $25.0 \pm 0.1$  °C.

A viscosidade intrínseca ( $[\eta]$ ) define-se como:

$$[\eta] = \left[ \frac{\eta - \eta_s}{\eta_s c} \right]_{c \rightarrow 0} \quad \text{Equação 2-3}$$

Sendo  $\eta_s$  a viscosidade do solvente e  $\eta$  a viscosidade da solução do polímero. A solução mãe de quitina foi preparada em dimetilacetamida e cloreto de lítio (5%) (Terbojevich *et al.*, 1988), por agitação à temperatura ambiente durante 3 dias, centrifugação a 22000 g durante 1 h e filtração por filtro de teflon de 0.8  $\mu\text{m}$ . A solução mãe de quitosano foi preparada em ácido acético 0.5 mol/L/cloreto de sódio 0.25 mol/L (Rege e Block, 1999), por agitação à temperatura ambiente durante uma noite, centrifugação a 22000 g durante 1 h e filtração por filtro de 0.8  $\mu\text{m}$ .



Prepararam-se diluições de cada amostra utilizando o solvente respectivo. Para cada amostra em análise, determinou-se a viscosidade relativa ( $\eta_r$ ) e a viscosidade específica ( $\eta_{sp}$ ) em função da concentração de polímero ( $C$ ), e calculou-se a viscosidade intrínseca por dupla extrapolação para concentração nula, utilizando as equações de Huggins (Eq. 2-4) e de Kraemer (Eq. 2-5),

$$\frac{\eta_{sp}}{C} = [\eta] + k_1[\eta]^2 C \quad \text{Equação 2-4}$$

$$\ln(\eta_r)/C = [\eta] + k_2[\eta]^2 C \quad \text{Equação 2-5}$$

sendo  $[\eta]$  a viscosidade intrínseca ( $\text{mL g}^{-1}$ ) e  $k_1$  e  $k_2$  as constantes de Huggins and Kraemer, respectivamente.. A constante de Huggins  $k_1$  está relacionada com interações polímero-polímero.

A massa molecular das amostras em estudo determinou-se com base nos valores de viscosidade intrínseca, utilizando relações de Mark-Houwink (Eq. 1-1) descritas na literatura.

Para as amostras de quitina em DMAc-5%LiCl utilizou-se  $K=2.4 \times 10^{-3}$  e  $a= 0.69$ , com  $[\eta]$  em  $\text{dL/g}$ , de acordo com Terbojevich *et al* (1988).

Para as amostras de quitosano, o valor da massa molecular viscosimétrica,  $M_v$ , foi determinado usando a equação 1-1 (secção 1.3.3) e os valores das constantes  $K$  e  $a$  propostos por Rege e Block (1999),  $2.14 \times 10^{-3}$  e  $0.657$ , respectivamente.

### 2.3.4 Determinação da solubilidade das amostras de quitosano

Prepararam-se dispersões a 1 % (m/v) dos diferentes quitosanos em dois diferentes solventes: Ácido acético 0.1 mol/L e ácido acético 0.5 mol/L/ NaCl 0.25 mol/L. Deixou-se em agitação durante uma noite e registou-se a aparência das dispersões. Seguidamente, centrifugaram-se a 15500 rpm durante 1 hora (centrífuga Sigma 3K30). Separou-se o sobrenadante e filtrou-se por filtro G2. Determinou-se a % de matéria solúvel a partir do resíduo seco do sobrenadante, após secagem em estufa a 110 °C até massa constante.

### 2.3.5 Análise Reológica

Prepararam-se soluções de quitina de diferentes fontes em DMAc/LiCl 5% com concentrações que variaram entre 0.1-1.4% (m/V), por agitação à temperatura ambiente durante 3 a 5 dias, dependendo da amostra e da concentração da solução, e posterior centrifugação a 22000 g durante 1 h (20°C). As soluções de quitosano, com diferentes graus de acetilação e diferentes massas moleculares, foram preparadas em ácido acético 0.5 mol/L/ NaCl 0.25 mol/L a diferentes concentrações 0.2-4% (m/V), por agitação à temperatura ambiente durante uma noite e centrifugação a 22000 g durante 1 h a 20 °C. Prepararam-se ainda soluções a 1% (m/V) de quitosano com diferentes graus de acetilação usando ácido acético 0.1 mol/L como solvente. A escolha dos dois solventes utilizados na dissolução das amostras de quitosano baseou-se no facto destes serem, respectivamente, os solventes utilizados na determinação da viscosidade intrínseca e massa molecular e na preparação de filmes de quitosano.

O reómetro utilizado neste estudo, TA AR-1000 (TA Instruments, New Castle, DE), é um reómetro rotacional de tensão controlada. A parte central móvel deste reómetro é constituída por um motor que permite o movimento rotacional de um eixo associado, o qual é suportado numa almofada de ar, de forma a minimizar a inércia do aparelho. Por outro lado, o aparelho possui um sensor capaz de medir o deslocamento angular sofrido pelo sistema de medição, convertendo-o em valores de deformação através do software a ele acoplado. A monitorização de alterações dos valores de deformação em função da variável tempo permite a obtenção do parâmetro denominado por taxa de deformação. Foram utilizados dois sistemas de medição de cone-placa, dependendo da viscosidade das soluções a analisar: Um cone de aço inoxidável de 4 cm de diâmetro e ângulo de 4° e um cone em acrílico de 6 cm de diâmetro e ângulo 2°. Realizaram-se ensaios de escoamento estacionário a 25 °C. A temperatura foi controlada através de um sistema Peltier, incorporado na placa inferior do sistema de medida.

### 2.3.6 Outras Técnicas Utilizadas: Difraccção de raios-X, ressonância magnética nuclear de estado sólido ( $^{13}\text{C}$ ), análise elementar

Os difractogramas de pós de quitinas e quitosanos foram obtidos num difractómetro de raios- X de marca Philips X' Pert MPD equipado com um monocromador curvo de grafite, utilizando radiação  $\text{CuK}\alpha$ . As amostras foram previamente acondicionadas (48h) num exsiccador com pentóxido de fósforo ( $a_w \approx 0$ ).

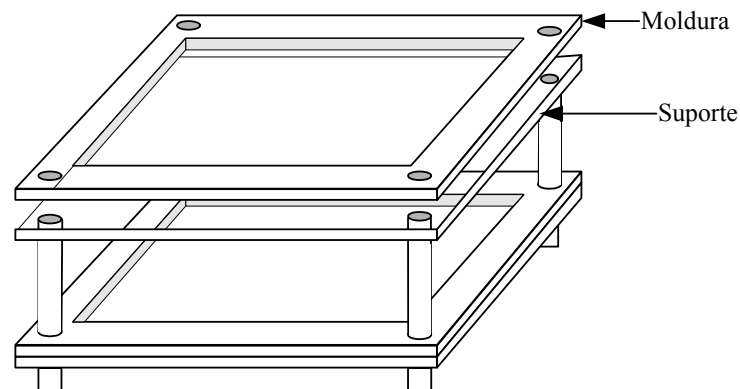
As amostras sólidas de quitina foram igualmente analisadas por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) de estado sólido e de carbono-13, com o principal objectivo da determinação do seu grau de acetilação recorrendo a uma técnica considerada de referência. Utilizou-se um espectrómetro de RMN Bruker MSL 400P a 100.62 MHz, e as técnicas de polarização cruzada e com rotação segundo o ângulo mágico (CP-MAS). A metodologia seguida foi a descrita por Duarte *et al* (2001). O GA foi determinado com base na relação entre os integrais do pico correspondente ao grupo metilo a 22 ppm e dos picos correspondentes aos carbonos da cadeia principal do polissacarídeo:  $DA = I_{\text{CH}_3} / [(I_{\text{C}_1} + I_{\text{C}_2} + I_{\text{C}_3} + I_{\text{C}_4} + I_{\text{C}_5} + I_{\text{C}_6}) / 6]$  (Ottøy *et al*, 1996)

A análise elementar dos pós de quitinas e quitosanos foi realizada num Leco CHNS-932. Para o efeito pesou-se 1 mg de amostra numa microbalança Sartorius. A amostra foi colocada numa cápsula de prata e introduzida no forno (CHNS-932), onde a amostra foi totalmente queimada. Este instrumento recorre à detecção por infravermelho para a determinação da percentagem de massa de carbono e hidrogénio enquanto que o azoto é determinado usando um método baseado na condutividade térmica.

## 2.4 Preparação e Caracterização dos Filmes de Quitosano

### 2.4.1 Preparação dos filmes

Dissolveu-se o quitosano em ácido acético 0.1 mol/L por agitação à temperatura ambiente durante uma noite e filtração por filtro de placa porosa (G2). A esta solução adicionou-se glicerol, como plastificante, e aqueceu-se em banho a 60 °C durante 40 minutos, sob agitação moderada. Após arrefecer a solução foi desgaseificada durante aproximadamente 1 hora, sob vácuo. A massa de glicerol utilizada e a concentração inicial da solução de quitosano foram ajustadas por forma a obter concentrações finais de 0.5 % (m/V) de quitosano e 0.5 % (m/V) de glicerol. A solução (200 mL) foi colocada em placas de plexiglass 17 x 17 cm, previamente colocadas em suporte e niveladas (figura 2-5). Os filmes foram obtidos por evaporação do solvente a 35 °C durante 24 horas e foram removidos das placas por destacamento. Os filmes foram depois lavados com hidróxido de sódio 0.1 mol/L e água destilada até pH neutro; deixaram-se depois secar à temperatura ambiente.



**Figura 2-5** Esquema do suporte de preparação dos filmes

### 2.4.2 Ensaios de absorção (“swelling”)

A partir dos filmes preparados como descrito em § 2.4.1, cortaram-se amostras circulares com 3 cm de diâmetro. Estas amostras foram colocadas em estufa a 50 °C, durante 5 horas, e depois em exsiccador com pentóxido de fósforo ( $a_w \approx 0$ ) durante 48 horas. Antes da realização de cada ensaio mediu-se a espessura de cada filme, no centro de cada quadrante, com um micrómetro digital (Mitutoya Corp., Tóquio, Japão).

Os filmes foram então pesados ( $m_i$ ) e imersos em água destilada (pH 5.65) ou em solução tampão de pH (ácido cítrico/NaCl, pH = 3). Após períodos de tempo pré-definidos, retirou-se cada amostra, removeu-se o excesso de água/solução tampão com papel de filtro e determinou-se a respectiva massa ( $m_f$ ). Foram efectuadas, no mínimo, 3 réplicas. Para cada amostra, determinou-se a matéria seca antes e depois de cada ensaio, por forma a revelar eventuais perdas de massa após a imersão em água. O grau de inchamento ( $S_w$ ), relacionado com a capacidade dos filmes de absorverem água, definiu-se como:

$$S_w = \frac{m_f - m_i}{m_i} \times 100 \quad \text{Equação 2-6}$$

Sendo  $m_i$  e  $m_f$  a massa inicial e final, respectivamente, de cada amostra de filme em estudo.

### 2.4.3 Ensaios mecânicos

A partir dos filmes preparados como descrito em § 2.4.1, cortaram-se amostras rectangulares com 9 x 1 cm e acondicionaram-se durante dois dias numa atmosfera com 52 % de humidade relativa (HR) e uma temperatura de  $23 \pm 2$  °C. A espessura e a largura de cada amostra foram medidas com um micrómetro digital (Mitutoya Corp., Tóquio, Japão), considerando-se o valor médio de três medições aleatórias ao longo da tira de filme.

Os filmes foram acondicionados de novo durante mais dois dias nas mesmas condições anteriores. Os ensaios mecânicos foram realizados num texturómetro TA-Hdi (Texture Analyser da Stable Micro Systems). Trata-se de um equipamento com

interfaces de ligação para aquisição de dados em linha e controlo remoto, através do programa Texture Expert Exceed vs 2.64. Os filmes foram fixos na vertical, entre garras revestidas em borracha, deixando uma altura de filme exposto de 5 cm. Para minimizar o deslizamento durante cada ensaio, a fixação de cada extremidade do filme a cada garra foi auxiliada com fita adesiva. Por cada tipo de filme analisado foram realizadas um mínimo de 5 réplicas.

Realizaram-se dois tipos de ensaios: Ensaio de tensão até à ruptura do filme e ensaios de relaxação de tensão. Os ensaios de tensão até à ruptura basearam-se no método padrão ASTM D 882-83. Os filmes foram submetidos a uma deformação extensional a uma taxa de deslocamento de 0.5 mm/s até ocorrer ruptura da amostra. Com base na deformação aplicada e na tensão resultante (curvas tipo tensão vs. deformação), foram calculados os parâmetros mecânicos de interesse (§ 1.4.4.2): Tensões de cedência e ruptura, módulo de Young e percentagem de elongação.

No caso dos testes de relaxação de tensão, cada amostra de filme foi sujeita a uma deformação de 1% e a tensão necessária para manter esta deformação foi registada durante aproximadamente 30 minutos (curvas de relaxação - tensão vs. tempo). O valor da deformação (1%) foi escolhido de forma a garantir que o comportamento do material se encontrava dentro da zona de comportamento viscoelástico linear.

Às curvas de relaxação experimentais ajustou-se um modelo constituído por dois elementos de Maxwell com tensão limite ( $\sigma_e$ ), considerando o material como um sólido viscoelástico, com o módulo de relaxação a atingir um valor finito no tempo ( $E_e$ ) (Eq. 2-7). O ajuste aos dados experimentais foi realizado por regressão não linear (Statistica software v.6.0, StatSoft Inc.).

$$E(t) = E_e + E_1 e^{(-t/\tau_1)} + E_2 e^{(-t/\tau_2)} \quad \text{Equação 2-7}$$

Onde  $E(t)$  é o módulo de relaxação de tensão,  $E_e$  o valor limite para o módulo de relaxação ( $t \rightarrow \infty$ ),  $E_1$  e  $E_2$  e  $\tau_1$  e  $\tau_2$  são o componente módulo elástico e os tempos de relaxação, respectivamente, de cada elemento de Maxwell. Este modelo mecânico

ajustou-se bem aos valores obtidos, tendo-se obtido coeficientes de correlação ( $r^2$ ) entre, 0.988 e 0.994.

Os ensaios de tensão à ruptura e de relaxação de tensão realizaram-se a 23°C ( $\pm 2^\circ\text{C}$ )/50% ( $\pm 2\%$ ) HR.

#### 2.4.4 Determinação da Permeabilidade ao Vapor de Água (WVP)

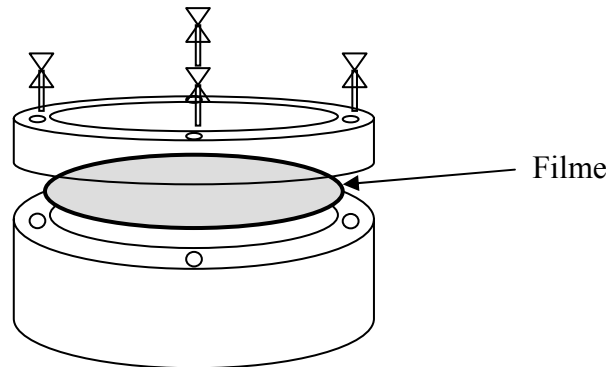
O método para determinação da permeabilidade ao vapor de água baseou-se no método do dessecador (“desiccant method”) preconizado no procedimento ASTM 96-95.

As amostras ensaiadas consistiram em alíquotas circulares, com 6 cm de diâmetro, obtidas a partir de filmes preparados como descrito em § 2.4.1. As alíquotas circulares foram acondicionadas a  $23 \pm 2^\circ\text{C}$  em atmosfera com aproximadamente 52 % HR (solução saturada de nitrato de magnésio), durante no mínimo 2 dias. A espessura dos filmes foi medida no centro de cada quadrante, com um micrómetro digital (Mitutoya Corp., Tóquio, Japão); para os cálculos a efectuar, considerou-se a média destes valores. Testaram-se filmes preparados a partir de quitosanos com diferentes graus de acetilação e diferentes massas moleculares.

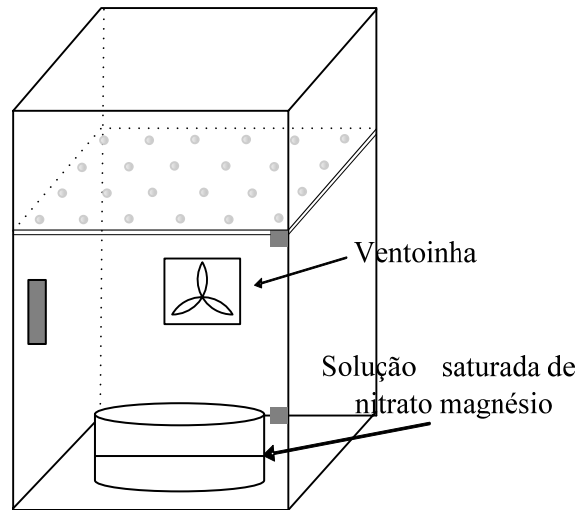
As amostras dos filmes foram aplicadas na “boca” de caixas circulares, onde previamente tinham sido colocados 16 a 17 g de cloreto de cálcio anidro, como agente dessecador (0% HR), previamente seco a 200 °C durante 2 horas, de forma a ficar cerca de 0.6 cm de altura entre o filme e o  $\text{CaCl}_2$ . Estas caixas foram construídas em polimetilmetacrilato (Plexiglas), com fundo tapado, com altura externa de 2 cm, diâmetro externo 8 cm, internamente com diâmetro de 5 cm e altura de 1.8 cm, e com quatro parafusos embutidos na face superior das paredes para roscas de orelhas (Figura 2-6). A fixação do filme efectuou-se com silicone e um anel de fixação, através dos quatro parafusos referidos. A área exposta do filme foi assim de 19.6 cm<sup>2</sup>.

As caixas foram rigorosamente pesadas ( $m_i$ ) e seguidamente colocadas num sistema fechado com circulação de ar (figura 2-7), conseguido através da incorporação de uma ventoinha (com uma velocidade de movimentação de ar de aproximadamente 152 m/min), e uma atmosfera de aproximadamente 52 % de humidade relativa, conseguida através de uma solução saturada de nitrato de

magnésio. A temperatura foi mantida a  $23 \pm 2^\circ\text{C}$ . No interior de cada sistema foi colocado um higrómetro/termómetro digital (Termo Hygro, Cole Parmer), para avaliar a humidade relativa e a temperatura durante o ensaio. Foram efectuadas 8 medições de massa, de hora em hora, durante 8 horas. Para cada filme foram efectuadas 3 réplicas.



**Figura 2-6** Esquema das caixas para a determinação de permeabilidade ao vapor de água.



**Figura 2-7** Esquema do sistema usado para a determinação da permeabilidade ao vapor de água.

A taxa de transmissão do vapor de água (WVTR) foi determinada usando a equação 2-8, (ASTM E 96-95). A análise linear do ganho de massa em função do tempo foi realizada para garantir que foram conseguidos fluxos de massa de vapor de água



através do filme no estado estacionário. Os coeficientes de correlação ( $r^2$ ) obtidos variaram entre 0.999 e 0.990.

$$WVTR = \frac{\text{Declive}}{\text{Área do filme exposto}} \quad \text{Equação 2-8}$$

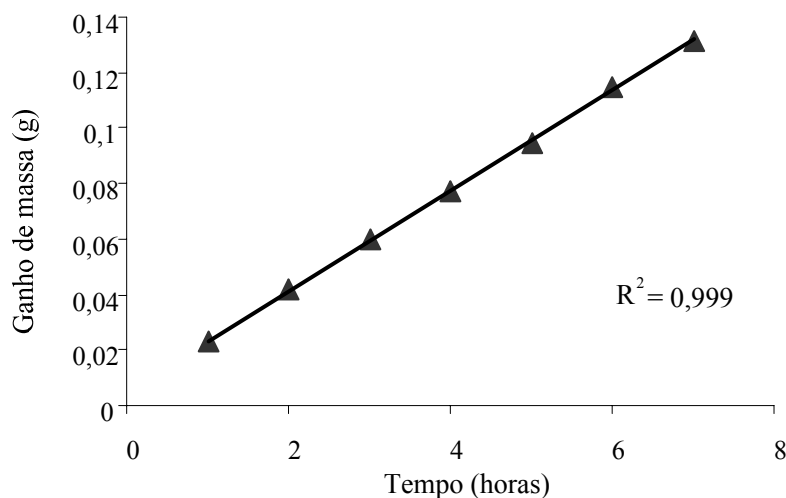
$$\text{Declive} = \text{Ganho de massa vs Tempo} \quad \text{Equação 2-9}$$

A permeabilidade ao vapor de água (WVP) foi determinada de acordo com a equação 2-10:

$$WVP = \frac{WVTR}{\Delta P} \times \text{espessura do filme} \quad \text{Equação 2-10}$$

Em que  $\Delta P = S \times (R_1 - R_2)$ ,  $S$  representa a pressão de saturação de vapor à temperatura do ensaio (1.672 kPa),  $R_1$  a humidade relativa da câmara exterior (HR= 49%) e  $R_2$  a humidade relativa do interior da caixa que contém o dessecador (HR= 0%).

Na figura 2-8 encontra-se uma das regressões lineares (ganho de massa vs tempo) obtida para uma das amostras testadas.



**Figura 2-8** Exemplo da regressão linear utilizada para calcular a WVTR.

### 2.4.5 Opacidade

O método para determinação da opacidade dos filmes baseou-se num método proposto por Young e Paulson (2000). Cortaram-se pequenas amostras de filmes de quitosano (aproximadamente 4 x 0.5 cm). As amostras foram acondicionadas numa atmosfera de HR=52% (obtida através de uma solução saturada de nitrato de magnésio) durante no mínimo 48 horas. Foi traçado um espectro de absorção de radiação electromagnética de comprimentos de onda entre 400 e 800 nm, num espectrofotómetro Perkin-Elmer Lambda 35 UV-vis. Determinou-se a área da banda expressa como unidades de absorvância (A) x comprimento de onda,  $A \times nm$ , com o auxílio do software UVwinlab.

A área determinada designou-se por opacidade.



## CAPITULO 3- RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 Caracterização da Quitina

Conforme descrito na secção 2.1 obteve-se quitina a partir do endo-esqueleto de potas, uma fonte ainda pouco explorada mas, sem dúvida, um importante recurso de biomassa a considerar. Nesta fase do trabalho, procedeu-se a uma breve caracterização da quitina obtida a partir de estiletos de pota ( $\beta$ -quitina) e estabeleceu-se a comparação com uma quitina obtida a partir de cascas de caranguejo ( $\alpha$ -quitina comercial da Sigma). Efectuaram-se determinações de humidade, cinzas e azoto de acordo com métodos oficiais (AOAC). O azoto protéico foi determinado subtraindo o valor teórico de azoto para cada quitina, considerando o respectivo grau de acetilação, ao valor de azoto total determinado pelo método de Kjeldahl. O teor protéico determinou-se com base no azoto protéico multiplicado pelo factor 6,25 (No *et al*, 1989). Os resultados obtidos encontram-se na **tabela 3-1**.

**Tabela 3-1** Exemplo de resultados obtidos nas determinações de cinzas, humidade das amostras obtidas.

Amostra	Humidade (%)	Cinzas (%)	Azoto total (%)	Proteínas (%)
$\beta$ - Quitina	8.7 $\pm$ 0.1	0.084 $\pm$ 0.003	7.32 $\pm$ 0.07	1.62
$\alpha$ - Quitina	10.2 $\pm$ 0.2	0.92 $\pm$ 0.02	7.46 $\pm$ 0.05	2.31

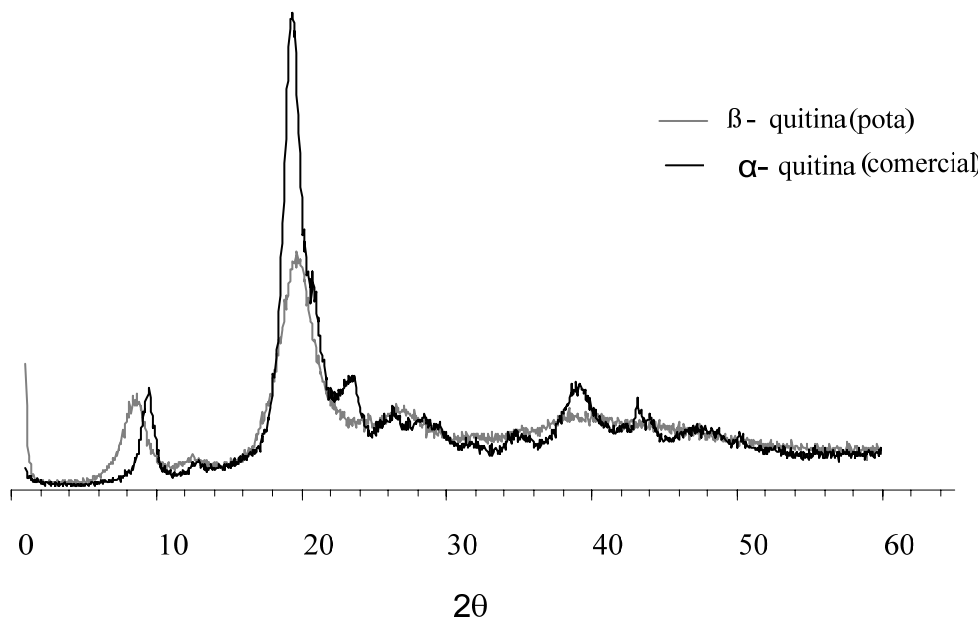
A cristalinidade de cada amostra foi estudada por difracção de raio-X. O grau de acetilação foi determinado por espectroscopia de infravermelho (FT-IR) e de  $^{13}\text{C}$  RMN de estado sólido. A massa molecular foi determinada com base no valor de viscosidade intrínseca obtida por viscosimetria capilar. Comparou-se ainda o comportamento reológico das duas quitinas em solvente polar aprótico (*N,N*-dimetilacetamida/cloreto de lítio).

### 3.1.1 Cristalinidade

Dependendo da fonte de onde é extraída a quitina apresenta diferentes estruturas a nível de cristalinidade. Como já foi referido a quitina apresenta três formas polimórficas,  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ -quitina. Estas formas diferem entre si na disposição das cadeias dentro das regiões cristalinas.

A figura 3-1 apresenta os difractogramas obtidos para as duas formas de quitina estudadas, a  $\beta$ - quitina extraída a partir dos estiletes de pota e a  $\alpha$ - quitina uma quitina comercial obtida a partir das cascas de caranguejo.

Os espectros de difracção de raio-X mostram as diferenças na cristalinidade destas duas quitinas. A  $\alpha$ - quitina apresenta picos cristalinos a  $2\theta = 9.8$  e  $19.4^\circ$ , enquanto que a  $\beta$ - quitina deu origem a bandas mais largas ocorrendo picos a  $2\theta = 8.8$  e  $20.3^\circ$ , sendo a partir deste último pico completamente amorfa, indicando uma cristalinidade mais baixa ou um menor empacotamento da cadeia principal quando comparada à  $\alpha$ -quitina. Estes resultados estão de acordo com os estudos efectuados por outros investigadores (Kim *et al*, 1996).



**Figura 3-1** Difractogramas de raio-X de  $\beta$ - e  $\alpha$ -quitina.

Os índices de cristalinidade, ou grau de ordenamento, de polímeros podem ser determinados a partir de análises de difracção de raio-X. O índice de cristalinidade

das amostras de quitina em estudo determinou-se através da expressão (Li *et al*, 1997):

$$\% I_{CR} = \frac{I_C - I_A}{I_C} \times 100 \quad \text{Equação 3-1}$$

Onde % I<sub>CR</sub> é o índice de cristalinidade, e I<sub>C</sub> e I<sub>A</sub> são as intensidades difractadas relativas às regiões cristalinas (2θ ≅ 20°) e amorfas (2θ ≅ 10°), respectivamente. Pode concluir-se pelos resultados obtidos (tabela 3-2) que, de facto, a cristalinidade da α-quitina é superior à da β-quitina.

Segundo a literatura, a dimensão média dos cristalitos na direcção perpendicular ao plano [110] é inversamente proporcional à largura do sinal correspondente às regiões cristalinas (2θ ≅ 20°) no ponto em que a sua intensidade é a metade da intensidade máxima. A dimensão média dos cristalitos (D<sub>AP</sub> ; Å) é dada por (Campana e Signini, 2001):

$$D_{AP} = \frac{K\lambda}{\beta_0 \cos \theta} \quad \text{Equação 3-2}$$

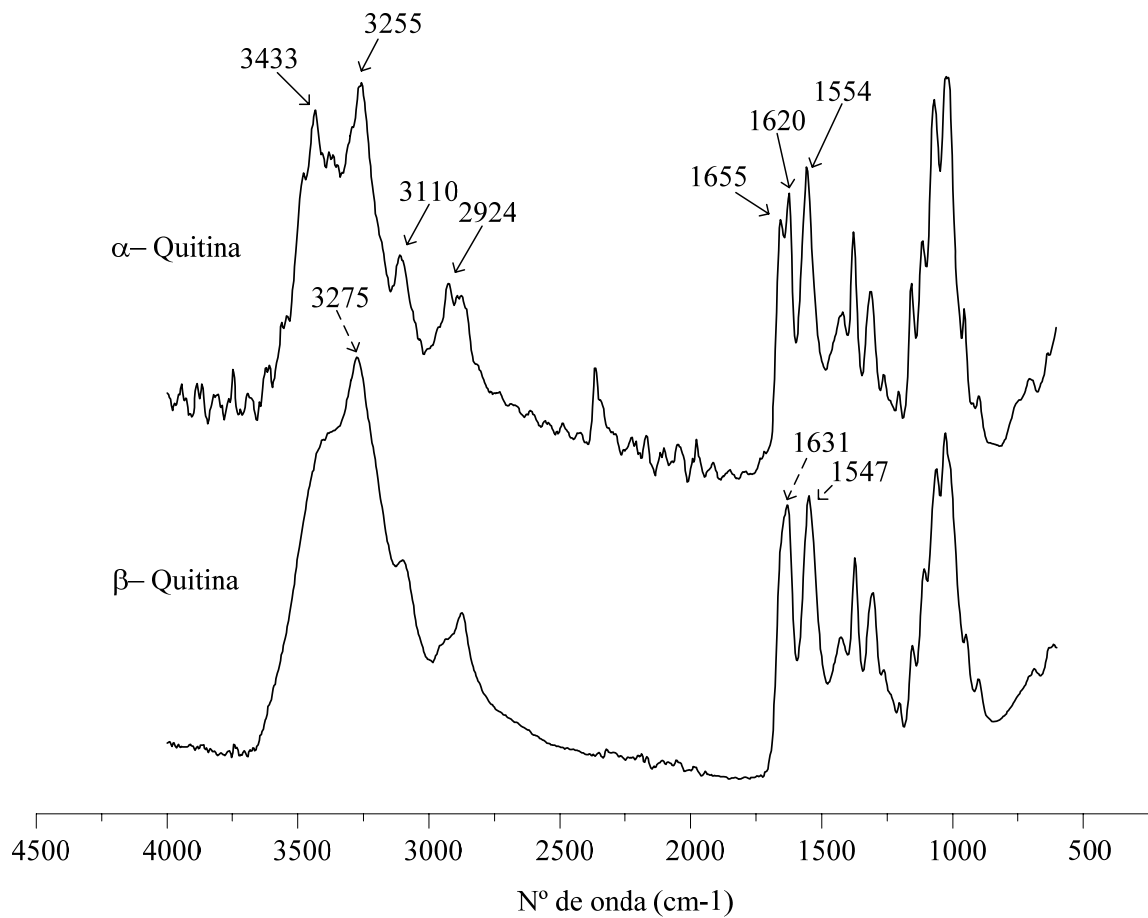
sendo K uma constante igual a 0.9, λ é o comprimento de onda (1.54056 Å) da radiação utilizada, β<sub>0</sub> (em radianos) é a largura do sinal devido às regiões cristalinas no ponto de média intensidade e θ (radianos) é a metade do ângulo de Bragg correspondente ao sinal mais intenso. Os resultados obtidos são apresentados na tabela 3-2. Pode verificar-se que a α- quitina possui cristalitos de maiores dimensões, sendo concordante com o índice de cristalinidade, uma vez que quanto maior a cristalinidade maior o diâmetro dos cristalitos.

**Tabela 3-2** Índice de cristalinidade e dimensão média dos cristalitos

Quitina	% I <sub>CR</sub>	D <sub>AP</sub> (Å)
β- quitina	63.7	153.5
α- quitina	81.3	292.5

### 3.1.2 Análise por Infravermelho e RMN de estado sólido ( $^{13}\text{C}$ )

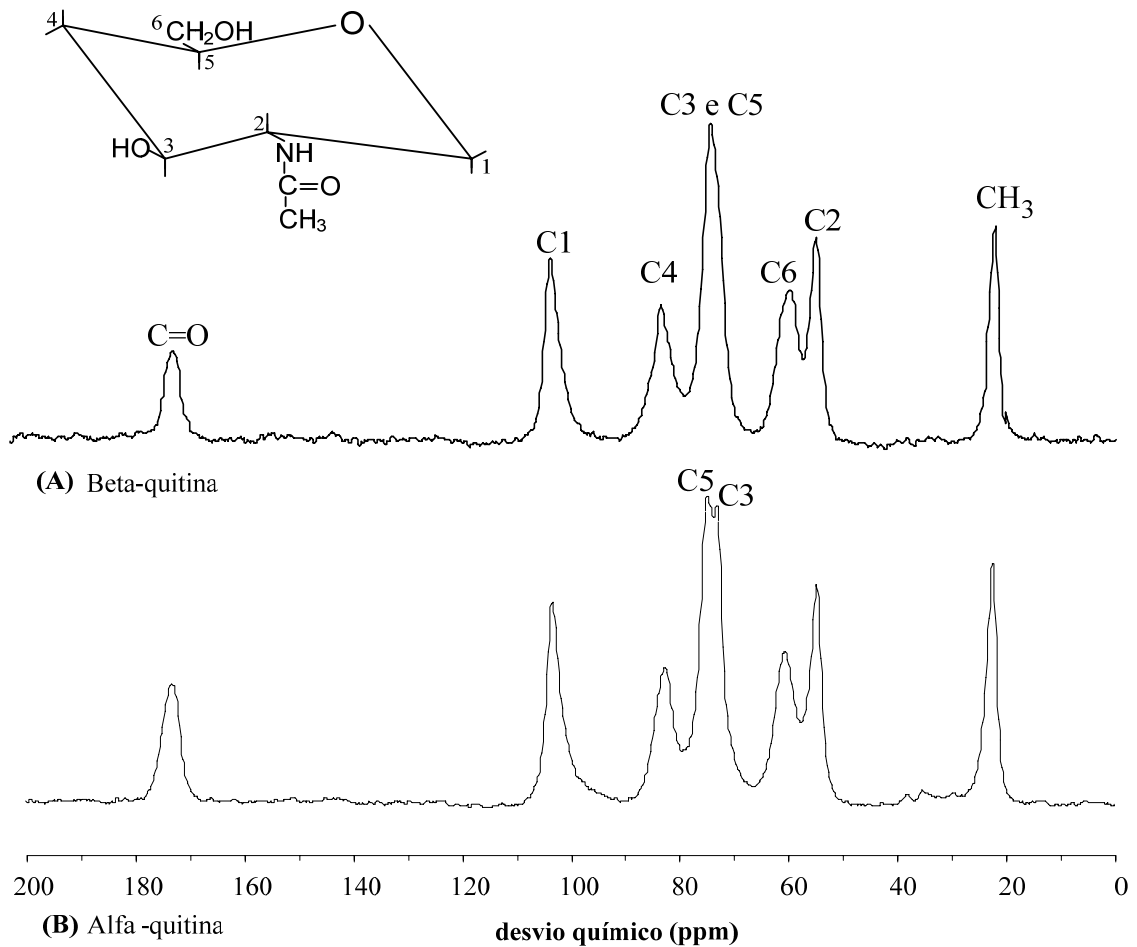
As  $\alpha$  e  $\beta$ -quitinas podem distinguir-se através de espectros de FT-IR devido às diferentes pontes de hidrogénio que estabelecem. A figura 3-2 mostra os espectros de FT-IR da  $\beta$ -quitina (quitina de potas) e da  $\alpha$ -quitina (quitina de caranguejo – amostra comercial Sigma). Na  $\alpha$ -quitina observam-se duas bandas de absorção a 1654 e 1619  $\text{cm}^{-1}$  e na  $\beta$ -quitina ocorre apenas uma banda a 1631  $\text{cm}^{-1}$ . Na  $\alpha$ -quitina, uma parte dos grupos carbonilo estão ligados através de pontes de hidrogénio aos grupos amina no interior da mesma cadeia ( $\text{C}=\text{O}\cdots\text{H}-\text{N}$ ) que é responsável pelo modo vibracional a 1654  $\text{cm}^{-1}$ . Os restantes produzem o mesmo tipo de pontes e ainda outro tipo com o grupo  $-\text{CH}_2\text{OH}$  da cadeia lateral. Esta ligação entre as cadeias é a responsável pela elevada estabilidade química da  $\alpha$ -quitina. Na  $\beta$ -quitina os grupos amida participam apenas no primeiro tipo de ligações de hidrogénio e a amida I aparece a 1631  $\text{cm}^{-1}$ , com um desvio de 23  $\text{cm}^{-1}$  relativamente à banda da  $\alpha$ -quitina devido à ligação  $\text{C}=\text{O}\cdots\text{H}-\text{N}$  ser ligeiramente maior. Na região correspondente aos grupos  $-\text{OH}$  e  $-\text{NH}$  (entre 3600-3000  $\text{cm}^{-1}$ ), a  $\alpha$ -quitina exibe uma estrutura mais detalhada que a  $\beta$ -quitina. Este facto é atribuído aos diferentes empacotamentos das macromoléculas. O pico que aparece a 3433  $\text{cm}^{-1}$  é atribuído às pontes de hidrogénio intramoleculares envolvendo  $\text{OH}(6)\cdots\text{O}=\text{C}$ ; este tipo de ligação não ocorre na  $\beta$ -quitina. Na  $\alpha$ -quitina as bandas a 3255 e 3110  $\text{cm}^{-1}$  são atribuídas aos modos vibracionais do grupo  $\text{NH}$  da amida (ponte de hidrogénio entre os grupos  $\text{C}=\text{O}\cdots\text{H}-\text{N}$ ).



**Figura 3-2** Espectro de FT-IR de amostras de quitina

Na figura 3-3 encontram-se os espectros de RMN- $^{13}\text{C}$  da  $\beta$ -, $\alpha$ -quitina. Pode-se verificar que as duas formas de quitinas se distinguem através do pico que se encontra entre os 70 e os 80 ppm. Na  $\alpha$ -quitina é visível o desdobramento correspondente aos carbonos C3 e C5. Este facto é atribuído às diferentes configurações de C3 e C5 como resultado das diferentes pontes de hidrogénio formadas.





**Figura 3-3** Espectros de  $^{13}\text{C}$  RMN de estado sólido para amostras de quitina: (A)  $\beta$ -quitina obtida a partir dos estiletos de pota (GA=89%); (B)  $\alpha$ -quitina comercial obtida a partir de cascas de caranguejo (GA=87%)

### 3.1.3 Grau de Acetilação

Com base nos espectros de FT-IR e de RMN obtidos para cada amostra de quitina, determinou-se o grau de acetilação de acordo com os critérios descritos em § 2.3.2 e em § 2.3.6, respectivamente. A tabela 3-3 apresenta os resultados obtidos.

**Tabela 3-3.** GA obtido por FT-IR e RMN  $^{13}\text{C}$ 

Amostra	GA/FTIR	GA/RMN
$\beta$ - Quitina	$80 \pm 2$	$89 \pm 1 \%$
$\alpha$ - Quitina	$81 \pm 4$	$87 \pm 1 \%$

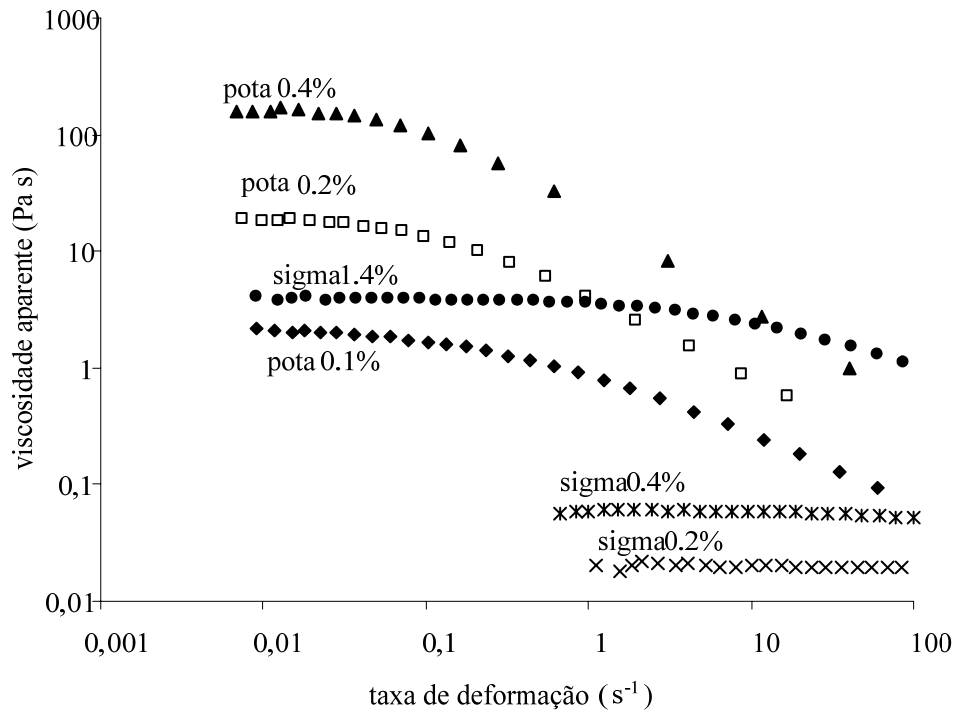
### 3.1.4 Massa Molecular

A massa molecular média viscosimétrica ( $M_v$ ) das quitinas foi determinada de acordo com o descrito na secção 2.3.3.

Obtiveram-se valores de viscosidades intrínsecas de 48.4 dL/g e de 37.6 dL/g para a  $\beta$ - e  $\alpha$ -quitina, respectivamente, em DMAc-5%LiCl, correspondendo a massas moleculares médias de  $1.7 \times 10^6$  Da e  $1.2 \times 10^6$  Da, respectivamente.

### 3.1.5 Viscosidade

As soluções de quitina de potas e quitina comercial foram preparadas segundo o procedimento descrito na secção 2.3.5. A figura 3-4 apresenta os resultados obtidos para as soluções de quitina de pota entre 0.1 e 0.4% (m/V) e para as soluções de quitina sigma entre 0.2 e 1.4% (m/V).



**Figura 3-4** Viscosidade aparente vs taxa de deformação de soluções de quitina de potas e de quitina comercial (Sigma)

Verificou-se que o comportamento reológico da quitina comercial e da quitina obtida a partir de potas apresenta diferenças significativas. A viscosidade das duas soluções é muito diferente, sendo necessária uma concentração 7 vezes superior da solução de quitina comercial para se atingir a viscosidade da quitina de potas. As soluções preparadas a partir da amostra de quitina comercial exibiram comportamento newtoniano a concentrações de 0.2 e 0.4% e mesmo a concentrações mais altas (1.4%) o desvio deste comportamento não é muito pronunciado. Em contraste, as soluções de quitina de potas mesmo a 0.1% (m/V) apresentam um comportamento pseudoplástico, mesmo a taxas de deformação baixas.

### 3.2 Obtenção de Quitosano

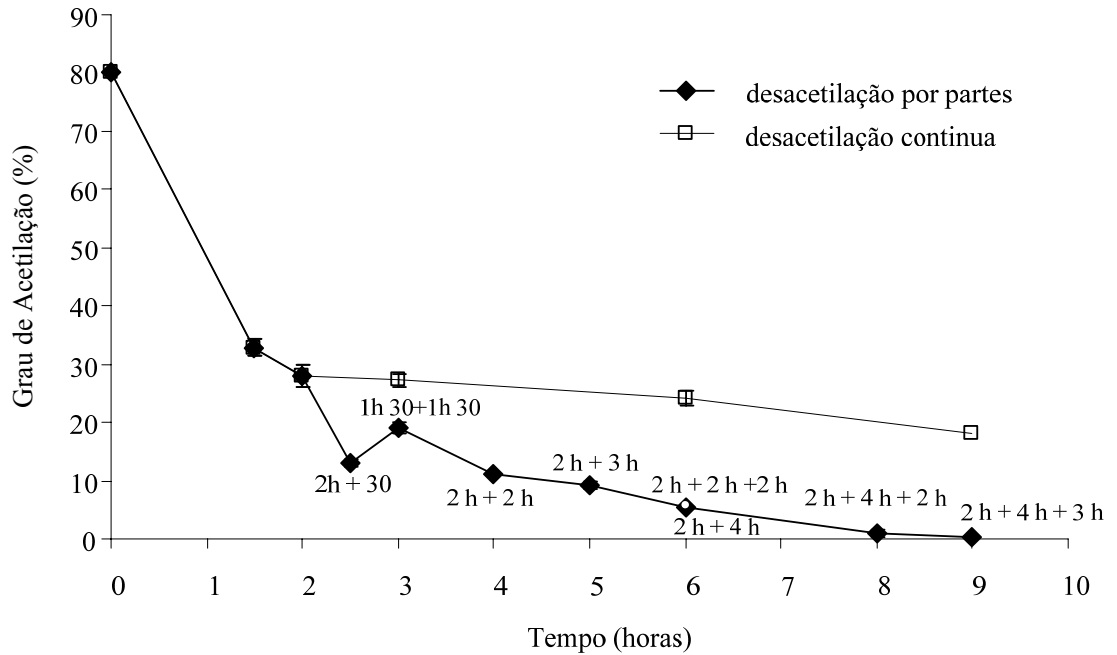
Como foi descrito na secção 2.2.2, o quitosano foi obtido através da desacetilação alcalina da quitina obtida a partir dos estiletos de pota. Efectuaram-se dois tipos de desacetilação: a desacetilação continua e a desacetilação por partes.

O objectivo da desacetilação foi o de se obter uma gama de amostras solúveis com diferentes graus de acetilação e, ao mesmo tempo, através das condições já referidas, a obtenção de um quitosano totalmente desacetilado, sem que a massa molecular sofresse grandes alterações.

As amostras de quitosano permaneceram sempre de cor branca ao contrário do que foi descrito por Kurita *et al* (1993). Este facto estará relacionado com a incorporação de boro hidreto de sódio quer no tratamento contínuo, quer no tratamento descontínuo, evitando assim a degradação da amostra. Rhazi *et al* (2000) concluíram que a atmosfera (ausência/presença de oxigénio) e a presença de um agente redutor como o boro hidreto de sódio, possibilita melhorar as características físico-químicas do quitosano, particularmente da massa molecular, enquanto permite a obtenção de quitosanos com baixo grau de acetilação.

A extensão da reacção de desacetilação foi determinada a partir da determinação do grau de acetilação em função do tempo de reacção.

Pela figura 3-5 pode concluir-se que na desacetilação continua o aumento do tempo de desacetilação não produz quitosanos significativamente mais desacetilados após um período de duas horas de desacetilação, facto também verificado por outros investigadores (Thsai *et al*, 2003 e Chang *et al*, 1997). Pode concluir-se ainda, através deste gráfico, que a desacetilação quando realizada descontinuamente é mais eficaz do que o processo contínuo, conseguindo mesmo obter-se um quitosano totalmente desacetilado para um período de tempo global de 9 h (2+4+3 h). Diferentes investigadores (Domard e Rinaudo, 1983; Kurita *et al*, 1993; McLean *et al*, 1997) testaram também diferentes tempos de desacetilação e concluíram que são necessários vários tratamentos consecutivos com hidróxido de sódio para produzir quitosanos mais desacetilados.



**Figura 3-5** Representação do GA em função dos tempos de desacetilação e graus de acetilação obtidos para a  $\beta$ -quitina (*condições de reacção*: relação de 1:20 (m/V), NaOH 40 %, 70 °C).

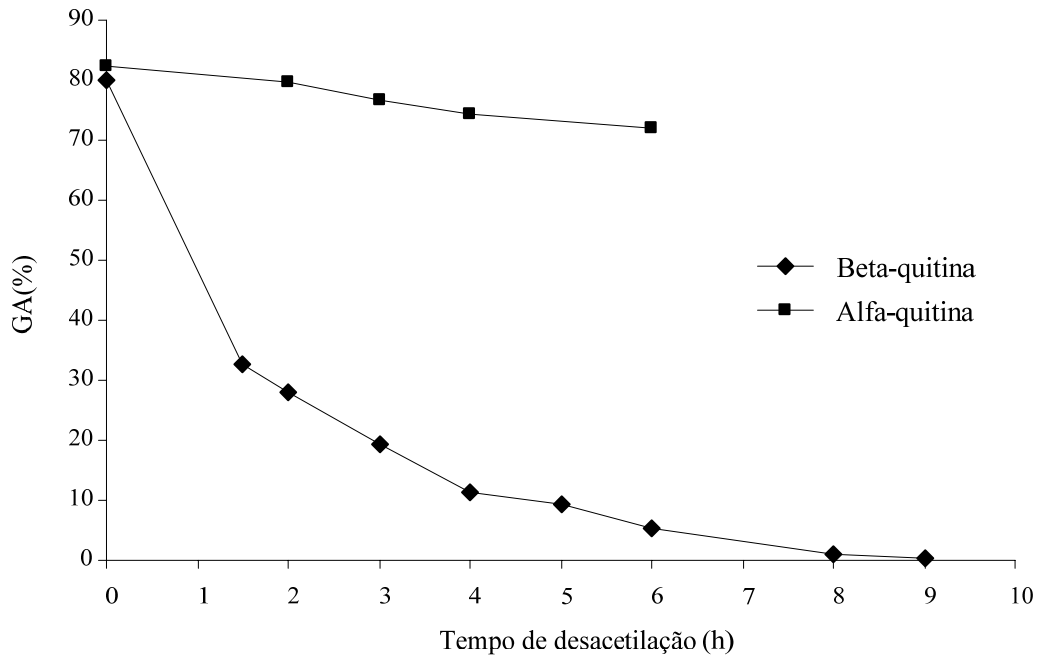
### Análise da desacetilação descontínua

Primeiramente, optou-se por desacetilar a quitina durante 2 horas, considerando-se esta como a amostra de partida para as desacetilações seguintes. A escolha deste período de tempo baseou-se na comparação dos graus de acetilação obtidos durante três períodos iniciais, o de 1h 30 minutos, o de 2 horas e o de 3 horas. Verificou-se que a desacetilação durante o período de 2 horas era mais eficaz do que o período de 1h 30 minutos, mas produzia quitosanos de graus de acetilação similares aos do período de 3 horas, não existindo, por isso, nenhuma vantagem em desacetilar inicialmente a quitina durante um período mais longo. Foram descritos (Chang *et al*, 1997) resultados similares para quitina obtida a partir de camarão, no caso, a desacetilação durante 2 horas produzia cerca de 70 % de desacetilação em relação à amostra inicial, e num período de mais uma hora (total de 3 horas) verificou-se um decréscimo de apenas 3 % em relação à amostra com 2 horas de desacetilação.

Considerando a desacetilação da  $\beta$ -quitina representada na figura 3-5 verifica-se que após as duas horas de desacetilação, 30 minutos são suficientes para reduzir a metade o grau de acetilação; verifica-se ainda que após este período são necessárias mais 4 horas, independentemente de serem 2 h + 2 h ou 4 horas seguidas, para se voltar a verificar uma redução significativa do grau de acetilação. Estes factos podem ser confirmados através da velocidade da reacção (secção 3.2.2), ou seja, quanto maior o tempo de reacção, menor é a taxa de aumento da desacetilação.

Segundo Kurita *et al* (1993) a desacetilação heterogénea dá-se preferencialmente nas zonas amorfas da quitina, e depois prossegue do exterior para o interior da zona cristalina. Segundo esta teoria poderia-se justificar as variações na velocidade da reacção de desacetilação. Por outro lado, deve ocorrer o equilíbrio na reacção de desacetilação, à medida que se formam resíduos de D- glucosamina. A partir do momento que se renova a solução de NaOH (40%) no meio reaccional a velocidade de reacção sobe e a taxa de desacetilação aumenta.

Tendo-se concluído que a desacetilação descontínua é mais eficaz que a contínua, procedeu-se à desacetilação descontínua da  $\alpha$ -quitina (amostra comercial da Sigma), de forma a se efectuar um breve estudo comparativo da reactividade das duas quitinas em meio alcalino. A figura 3-6 traduz o gráfico de GA vs tempo de reacção para a  $\alpha$ -quitina e para a  $\beta$ -quitina de forma a ser mais clara a comparação entre as duas quitinas. A reacção foi conduzida nas condições descritas anteriormente (relação de 1:20 (m/V), NaOH 40 %, 70 °C).

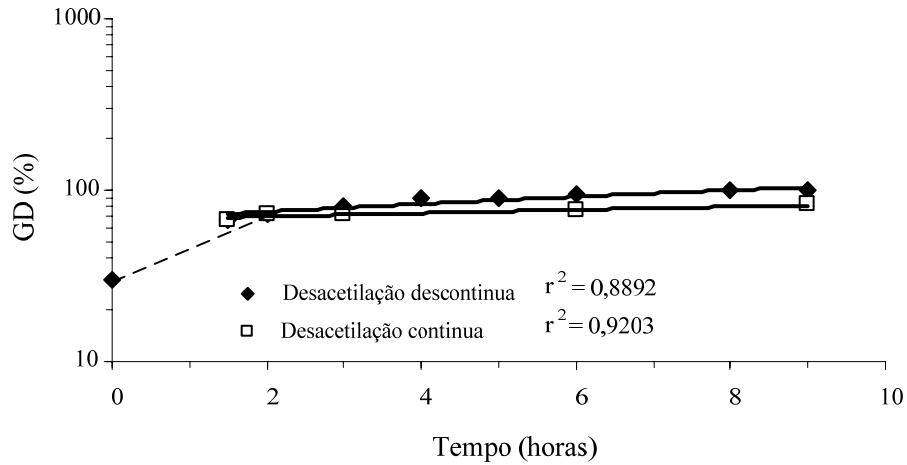


**Figura 3-6** Representação dos tempos de desacetilação e graus de acetilação obtidos para a  $\alpha$ -quitina e  $\beta$ -quitina (através da desacetilação descontínua).

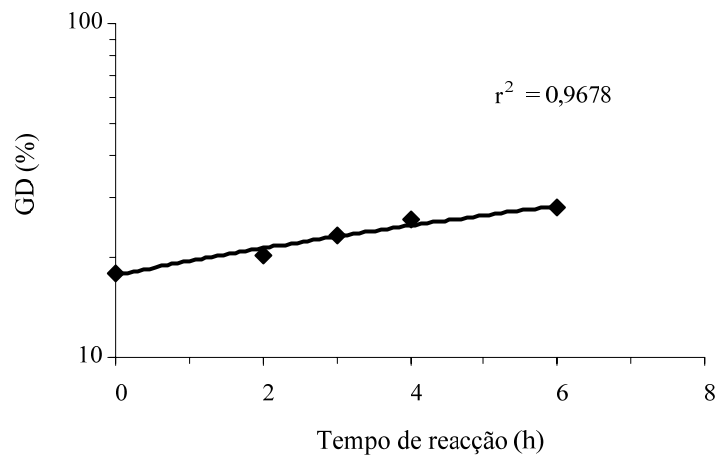
A figura 3-6 permite concluir que, nas condições estudadas, a desacetilação da  $\alpha$ -quitina ocorre em muito menor extensão do que o verificado para a  $\beta$ -quitina. Verifica-se que após 6 h de reacção o GA é de 72 % para a  $\alpha$ -quitina e de 5% para a  $\beta$ -quitina. A  $\alpha$ -quitina tem uma velocidade de desacetilação muito inferior uma vez que, como já foi referido, possui uma estrutura altamente organizada, tendo os grupos OH dificuldade em penetrar nas cadeias do polímero e proceder à remoção dos grupos acetilo.

### 3.1.6 Ordem e Velocidade de desacetilação

Traçando o gráfico do logaritmo do grau de desacetilação (GD; %) em função do tempo, no caso da  $\beta$ -quitina, obtém-se uma relação linear (figura 3-7) após o período de 2 horas de desacetilação indicando que a reacção é de primeira ordem. A velocidade de reacção da  $\alpha$ -quitina é também de primeira ordem como se pode verificar pela figura 3-8.



**Figura 3-7** Determinação da ordem de reação para a desacetilação contínua e descontínua da  $\beta$ -quitina.



**Figura 3-8** Determinação da ordem de reação para a desacetilação descontínua da  $\alpha$ -quitina.

A velocidade de desacetilação pode-se definir como a variação da desacetilação em relação à amostra inicial por período de tempo ( $t$ ), segundo a fórmula:

$$R_{GD} = \frac{(GD_t - GD_0)}{t} \quad \text{equação 3-3}$$



Em que  $GD_t$  representa o grau de desacetilação ao tempo  $t$  e  $GD_0$  representa o grau de desacetilação da amostra inicial. As velocidades de reacção obtidas para a desacetilação continua estão representadas na tabela 3-4.

**Tabela 3-4** Velocidade de reacção ( $R_{GD}$ ) na desacetilação contínua

Tempo de reacção	Velocidade de reacção ( $R_{GD}$ )
$R_{GD0,1.5}$	24.8
$R_{GD0,2}$	20.9
$R_{GD0,3}$	14.2
$R_{GD0,6}$	7.6
$R_{GD0,9}$	5.7

Os resultados obtidos para a desacetilação continua mostram que no inicio a taxa de desacetilação aumenta rapidamente,  $R_{GD 0,1.5} = 24.8 \text{ \% / h}$ , decrescendo à medida que se aumenta o tempo de reacção.

Quanto à desacetilação descontinua, no início a desacetilação dá-se muito rapidamente, tal como se verifica para a desacetilação continua. A velocidade de reacção após duas horas de reacção é de  $R_{GD0,2} = 20.9 \text{ \% / h}$ , no entanto, a velocidade durante as duas horas ( $R_{GD2,2}$ ; total de 4 horas) seguintes decresce para  $8.4\% / h$  e à medida que o número de horas de reacção aumenta a velocidade da reacção continua a decrescer.

**Tabela 3-5** Velocidade da reacção descontínua ( $R_{GD}$ )

$R_{GD}$	Velocidade da reacção
$R_{GD0,2}$	20.9
$R_{GD 2,2}$	8.3
$R_{GD 2,3}$	6.2
$R_{GD 4,2}$	3.0
$R_{GD 6,2}$	2.5
$R_{GD 6,3}$	1.6

As amostras utilizadas na produção de filmes foram obtidas através da desacetilação descontínua e encontram-se descritas na tabela 3-6. As amostras foram caracterizadas através de raio-X e FT-IR. Realizou-se ainda o estudo do comportamento reológico e da solubilidade (secção 3.3). A gama de GA encontra-se entre 0 e 27%.

**Tabela 3-6** Tempo de desacetilação vs. GA obtido.

Tempo de desacetilação	Grau de acetilação (%)
2 horas	27
1 h 30 + 1 h 30 minutos	20
2 h + 30 minutos	13
2 + 4 horas	6
2 + 4 + 3 horas	0

### 3.1.7 Tratamento alcalino vs massa molecular

Verificou-se que a viscosidade aparente das soluções dos quitosanos obtidos diminui das amostras mais acetiladas para as menos acetiladas. No entanto, esta diminuição poderia ser atribuída não só ao grau de acetilação como à massa molecular. Contudo, não foi possível determinar a massa molecular dos quitosanos mais acetilados uma vez que, a solubilidade é muito reduzida nos solventes descritos na literatura para a determinação da massa molecular. Nas amostras menos acetiladas verificou-se que a massa molecular não variava grandemente com o aumento do tempo de desacetilação, obtendo-se uma gama de massas moleculares de 1471-1512 KDa (tabela 3-7). Os resultados obtidos para as massas moleculares e para a viscosidade intrínseca dos diferentes quitosanos, não são significativamente diferentes a  $p < 0.05$ . Contudo, não se pode afirmar, sem o cálculo das restantes massas moleculares, se existiu ou não uma redução significativa da massa molecular. Porém, as massas moleculares determinadas são relativas a tratamentos alcalinos mais intensos, não sendo por isso de esperar que no tratamento mais curto exista uma redução significativa de massa molecular. Efeitos similares foram descritos por Kittur *et al* (2002) e por Zhang e Neau (2001) para quitosanos comerciais.

**Tabela 3-7** Viscosidade intrínseca e massa molecular de quitosanos com diferentes GA

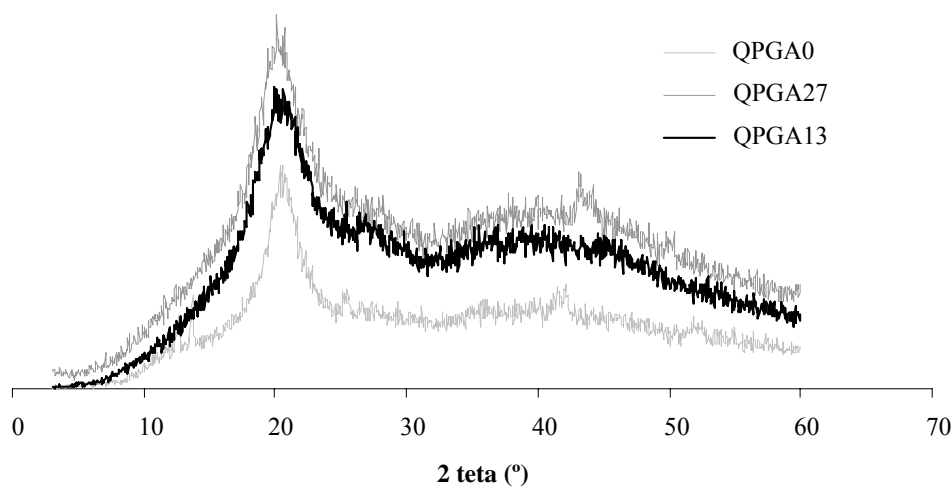
Quitosano	$[\eta]$ (dL/g)	Mv (kDa)
QPGA0	25.44	1512
QPGA6	25.84	1529
QPGA13	24.09	1471

## 3.2 Caracterização de Quitosanos

### 3.2.1 Cristalinidade

#### Quitosano de Pota

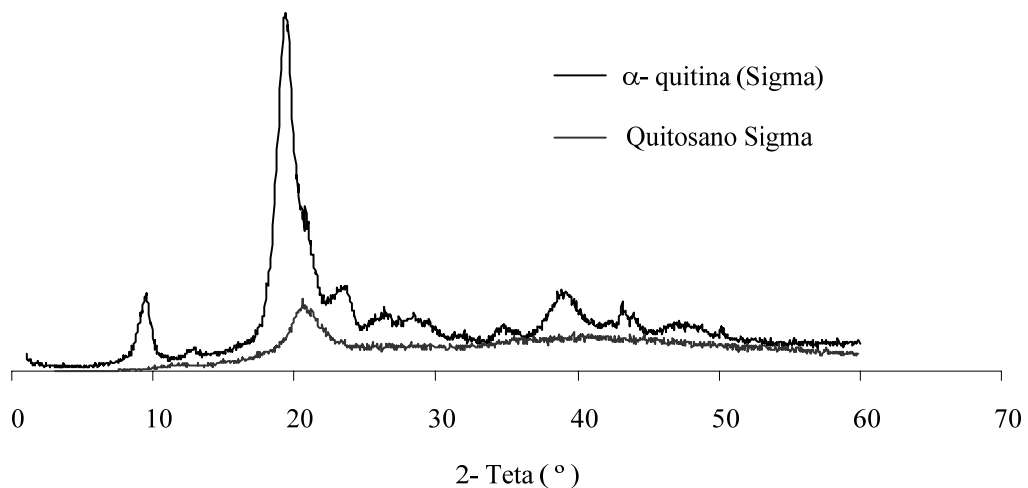
O uso da difração de raios-X permite distinguir claramente a quitina de partida dos seus derivados desacetilados. De facto, o difratograma de  $\beta$ - quitina (figura 3-1) apresenta sinais mais resolvidos e em maior número do que observado nos difratogramas de quitosanos (figura 3-9) o que é atribuído à existência de domínios cristalinos, maiores e em maior número no caso da quitina. A desacetilação provocou uma perda na estrutura cristalina da  $\beta$ -quitina. A desacetilação de duas horas provocou uma diminuição acentuada da cristalinidade da quitina tendo desaparecido o pico a  $2\theta = 8.8^\circ$  e o pico que aparecia a  $20.3^\circ$  tornou-se numa banda larga e de intensidade mais baixa. Ao aumentar o número de horas de desacetilação a perda de cristalinidade tornou-se cada vez mais acentuada (diminuição da intensidade). No entanto, apesar da perda de cristalinidade ser acentuada, mesmo para o grau de acetilação 0 % não se verificou a obtenção de uma estrutura totalmente amorfa, ao contrário do que foi descrito por Kurita *et al* (1993), para GA= 3 %. O cálculo do índice de cristalinidade não foi determinado para as amostras sujeitas à desacetilação uma vez que a redução de cristalinidade é elevada apresentando já sinais pouco intensos, típicos de amostras com um índice amorfo muito acentuado.



**Figura 3-9** Espectros de Raios-X de quitosanos de pota com diferentes graus de acetilação.

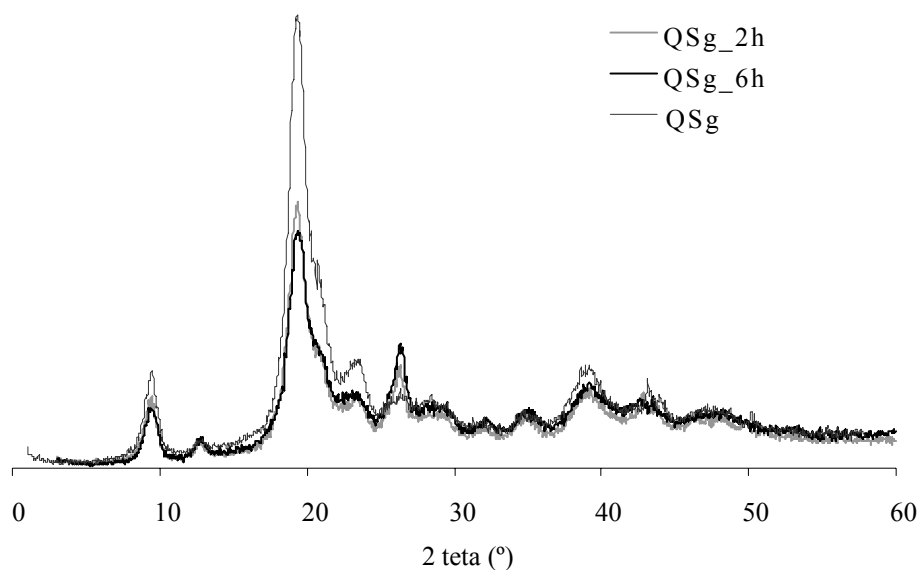
### Quitosanos Comerciais

Geralmente, as amostras comerciais de quitosanos são heterogêneas e os graus de acetilação encontram-se na gama dos 10-40 %. A heterogeneidade destes quitosanos resulta do processamento não controlado da quitina que se traduz não só na desacetilação como na elevada despolimerização (Cardenas *et al*, 2004). Esta elevada despolimerização provoca a perda de cristalinidade, como podemos observar quando comparamos as amostras comerciais de  $\alpha$ -quitina e quitosano comercial (obtido a partir de  $\alpha$ -quitina) (figura 3-10). Verifica-se que a desacetilação provoca grandes alterações até na estrutura altamente organizada da  $\alpha$ -quitina. Neste caso, não foi mais uma vez determinado o índice de cristalinidade, uma vez que o quitosano é essencialmente amorfo.



**Figura 3-10** Difractograma de raio- X das amostras de comerciais de quitina e quitosano.

Como se pode verificar pela figura 3-11 a desacetilação da  $\alpha$ -quitina nas condições já descritas (secção 2.1.1) provoca uma diminuição da cristalinidade. No entanto, a diminuição da cristalinidade não é muito acentuada, uma vez que após 6 horas de desacetilação a perda de cristalinidade é de apenas 6% (tabela 3-8). A dimensão dos cristalitos também não é muito afectada após 6 horas de tratamento alcalino sendo a diferença de apenas 80Å em relação à quitina.



**Figura 3-11** Difractograma de raio- X das amostras de  $\alpha$ -quitina (QSg) e das quitinas sujeitas ao tratamento de desacetilação (durante 2 e 6 horas), respectivamente QSg\_2h e QSg\_6h.

**Tabela 3-8** Índice de cristalinidade ( $I_{CR}$ ) e dimensão média dos cristalitos (D)

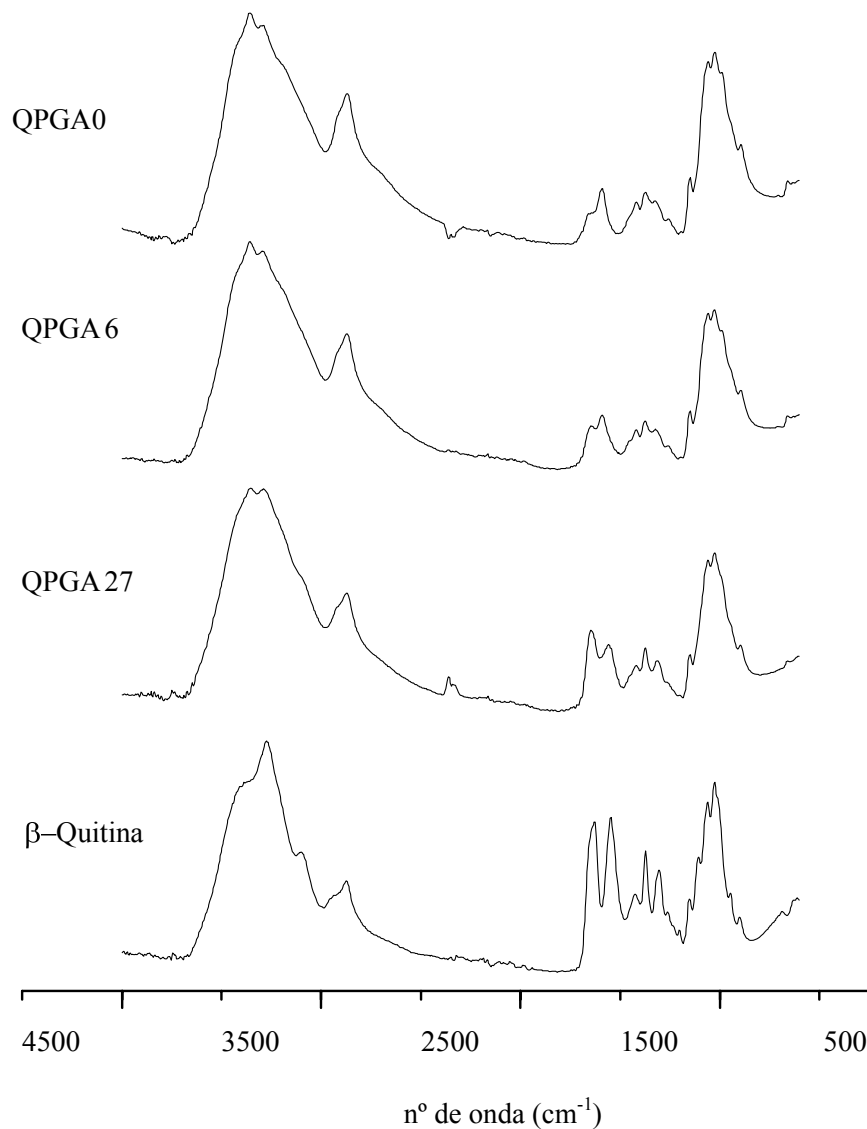
Amostras	% $I_{CR}$	D (Å)
QSg_2h	77,2	247,6
QSg_6h	76,3	211,2

### 3.2.2 Análise dos espectros de IV

As principais bandas observadas nos espectros IV das amostras de quitosano são: A banda de estiramento axial do grupo OH entre 3440 a 3480  $\text{cm}^{-1}$ , a qual aparece sobreposta à banda de estiramento do grupo N-H; a deformação axial de C = O de amida I (entre 1661 a 1671  $\text{cm}^{-1}$ ); a deformação angular de N-H (entre 1583 a 1594  $\text{cm}^{-1}$ ); deformação angular simétrica de  $\text{CH}_3$  (entre 1380 a 1383  $\text{cm}^{-1}$ ); a deformação axial de -CN de amida (por volta de 1425  $\text{cm}^{-1}$ ) e a deformação axial de -CN de grupos amina (entre 1308 a 1380  $\text{cm}^{-1}$ ), além de bandas de estruturas polissacarídicas na região de 890 – 1156  $\text{cm}^{-1}$ .

Na figura 3-12 apresentam-se os espectros de FT-IR dos quitosanos obtidos através da desacetilação da  $\beta$ -quitina durante 2 horas, 2 + 4 horas e 2 + 4 + 3 horas e da  $\beta$ -quitina original. Todas as bandas características são muito semelhantes às descritas por

Brugnerotto *et al* (2001) e estão presentes em todas as amostras investigadas, mostrando que todas apresentam basicamente os mesmos grupos funcionais. Embora os espectros de infravermelho de quitina e do quitosano apresentem semelhanças, podem observar-se diferenças, que são atribuídas aos diferentes conteúdos de grupos acetamida, principalmente nas regiões correspondentes aos seguintes intervalos de número de onda:  $3700\text{ cm}^{-1} - 3000\text{ cm}^{-1}$ ,  $1800\text{ cm}^{-1} - 1500\text{ cm}^{-1}$ , e  $1500\text{ cm}^{-1} - 1000\text{ cm}^{-1}$ . As diferenças observadas não devem ser atribuídas somente à diferente estrutura primária da quitina e do quitosano, correspondente ao teor em grupos acetamida, mas também à ocorrência de um empacotamento mais ordenado na quitina. O pequeno ombro que se observa entre  $3260\text{ cm}^{-1}$  e  $3100\text{ cm}^{-1}$  no espectro de quitina, e que não é observado nos espectros de quitosanos, pode ser atribuído aos grupos N—H da acetamida em ligações de hidrogénio intermoleculares. No intervalo  $1800\text{ cm}^{-1} - 1500\text{ cm}^{-1}$ , no qual são observadas as bandas denominadas de amida I e de amida II, os espectros de quitina e de quitosanos são muito diferentes. A banda de amida I é menos intensa nos espectros de quitosanos. Além disso, a banda de amida II, centrada em  $1560\text{ cm}^{-1}$ , é também menos intensa nos espectros de quitosanos, como consequência do acentuado processo de hidrólise dos grupos acetamida da quitina.



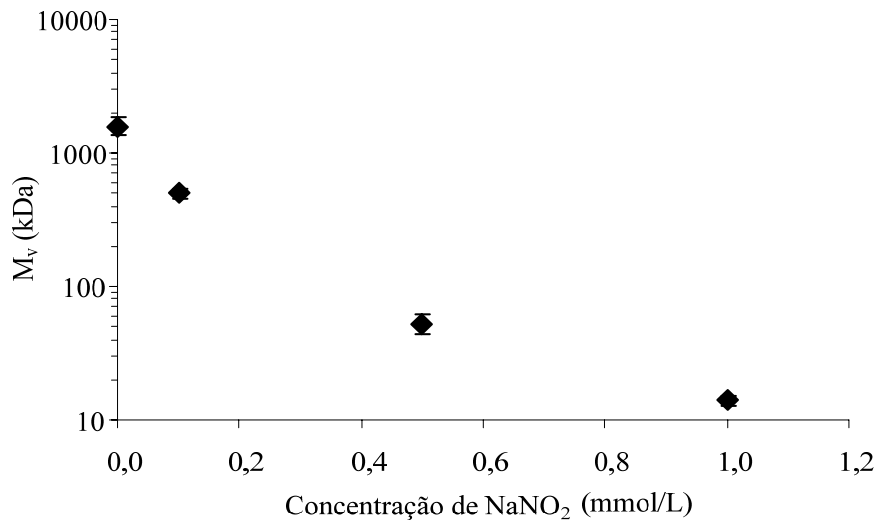
**Figura 3-12** Espectros de FT-IR de quitosanos com diferentes graus de acetilação.

### 3.2.3 Despolimerização

Como referido na secção 2.2.3, através da adição do agente oxidante, ácido nitroso, obtiveram-se quitosanos com diferentes massas moleculares. A figura 3-13 e a tabela 3-9 mostra a relação da concentração deste ácido com a  $[\eta]$  obtida e a massa molecular calculada. Os resultados mostram claramente que o aumento da concentração de ácido nitroso, e para o mesmo tempo de tratamento (4 horas), produz quitosanos com massas moleculares mais baixas. Com uma concentração de  $1,0 \times 10^{-3}$  mol/L de  $\text{NaNO}_2$  obtém-se uma massa molecular 108 vezes inferior à amostra inicial.



Pode também verificar-se, através do desvio padrão que o processo de fragmentação foi significativamente reprodutível para os objectivos propostos.



**Figura 3-13** Massa molecular em função da concentração de HONO.

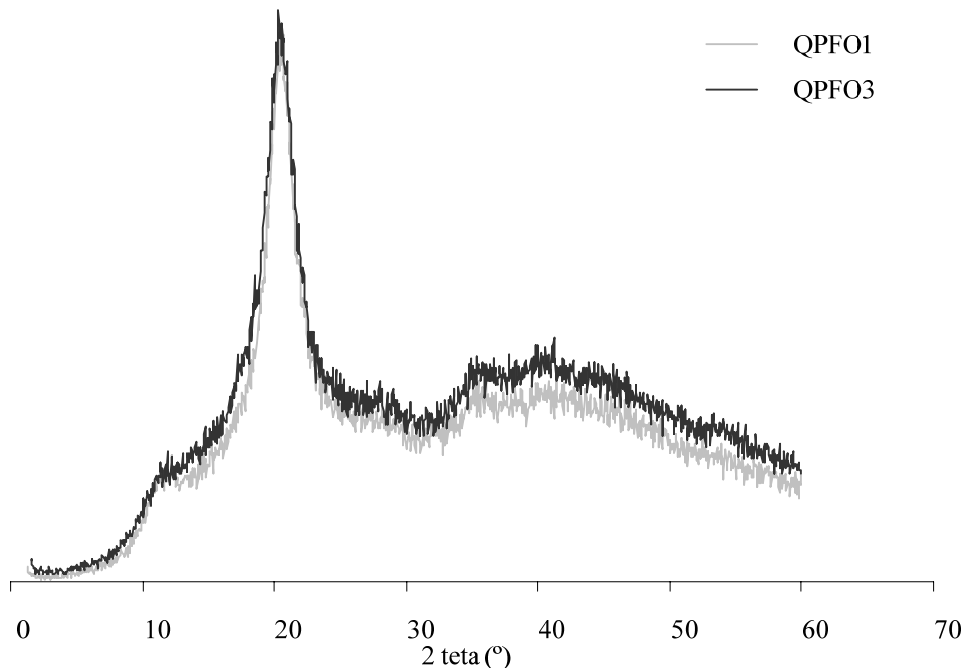
A extensão da despolimerização verificada neste trabalho difere do que foi apresentado por Allan e Peyron (1995a), provavelmente devido às diferentes condições experimentais utilizadas, nomeadamente ao diferente pH e concentração de quitosano.

**Tabela 3-9** Viscosidade e massa molecular dos quitosanos despolimerizados

Quitosano	$[\eta]$ (dL/g)	M <sub>v</sub> (kDa)
QP	25	1512
QPFO1	12	495.7
QPFO2	2.7	54.06
QPFO3	1.1	14.04

O efeito da diminuição das massas moleculares na viscosidade das soluções mostrou-se evidente quando se dissolve as amostras fragmentadas.

A massa molecular não parece ter qualquer influência nos espectros de raios- X conforme se pode confirmar pela figura 3-14, as amostras apresentam um pico bem resolvido apenas a  $2\theta \cong 20^\circ$ .



**Figura 3-14** Espectros de raios- X de quitosanos com elevada massa molecular (QPFO1) e baixa massa molecular (QPFO3).

### 3.2.4 Solubilidade das Amostras

#### Influência do Grau de Acetilação

O quitosano pode ser dissolvido em soluções aquosas de pH inferior a 6, mas a solubilidade do quitosano depende do grau de acetilação, da estrutura molecular e do estado físico (tamanho da partícula) (Shepherd *et al*, 1997).

Nesta experiência foi testada a solubilidade dos quitosanos em duas soluções ácidas, ácido acético (0.1mol/L) e ácido acético (0.5mol/L)/ cloreto de sódio (0.25mol/L). O estudo da dissolução nestes solventes baseou-se no facto de estes serem os usados na preparação de filmes e para a determinação da viscosidade

intrínseca, respectivamente. Registou-se ainda a aparência das soluções. Os resultados obtidos apresentam-se nas tabelas 3-10 e 3-11.

Definiu-se *viscosidade observada* como a viscosidade da solução por observação directa do tempo de escoamento da solução num tubo de ensaio.

A *viscosidade observada* das soluções diminui à medida que diminui o grau de acetilação (tabela 3-10) No entanto, esta maior viscosidade poderá também, ser atribuída à elevada massa molecular do quitosano com maior grau de acetilação.

**Tabela 3-10** Descrição e solubilidade de soluções de quitosanos com diferentes GA.

Dispersões (1% m/V)	Descrição	Solubilidade em CH <sub>3</sub> COOH (0.1mol/L)
QPGA27	Dispersão extremamente viscosa e baça	94 %
QPGA20	Dispersão muito viscosa e baça	96 %
QPGA13	Dispersão viscosa e ligeiramente baça	99 %
QPGA6	Dispersão viscosa e translúcida	99 %
QPGA0	Dispersão viscosa e translúcida	100 %

Pelas tabelas 3-10 e 3-11 pode concluir-se que todos os quitosanos se dissolvem bem em ácido acético 0.1 mol/L. No entanto, em AcOH 0.5mol/L/ NaCl 0.25mol/L a solubilidade diminui claramente com o aumento do grau de acetilação, sendo muito baixa (<40%) para quitosanos com grau de acetilação 27 e 20 %. Shepherd *et al* (1997) verificaram também que os quitosanos obtidos através de estiletos de pota eram mais difíceis de dissolver quando comparados com amostras comerciais e atribuíram a reduzida solubilidade à maior massa molecular destas amostras.

Rinaudo *et al* (1999) investigaram a protonação do quitosano em soluções de ácido acético com diferentes concentrações deste ácido e concluíram que a viscosidade do quitosano (em AcOH) permanece praticamente constante, não apenas devido à protonação ser completa mas também devido à baixa concentração iónica relacionada com o pK do ácido acético.

Para explicar a falta de solubilidade das amostras em AcOH 0.5 mol/L/NaCl 0.25 mol/L é necessário considerar dois factores: a variação do grau de acetilação e a influência da força iónica. A incorporação de NaCl no solvente tem como objectivo a redução do efeito do polielectrólito, uma vez que as cargas positivas do grupo amina passam a estar contra-balançadas com as cargas negativas do  $Cl^-$ .

Dependendo do grau de acetilação devem considerar-se alterações na expansão e rigidez das cadeias e/ou a tendência para formar agregados. O maior conteúdo em grupos acetilo pode aumentar a rigidez das cadeias, por razões estéricas. Por outro lado, o baixo grau de acetilação significa que temos um maior número de grupos amina livres, os quais se encontram protonados em solução ácida, produzindo o estiramento da cadeia e alguma rigidez devido à repulsão electrostática (Pedroni *et al.*, 2003).

**Tabela 3-11** Descrição e solubilidade de soluções de quitosanos com diferentes GA em  $CH_3COOH$  0.5mol/L/ NaCl 0.25mol/L

Dispersões (1% m/V)	Descrição	Solubilidade em $CH_3COOH$ 0.5mol/L/NaCl 0.25mol/L
QPGA27	Quitosano aparentemente fica só hidratado, não se dissolve	27 %
QPGA20	Quitosano aparentemente fica só hidratado, não se dissolve	39 %
QPGA13	Dispersão viscosa e translúcida	88 %
QPGA6	Dispersão viscosa e translúcida	100 %
QPGA0	Dispersão viscosa e translúcida	100 %

### Influência da Massa Molecular

Os quitosanos com diferentes massas moleculares e  $GA \cong 0$  dissolvem-se a 100% quer em  $CH_3COOH$  0.5mol/L/ $NaCl$  0.25mol/L, quer em  $CH_3COOH$  0.1mol/L. As soluções formadas são translúcidas. Verificou-se ainda que quanto menor a massa molecular, menor a viscosidade observada (tabela 3-12).

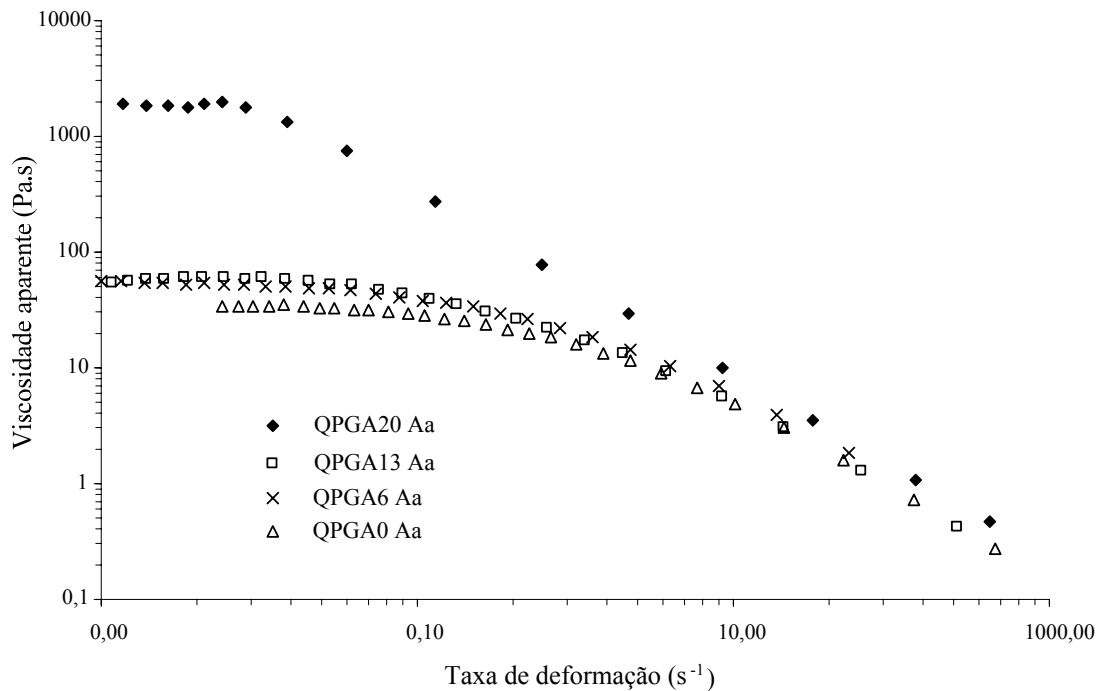
**Tabela 3-12** Descrição e solubilidade de soluções de quitosanos com diferentes GA em  $AcOH$  0.5mol/L/  $NaCl$  0.25mol/L

Soluções (1% m/V)	Descrição	Solubilidade	
		$CH_3COOH$ 0.5mol/L/ $NaCl$ 0.25mol/L	$CH_3COOH$ 0.1mol/L
QPFO1	Solução viscosa e translúcida.	100 %	100%
QPFO2	Solução pouco viscosa e translúcida	100 %	100%
QPFO3	Solução muito pouco viscosa e translúcida	100%	100%

## 3.3 Comportamento Reológico

### 3.3.1 Influência do Grau de Acetilação

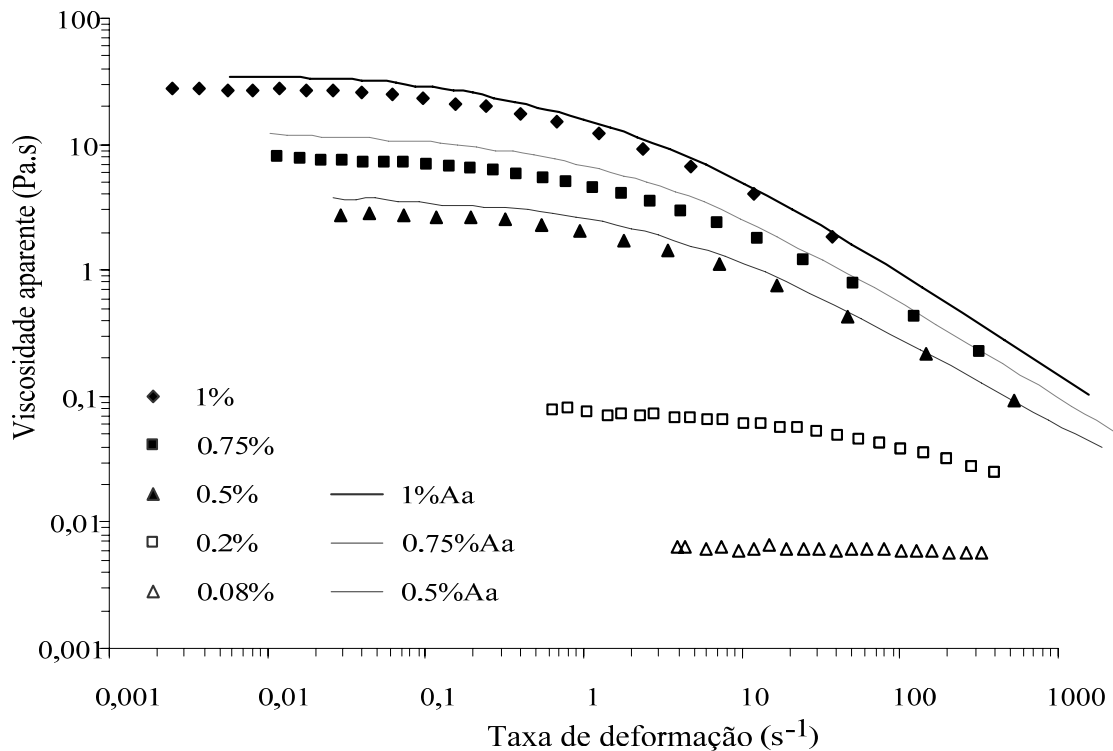
A influência do grau de acetilação no comportamento reológico foi estudada no solvente  $AcOH$  0.1mol/L para soluções de biopolímero a 1% (m/V). O quitosano de  $GA \cong 27\%$  não forma uma verdadeira solução e por isso o seu estudo não foi efectuado.



**Figura 3-15** Viscosidade aparente vs taxa de deformação para soluções de quitosanos a 1% em  $\text{CH}_3\text{COOH}$  (0.1mol/L; Aa) com diferentes GA.

Pela figura 3-15 pode verificar-se que soluções a 1% (m/V) os quitosanos com diferentes GA exibem um comportamento pseudoplástico. Verifica-se ainda que a viscosidade aparente do quitosano com  $\text{GA} \cong 20\%$  é bastante superior quando comparada com os quitosanos de graus de acetilação mais baixos. Ainda que a diferença de viscosidade aparente não seja muito acentuada para os quitosanos com  $0 < \text{GA} < 13$  verifica-se que a viscosidade aparente diminui à medida que diminui o grau de acetilação.

Na figura 3-16 apresenta-se o estudo do efeito da concentração (0.08-1% (m/V)) de quitosano com  $\text{GA} \cong 0\%$  nas propriedades reológicas de solução. O estudo foi efectuado em dois solventes: em ácido acético 0.5mol/L/ cloreto de sódio 0.25mol/L e em ácido acético 0.1mol/L (representado na figura por Aa).



**Figura 3-16** Viscosidade aparente vs taxa de deformação de quitosano GA=0% a diferentes concentrações e com dois solventes distintos (ácido acético 0.1M (Aa) e ácido acético 0.5M/NaCl 0.25M).

A baixas concentrações de biopolímero a solução exibe um comportamento Newtoniano, mas o aumento da concentração do biopolímero leva ao aparecimento do comportamento pseudoplástico (reofluídificante)- em que o aumento da taxa de deformação conduz à diminuição da viscosidade. Pela figura 3-16 pode ainda concluir-se que a diferença de comportamento existente entre soluções com a mesma concentração, mas preparadas a partir de diferentes solventes, é semelhante, verificando-se apenas que a viscosidade aparente é ligeiramente superior para soluções preparadas a partir de AcOH 0.1mol/L. O aumento da força iónica por incorporação do NaCl leva à diminuição da repulsão electrostática entre os grupos amina carregados, dando-se a contracção da molécula e diminuindo, consequentemente, a viscosidade.

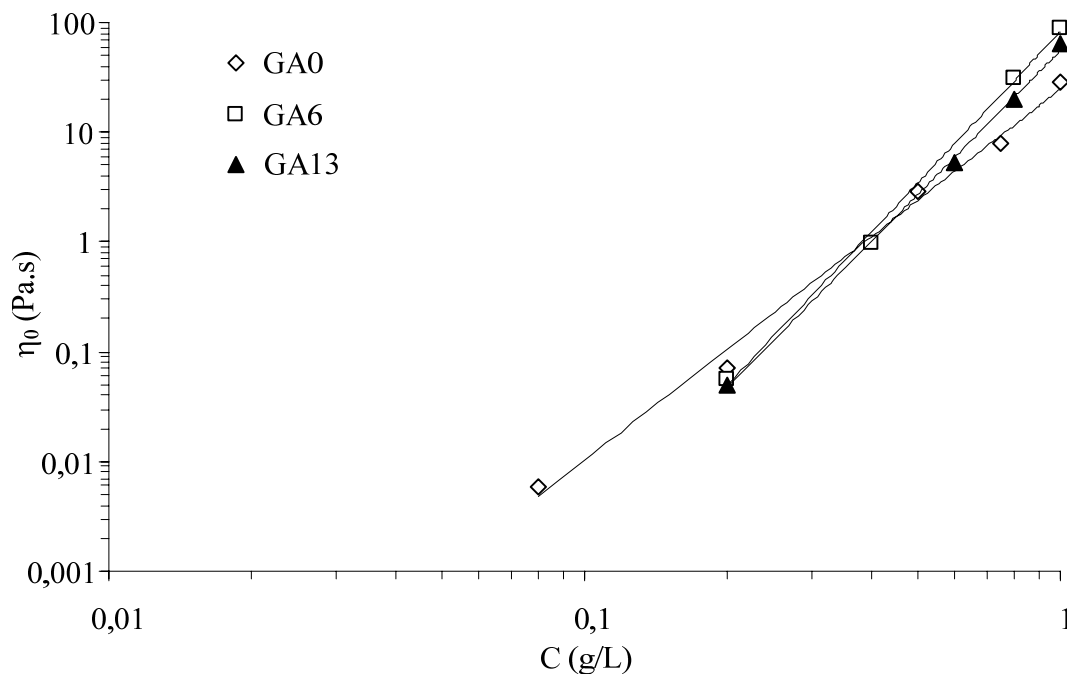
No regime diluído as interligações entre as cadeias de polímero são limitadas e a viscosidade da solução aumenta linearmente com o aumento da concentração de polímero. À medida que a concentração de polímero aumenta, a sobreposição das

cadeias das macromoléculas torna-se importante e a viscosidade relativa da solução aumenta significativamente com o aumento da concentração, até uma concentração crítica. Esta região designa-se por regime semi-diluído. Acima da concentração crítica, as interligações entre as cadeias do polímero aumentam grandemente, assim como a viscosidade. A lei de potência representada pela equação 3-3 permite evidenciar a transição entre os dois regimes através do parâmetro  $b$ , ou seja, diferentes valores de  $b$  traduzem diferentes regimes.

$$\eta = aC^b$$

equação 3-3

Segundo Lapasin e Pricl (1995) no regime diluído  $b$  varia entre 1 e 1.4. No entanto, mais recentemente, Lai e Chiang (2002), descreveram valores de  $b$  na gama dos 0.78-0.80 no regime diluído para goma de hsian-tsoo. No regime concentrado a literatura descreve valores de  $b$  na gama dos 1.9 a 5.6 (Lapasin e Pricl, 1995). Na figura 3-17 descreve-se a viscosidade das soluções de quitosano de pota em  $\text{CH}_3\text{COOH}$  0.5mol/L/ $\text{NaCl}$  0.25mol/L, para quitosanos com diferentes graus de acetilação.



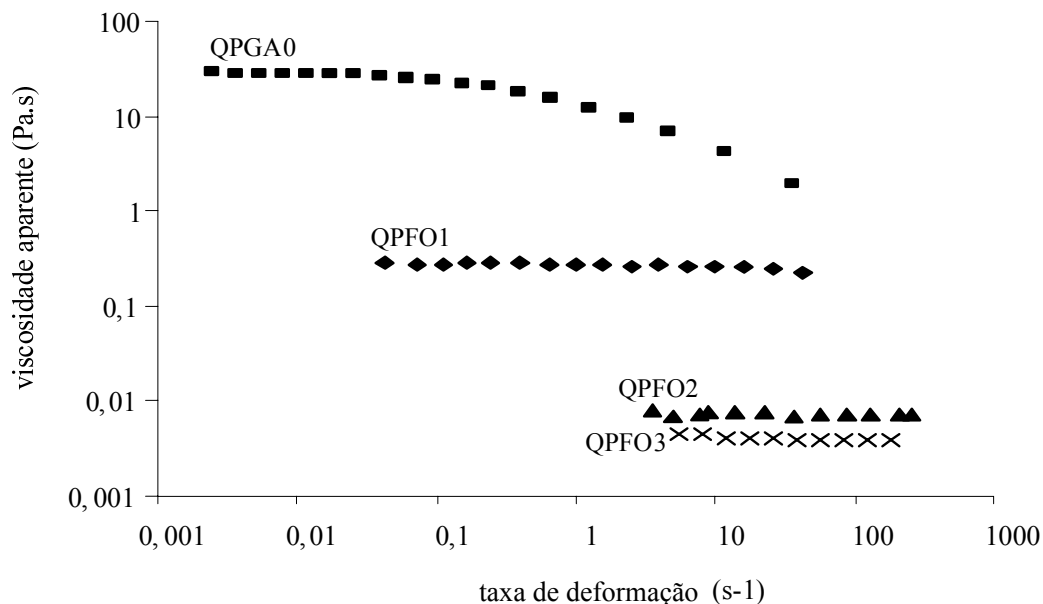
**Figura 3-17** Viscosidade a taxa de deformação nula ( $\eta_0$ ) vs concentração para quitosanos de pota com diferentes GA em  $\text{CH}_3\text{COOH}$  0.5 mol/L/ $\text{NaCl}$  0.25mol/L



Pelos resultados apresentados na figura podemos concluir que os quitosanos de graus de acetilação entre 0 e 13 %, em soluções em  $\text{CH}_3\text{COOH}$  0.5 mol/L/ $\text{NaCl}$  0.25 mol/L encontram-se no regime concentrado uma vez que,  $3.4 < b < 4.6$  (tabela 3-13).

### 3.3.2 Influência da Massa Molecular

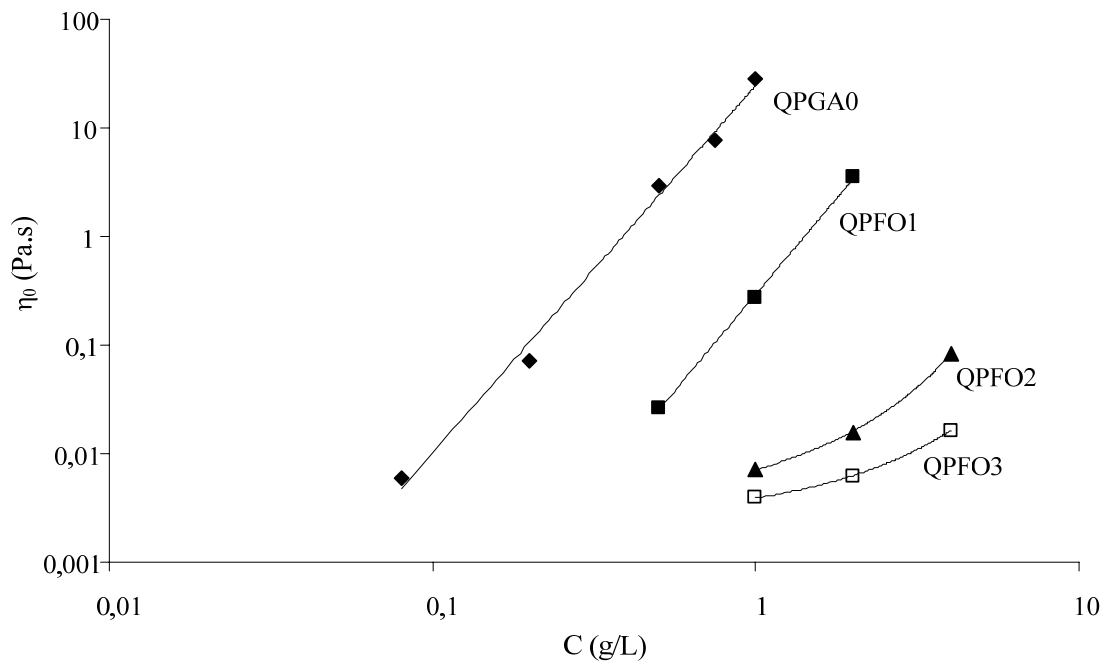
A influência da massa molecular nas propriedades de escoamento de soluções de quitosanos com  $\text{GA} \cong 0\%$  em  $\text{CH}_3\text{COOH}$  0.5 mol/L/ $\text{NaCl}$  0.25 mol/L, podem ser observadas na figura 3-18. Pela figura, verifica-se que a diminuição da massa molecular leva ao comportamento Newtoniano (soluções a 1% m/V).



**Figura 3-18** Viscosidade aparente vs taxa de deformação para soluções de quitosanos com diferentes massas moleculares a 1% (m/V) em  $\text{CH}_3\text{COOH}$  0.5 mol/L/ $\text{NaCl}$  0.25 mol/L.

Para o quitosano de maior massa molecular (quitosano não fragmentado) verifica-se o comportamento pseudoplástico. A figura 3-18 permite ainda verificar que quanto maior a massa molecular maior a viscosidade aparente da solução de quitosano.

Para estimar o parâmetro  $b$  que permite distinguir o regime concentrado do regime diluído traçou-se o gráfico viscosidade a taxa de deformação nula ( $\eta_0$ ) vs concentração (figura 3-19).



**Figura 3-19** Viscosidade a taxa de deformação nula ( $\eta_0$ ) vs concentração de quitosanos em  $\text{CH}_3\text{COOH}$  0.5 mol/L/NaCl 0.25 mol/L com diferentes massas moleculares:

◆ 1512 kDa ■ 496 kDa ▲ 54 kDa □ 14 kDa .

**Tabela 3-13:** Parametros  $a$  e  $b$  para amostras com diferentes GA e diferentes  $M_v$ .

Amostra	a	b
QPGA13	83	4.6
QPGA6	56	4.4
QPGA0	25	3.4
QPFO1	0.29	3.5
QPFO2	0.0032	0.81
QPFO3	0.0024	0.48

Tendo em conta o descrito na secção 3.4.1 e a tabela 3-13 podemos concluir que as amostras QPGA0 e QPFO1 encontram-se no regime concentrado uma vez que  $b$  toma

valores de 3.4 e 3.5, respectivamente, enquanto que as amostras QPFO2 e QPFO3 se encontram no regime diluído com  $b$  a tomar os valores de 0.81 e 0.48, respectivamente.

Podemos concluir que à medida que diminui a massa molecular o parâmetro  $b$  também diminui, ou seja, afastamo-nos do regime concentrado, mesmo com soluções mais concentradas de biopolímero.

### 3.4 Comportamento dos filmes

Até à data não se tem dado muita atenção ao estudo do efeito de propriedades estruturais do quitosano, tais como a massa molecular e o grau de acetilação, em películas formadas a partir deste biopolímero. Por outro lado, as condições experimentais variam grandemente de um trabalho para o outro, nomeadamente quanto às fontes de quitina utilizadas para obter o quitosano, propriedades do quitosano, tipo de solvente usado, e métodos de preparação de filme (adição de plastificante, neutralização, espessura, etc).

Neste trabalho, pretendeu-se avaliar o efeito da massa molecular e do grau de acetilação sobre determinadas propriedades dos filmes (opacidade, absorção de água, propriedades mecânicas e viscoelásticas, permeabilidade ao vapor de água).

Os filmes de quitosano foram preparados usando ácido acético (0.1mol/L) como solvente, este é o ácido mais usado para solubilizar o quitosano e promove a dissolução do quitosano mais eficazmente do que os ácidos málico, láctico e cítrico (*cit in No et al, 2002*). Optou-se pelo glicerol como plastificante. Larena e Cáceres (2004) descreveram que o uso deste plastificante, diminui a deterioração à superfície do filme formado, enquanto exerce também um efeito protector contra o envelhecimento do filme.

### 3.4.1 Opacidade e espessura

A transparência (baixa opacidade) de filmes desempenha um papel importante quando estes são destinados a actuar como embalagens, principalmente de alimentos. A espessura dos filmes é também uma característica importante uma vez que influencia muitas das propriedades dos filmes e deve por isso ser tomada em consideração.

A opacidade e a espessura dos filmes aumentou com o aumento do grau de acetilação, provavelmente devido ao aumento das interacções polímero-polímero e a formação de agregados. Os valores de opacidade dos filmes de quitosano de pota (49.3-75.3 A x nm) e quitosanos da primex (49.7-50.5 A x nm) com diferentes graus de acetilação foram significativamente diferentes a  $p < 0.05\%$ . Pode ainda verificar-se pela tabela 3-14 que à medida que diminui a massa molecular do polímero a opacidade também diminui (amostras QPGA0, QPFO1, QPFO2 e QPFO3).

**Tabela 3-14** Fonte, descrição, opacidade e espessura dos filmes de quitosano efectuados

Filme	Fonte	Descrição	Opacidade (A x nm)	Espessura (mm)
QPGA27	Estiletas de pota	Muito Baço	75.26 ± 0.02	0.035 - 0.044
QPGA20	Estiletas de pota	Baço	65.13 ± 0.01	0.032 - 0.042
QPGA13	Estiletas de pota	Ligeiramente baço	52.80 ± 0.01	0.027 - 0.035
QPGA6	Estiletas de pota	Translúcido	51.93 ± 0.04	0.025 - 0.033
QPGA0	Estiletas de pota	Translúcido	49.38 ± 0.01	0.025 - 0.032
Sigma	Caranguejo	Translúcido	48.11 ± 0.2	0.021 - 0.026
Qprim15	Cascas de camarão	Translúcido/amarelado	50.52 ± 0.03	0.020 - 0.025
Qprim17	Cascas de camarão	Translúcido/amarelado	50.23 ± 0.1	0.020 - 0.024
Qprim7	Cascas de camarão	Translúcido/amarelado	49.73 ± 0.07	0.020 - 0.025
QPFO1	Estiletas de pota	Translúcido	48.23 ± 0.09	0.022 - 0.030
QPFO2	Estiletas de pota	Translúcido	46.89 ± 0.01	0.019 - 0.028
QPFO3	Estiletas de pota	Translúcido	46.02 ± 0.04	0.018 - 0.027

O controlo da espessura dos filmes é difícil, sobretudo quando o processo de produção dos mesmos é o chamado “casting”, ou seja, a solução “filmogénica” é

espalhada numa placa e após a evaporação do solvente obtém-se o filme. Este processo exige um controlo rigoroso da forma e nivelamento do suporte para evitar diferenças de espessura causadas pela distribuição não homogénea (desnivelada) da solução sobre o suporte. O facto das soluções de quitosano obtidos através dos estiletos de pota serem muito viscosas, mesmo a 0.5 % (m/V), dificultou ainda mais o controlo da espessura dos filmes uma vez que a medição do volume de solução colocado na placa foi difícil de controlar. Quanto às amostras fragmentadas as diferenças na espessura devem-se à dificuldade em vedar bem o suporte por forma a não se perder amostra pela moldura devido à baixa viscosidade das soluções (ver secção 2.4; figura 2-5).

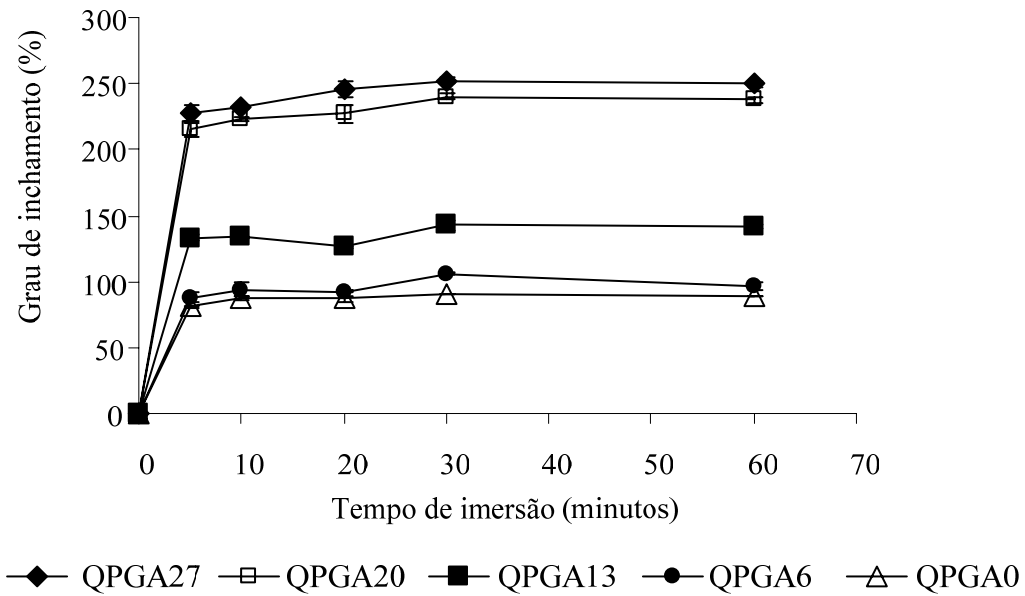
### 3.4.2 Absorção de Água Destilada

O estudo da forma como os filmes de biopolímeros interagem com a água reveste-se de grande importância para a compreensão da organização macromolecular destas membranas e para a sua aplicação em ambientes aquosos. Uma das estratégias possíveis para a manipulação das propriedades de membranas biopoliméricas baseia-se no adequado conhecimento da relação entre a estrutura do polímero e a funcionalidade por ele exibida.

#### Influência do Grau de Acetilação

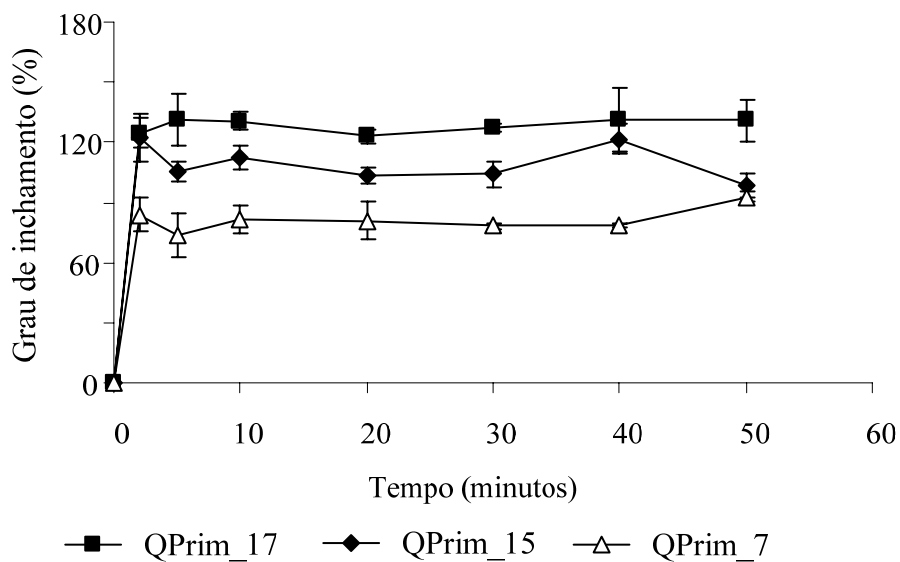
Neste ensaio testaram-se quitosanos provenientes de duas fontes distintas: os estiletos das potas e cascas de camarão (Quitosano comercial da Primex).

Como se pode verificar pela figura 3-20, o grau de acetilação do polissacarídeo teve uma influência significativa sobre a capacidade de absorção de água pelas membranas. O grau de inchamento, associado à densidade de ligações cruzadas entre cadeias do biopolímero, aumenta com o grau de acetilação do quitosano. A acetilação do grupo amina parece assim dificultar as interacções intermoleculares que estabilizam a membrana, conferindo-lhe uma maior capacidade de absorção de água. A capacidade de absorção de água por parte dos filmes parece ser limitada. Este facto foi também confirmado por Peniche *et al* (2003). O tempo de imersão máximo testado foi de 1 semana (dados não apresentados), mantendo-se na mesma gama de valores.



**Figura 3-20** Grau de inchamento de filmes de quitosanos de pota com diferentes graus de acetilação.

O aumento do grau de inchamento com o GA verifica-se também com as amostras comerciais da Primex, figura 3-21.

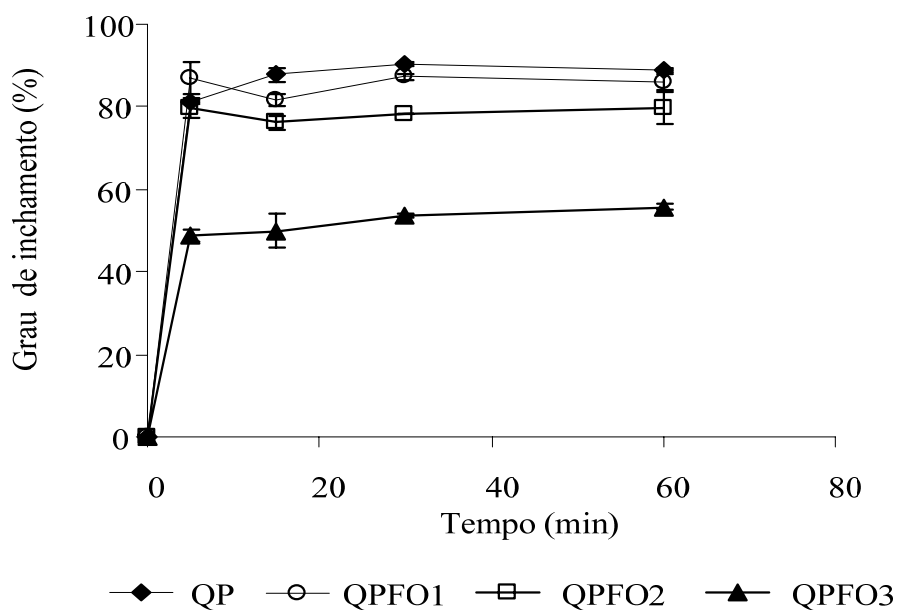


**Figura 3-21** Grau de inchamento de filmes de quitosanos comerciais com diferentes graus de acetilação.

Neste estudo, os filmes após os ensaios de absorção foram secos a 105 °C e foi determinada a percentagem de dissolução nos diferentes meios tendo-se concluído que a percentagem de dissolução é mínima, cerca de 7,8 % em água; resultados similares foram também obtidos por Kam *et al* (1999) que descreveram valores entre os 6 e os 8% de dissolução. A solubilidade dos filmes é uma propriedade importante na aplicação do filme. Potenciais aplicações podem requerer a insolubilidade em água de forma a melhorar a integridade do produto e a resistência à água.

### Influência da massa molecular

A massa molecular do biopolímero teve uma influência significativa na absorção de água pelos filmes, verificando-se o aumento desta propriedade à medida que aumenta a massa molecular, como se pode verificar pela figura 3-22. Cadeias com maior massa molecular não se conseguem organizar de forma a minimizarem o volume ocupado, criam-se assim, vazios entre as cadeias do polímero que levam a poros mais abertos e em maior número permitindo assim uma maior penetração/interacção com a água.



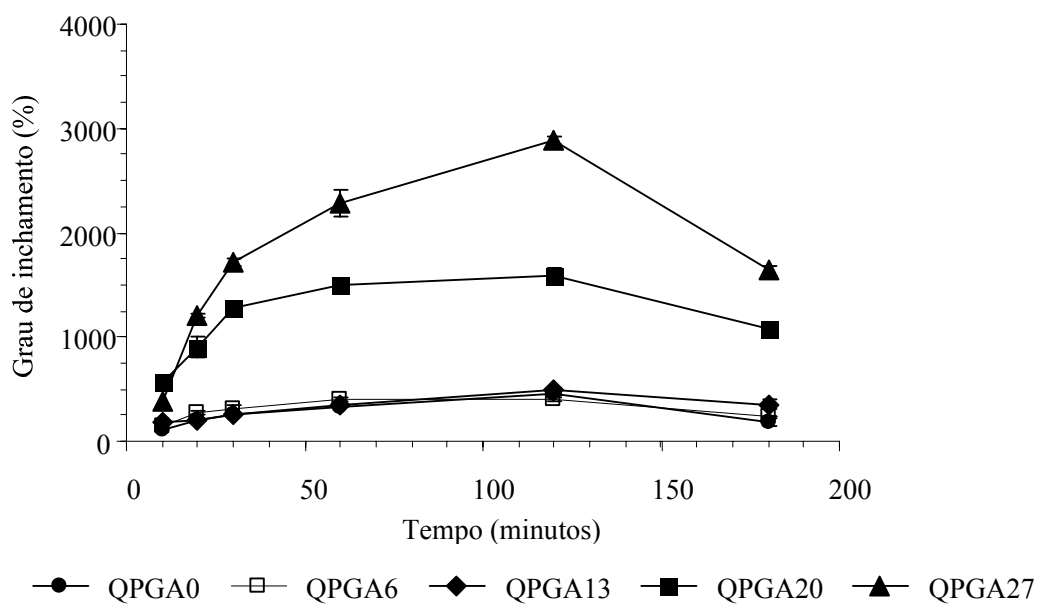
**Figura 3-22** Grau de inchamento de filmes de quitosanos de lula com diferentes  $M_v$ .

### 3.4.3 Absorção de tampão ácido

#### Influência do Grau de Acetilação

O grau de acetilação do polissacarídeo teve uma influência significativa sobre a capacidade de absorção de tampão ácido pelos filmes. A capacidade de absorção de tampão ácido (pH 3) aumenta com o grau de acetilação (figura 3-23). Todos os filmes atingem um máximo de inchamento após 120 minutos de imersão após os quais a percentagem de inchamento volta a diminuir para valores próximos dos iniciais. Verifica-se também que a percentagem de inchamento para graus de acetilação mais elevados (27 e 20 %) é cerca de 6 vezes superior (para tempos superiores a 20 minutos) à dos quitosanos com grau de acetilação mais baixos (13, 6 e 0 %). Estudos de absorção de filmes não neutros de quitosano em soluções tampão de diferentes pH resultaram na dissolução dos mesmos, mostrando a falta de eficácia de filmes que não seguem o passo da neutralização, para sistemas líquidos (Nunthanid *et al*, 2001).

Quanto à influência do grau de acetilação um aspecto que contribui para uma maior retenção de moléculas polares é a estrutura porosa dos filmes, que aumenta com o GA. Os poros facilitam a permeação e subsequente retenção das moléculas de ácido/água na matriz polimérica.

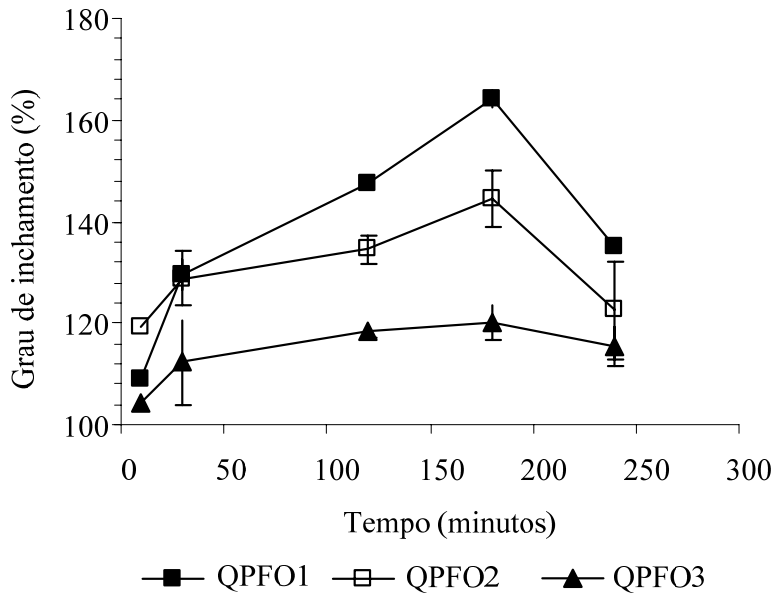


**Figura 3-23** Grau de inchamento de filmes de quitosano com diferentes graus de acetilação a pH ácido.



### Influência da Massa Molecular

A massa molecular parece ter um efeito significativo na capacidade de absorção de tampão ácido, aumentando esta propriedade à medida que aumenta a massa molecular, conforme se pode verificar pela figura 3-24.



**Figura 3-24** Grau de inchamento de filmes com diferentes  $M_v$  em função do tempo.

As moléculas de menor massa molecular parecem possuir uma maior capacidade para se organizarem por minimizarem a repulsão electrostática, diminuindo o volume ocupado e assim, obterem poros mais fechados e menos numerosos.

De notar ainda que a percentagem de inchamento em tampão ácido é superior à percentagem de inchamento de filmes imersos em água (quer para diferentes massas moleculares quer para diferentes GA's). As diferentes percentagens de inchamento podem ser entendidas como resultado da intensidade das interacções iónicas que ocorrem nestas soluções. As moléculas de água são polares, a solução tampão constituída por ácido cítrico é altamente polar uma vez que estamos perante um ácido com três grupos COOH. A diferença na percentagem de inchamento resulta de uma afinidade superior por moléculas com maior polaridade.

### 3.4.4 Comportamento Mecânico

O ensaio de tensão é o ensaio mecânico mais fácil de interpretar; neste ensaio aplica-se uma deformação crescente ao material e a tensão resultante é registada. A tensão de cedência, tensão de ruptura, deformação e o módulo de young foram determinados.

Curvas de tensão - deformação, exemplificativas do comportamento observado, apresentam-se na figura 3-25.

A tensão de ruptura dos quitosanos de pota variaram (com o grau de acetilação) entre 84.8 - 49.7 MPa encontrando-se na gama de tensões também determinadas por outros investigadores (Kittur *et al*, 1998). Esta gama de valores é comparável a filmes de metilcelulose que apresentam valores de 43.7- 70.2 MPa (Chen *et al*, 1996). Os valores determinados por Butler *et al* (1996) em filmes de quitosano, no entanto, encontram-se numa gama mais baixa, 14.6- 35.1 MPa (de notar que os filmes não se encontravam neutralizados). Rhim *et al* (1998) testaram diferentes ácidos na preparação de filmes de quitosano e para os filmes preparados a partir de ácido acético obtiveram o valor médio de 41.6 MPa que se encontra também, próximo da gama de valores determinado.

No entanto, verifica-se para a amostra de quitosano comercial (tabela 3-15) valores de tensão de ruptura superiores aos registados para os quitosanos de pota. O valor de alongação encontra-se contudo na média da gama obtida para os diferentes quitosanos.

Os valores de alongação de filmes de quitosanos são muito inferiores aos de filmes sintéticos, o LDPE e o HDPE possuem valores de alongação de 156 e 300%, respectivamente (Robertson, 1993; Chen *et al*, 1995).

**Tabela 3-15** Propriedades mecânicas obtidas de curvas de tensão/deformação

Filme	Tensão de cedência (MPa)	Tensão ruptura (MPa)	Módulo de Young (x 10 <sup>3</sup> MPa)	% Elongação
QSG	95 ± 7	95 ± 6	4.1 ± 0.4	6 ± 2

### Influência do GA nos ensaios de tensão até à ruptura

Para estudar a influência do grau de acetilação no comportamento mecânico de filmes de quitosano, efectuaram-se ensaios com os quitosanos obtidos a partir dos estiletos das potas (QP) e com quitosanos comerciais da Primex (Qprim). A primeira conclusão que se pode tirar à partida é que os parâmetros determinados para os dois conjuntos de amostras se encontram na mesma gama de valores. Contudo, nos quitosanos comerciais o grau de acetilação na gama estudada, não parece influenciar parâmetros como a elongação e o módulo de Young (tabela 3-16), enquanto que para os QP o grau de *N*-acetilação do quitosano apresenta uma influência significativa nas propriedades mecânicas das membranas (tabela 3-17). A capacidade de um filme de QP para se deformar (% de elongação) aumentou à medida que o grau de acetilação decresceu, contrariamente ao anteriormente descrito por Hwang *et al* (2003) para filmes de quitosano em ácido fórmico, não neutros e sem plastificante. Hsu *et al* (2004) verificaram que quanto maior fosse o grau de desacetilação mais baixa era a elongação, para filmes a 2% sem a adição de plastificante.

**Tabela 3-16** Propriedades mecânicas obtidas de curvas de tensão/deformação para Qprim .

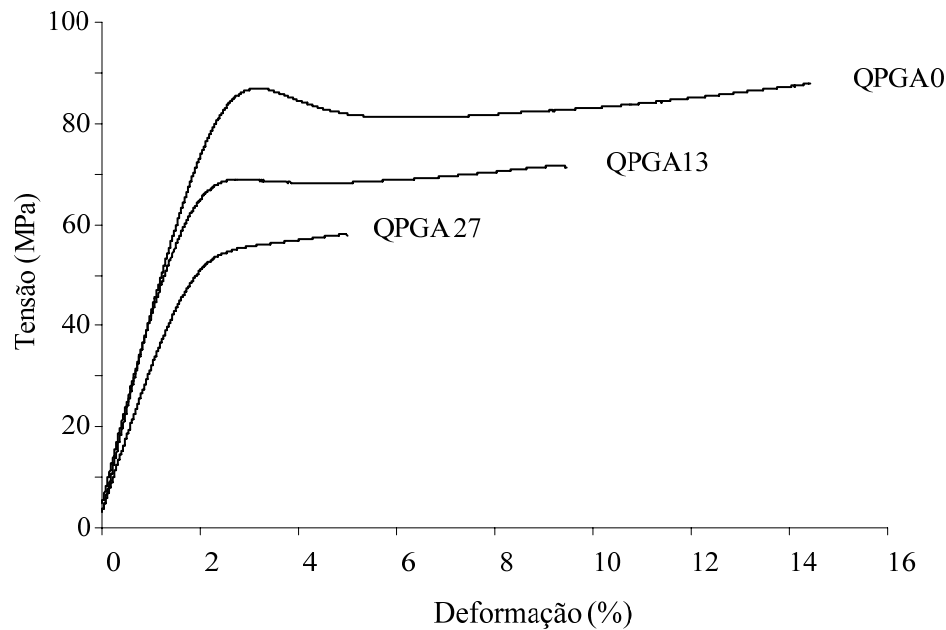
Filme	Módulo de Young (MPa)	% Elongação	Tensão cedência (MPa)	Tensão ruptura (MPa)
Qprim17	3736 <sup>a</sup>	4.66 <sup>a</sup>	72.9 <sup>a</sup>	76.7 <sup>a</sup>
Qprim15	3472 <sup>a</sup>	7.72 <sup>b</sup>	60.6 <sup>b</sup>	64.3 <sup>b</sup>
Qprim7	3638 <sup>b</sup>	3.75 <sup>a</sup>	59.4 <sup>b</sup>	63.7 <sup>b</sup>

✦ Média dos resultados (n=6) com diferentes letras são significativamente diferentes a  $p < 0.05$

Esta diferença de comportamento deve ser atribuída às diferentes fontes de obtenção de quitosano e/ou à gama de GA, relativamente estreita estudada para os quitosanos da primex. Shepherd *et al* (1997) estudaram quitosanos e filmes de quitosano de várias fontes e concluíram que os filmes de quitosano obtidos a partir de potas são diferentes dos quitosanos comerciais obtidos a partir de outras fontes.

A graus de acetilação mais baixos os filmes QP absorvem uma maior quantidade de energia antes de quebrarem.

O ponto de viragem/ponto de cedência é claramente mais evidente a baixos graus de acetilação (figura 3-25). A tensão de cedência e a tensão de ruptura aumentam à medida que o grau de acetilação diminui (tabela 3-14), concluindo-se portanto que com o aumento do grau de acetilação se obtêm filmes QP mais quebradiços e menos resistentes à tensão aplicada.



**Figura 3-25** Curvas de tensão - deformação até à ruptura de filmes de quitosano com diferentes GA.

O módulo de Young, ou o módulo de elasticidade foi medido como o rácio da força sobre a deformação, na gama em que este rácio é constante. Este também aumentou quando o grau de acetilação decresceu (tabela 3-17), querendo dizer que a dureza intrínseca dos filmes de QP aumenta à medida que o grau de acetilação decresce.

**Tabela 3-17** Propriedades mecânicas obtidas de curvas de tensão/deformação para QP

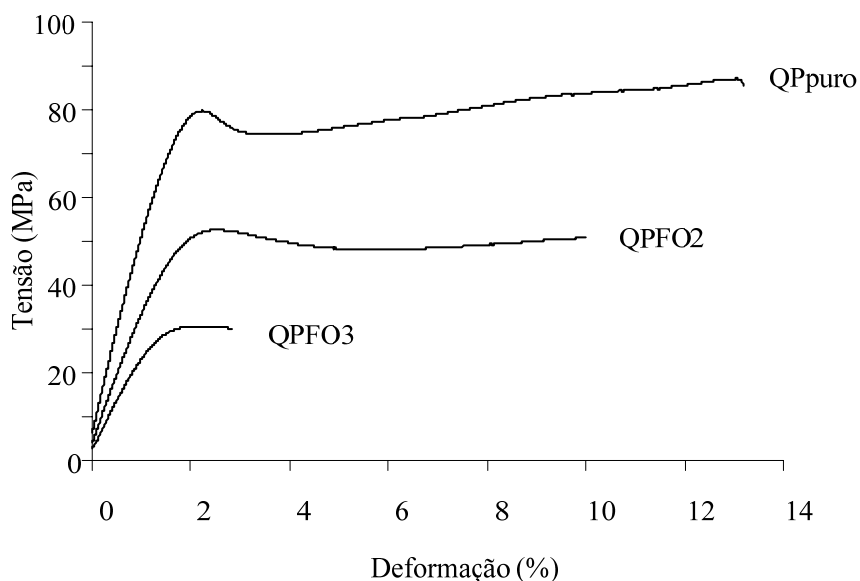
Filme	Módulo de Young (MPa)	% Elongação	Tensão de cedência (MPa)	Tensão ruptura (MPa)
QPGA0	3636 <sup>a</sup>	14.0 <sup>a</sup>	84.7 <sup>a</sup>	88.8 <sup>a</sup>
QPGA6	3460 <sup>a</sup>	8.5 <sup>b</sup>	68.5 <sup>b</sup>	74.4 <sup>b</sup>
QPGA13	3430 <sup>a</sup>	8.4 <sup>b</sup>	67.9 <sup>b</sup>	69.4 <sup>b</sup>
QPGA 20	2716 <sup>b</sup>	4.7 <sup>c</sup>	57.3 <sup>c</sup>	57.5 <sup>c</sup>
QPGA 27	2507 <sup>c</sup>	3.1 <sup>c</sup>	49.6 <sup>d</sup>	49.8 <sup>d</sup>

✚ Média dos resultados (n=6) com diferentes letras são significativamente diferentes a  $p < 0.05$

#### Influência da massa molecular

O quitosano e os seus derivados têm sido usados numa variedade de aplicações, mas a sua eficácia depende do seu tamanho molecular (Tharanathan e Kittur, 2003; Allan e Peyron, 1995a). Por outro lado, um dos factores que limita a sua aplicação em processos em que é necessária a dissolução da amostra é a sua elevada massa molecular, uma vez que, contribui para a elevada viscosidade. Soluções muito viscosas obrigam a trabalhar com concentrações do polímero muito baixas aumentando o erro associado às determinações experimentais. Para além disso, como já foi descrito, a massa molecular do polímero desempenha um papel importante nas propriedades funcionais, sendo de prever que influencie também as propriedades dos filmes obtidos a partir destas amostras.

Para analisar a influência da massa molecular nos filmes de quitosano, testaram-se filmes de quitosano de pota (GA=0%) com diferentes massas moleculares obtidas a partir da fragmentação oxidativa do biopolímero. A figura 3-26 apresenta um exemplo das curvas de tensão até à ruptura de quitosanos com diferentes massas moleculares.



**Figura 3-26** Curvas de tensão até à ruptura de filmes de quitosano com diferentes  $M_v$ .

Dentro da gama analisada, a massa molecular tem uma influência significativa no módulo de Young, na elongação e nas tensões de ruptura e de cedência dos filmes aumentando à medida que aumenta a massa molecular (tabela 3-18), facto também verificado por Chen e Hwa (1996). Isto deve atribuir-se à maior densidade da rede macromolecular formada durante a formação do filme, resultando numa maior elongação do filme. No entanto, Hsu *et al* (2004) concluíram que a massa molecular não parece estar relacionada com a % de elongação.

**Tabela 3-18** Propriedades mecânicas obtidas através de curvas de tensão/deformação para QP

Filme	Módulo de Young (MPa)	% Elongação	Tensão de cedência (MPa)	Tensão ruptura (MPa)
QP puro	3389 <sup>a</sup>	17.0 <sup>a</sup>	82.7 <sup>a</sup>	83.2 <sup>a</sup>
QPFO1	3314 <sup>a, b</sup>	15.7 <sup>a</sup>	57.9 <sup>b</sup>	59.0 <sup>b</sup>
QPFO2	3212 <sup>b</sup>	8.94 <sup>b</sup>	53.7 <sup>b</sup>	58.1 <sup>b</sup>
QPFO3	2294 <sup>c</sup>	3.11 <sup>c</sup>	30.3 <sup>c</sup>	34.9 <sup>c</sup>

✚ Média dos resultados (n=6) com diferentes letras são significativamente diferentes a  $p < 0.05$

### 3.4.5 Comportamento viscoelástico

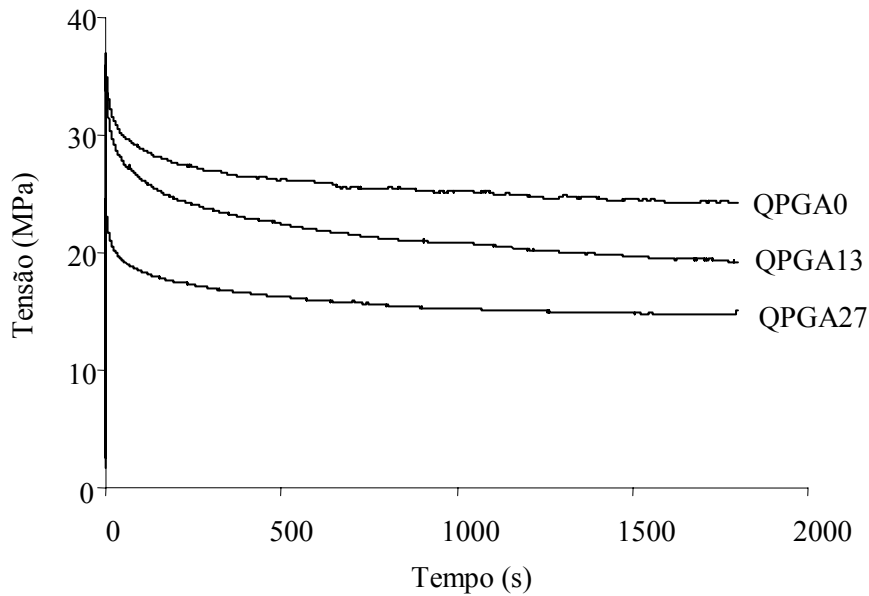
Considerando o material como um sólido viscoelástico, com um módulo de relaxação de tensão,  $E(t)$ , que se aproxima de um valor finito com o tempo ( $E_e$ ), usou-se um modelo mecânico generalizado com dois elementos de Maxwell e uma mola em paralelo, de modo a ajustar os dados de relaxação de tensão obtidos,

$$E(t) = E_e + E_1 e^{(-t/\tau_1)} + E_2 e^{(-t/\tau_2)} \quad \text{equação 3-4}$$

Onde  $E(t)$ , é o módulo de tensão de relaxação,  $E_e$  o valor limite para o módulo de relaxação ( $t \rightarrow \infty$ ),  $E_1$  e  $E_2$  e  $\tau_1$  e  $\tau_2$  são o componente módulo elástico e os tempos de relaxação, respectivamente de cada elemento de Maxwell. Este modelo mecânico ajustou-se bem aos valores obtidos, tendo-se obtido coeficientes de correlação ( $r^2$ ) entre, 0.988 e 0.994.

#### Influência do Grau de Acetilação

Exemplos das curvas de relaxação de tensão obtidas estão representados na figura 3-27. Numa fase inicial observa-se o aumento da força por imposição da deformação aplicada (0.5%). Após este período, observou-se que a força necessária para manter esta deformação decresceu com o tempo. Este comportamento é característico de materiais viscoelásticos, como os biofilmes (Cuq *et al*, 1996).



**Figura 3-27** Representação das curvas de relaxação de tensão para quitosanos com diferentes GA

Qualitativamente o comportamento de relaxação foi bastante similar. A velocidade de relaxação foi também bastante similar para todas as amostras, o que está de acordo com a falta de significância observada para o efeito do GA (tabela 3-19). No entanto, o grau de acetilação apresenta uma influência significativa no módulo de relaxação limite ( $E_e$ ), verificando-se o aumento desta propriedade à medida que o GA decresce (tabela 3-19) i.e., as membranas preparadas a partir de quitosanos com baixo GA têm um carácter sólido mais pronunciado, dissipando menos stress do valor inicial associado à deformação aplicada.



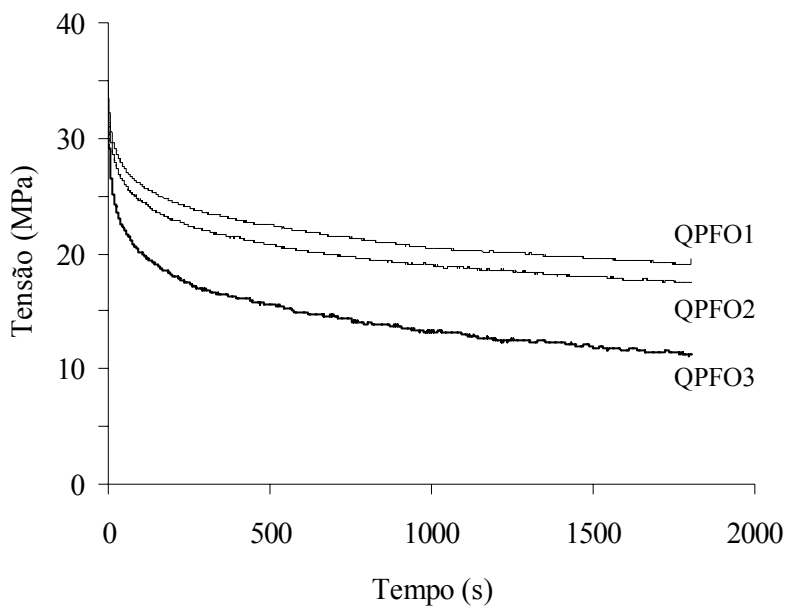
**Tabela 3-19** Módulo de relaxação e tempos de relaxação de quitosanos com diferentes GA

GA (%)	$E_e$ (MPa)	$E_1$ (MPa)	$E_2$ (MPa)	$t_1$ (s)	$t_2$ (s)
0	2333 <sup>a</sup>	539 <sup>a</sup>	669 <sup>a</sup>	39.0 <sup>a</sup>	665 <sup>a</sup>
6	2339 <sup>a</sup>	442 <sup>a</sup>	442 <sup>a</sup>	44.3 <sup>a</sup>	634 <sup>a</sup>
13	1837 <sup>b</sup>	615 <sup>b</sup>	782 <sup>a</sup>	47.6 <sup>b</sup>	732 <sup>a</sup>
20	1343 <sup>c</sup>	401 <sup>a</sup>	559 <sup>a</sup>	55.3 <sup>b</sup>	722 <sup>a</sup>
27	1274 <sup>c</sup>	382 <sup>a</sup>	428 <sup>b</sup>	26.6 <sup>c</sup>	471 <sup>b</sup>

✦ Média dos resultados (n=5) com diferentes letras são significativamente diferentes a  $p < 0.05$

### Influência da Massa Molecular

A massa molecular apresenta uma influência significativa no módulo de relaxação limite ( $E_e$ ), verificando-se o aumento desta propriedade à medida aumenta a massa molecular, como se pode verificar pela tabela 3-20. Este facto permite concluir que filmes preparados a partir de quitosanos com massas moleculares mais elevadas possuem um carácter sólido mais pronunciado, dissipando menos stress do valor inicial associado à deformação aplicada. A velocidade de relaxação é bastante semelhante como se pode observar pela figura (3-28). Daí que se verifique uma falta de significância para os restantes parâmetros.



**Figura 3-28** Representação das curvas de relaxação de tensão para quitosanos com diferentes  $M_v$

**Tabela 3-20** Módulo de relaxação e tempos de relaxação de QP com diferentes  $M_v$

Filmes	$E_e$ (MPa)	$E_1$ (MPa)	$E_2$ (MPa)	$\tau_1$ (s)	$\tau_2$ (s)
QPpur	1702 <sup>a</sup>	768 <sup>a</sup>	861 <sup>a</sup>	42.0 <sup>a</sup>	563 <sup>a</sup>
QPFO1	1645 <sup>a</sup>	648 <sup>a</sup>	803 <sup>a</sup>	39.1 <sup>a</sup>	747 <sup>a</sup>
QPFO2	1588 <sup>a</sup>	703 <sup>a</sup>	808 <sup>a</sup>	47.8 <sup>a</sup>	663 <sup>a</sup>
QPFO3	1058 <sup>b</sup>	864 <sup>b</sup>	861 <sup>a</sup>	43.6 <sup>a</sup>	777 <sup>b</sup>

✦ Média dos resultados (n=5) com diferentes letras são significativamente diferentes a  $p < 0.05$

### 3.4.6 Permeabilidade ao Vapor de Água

A permeabilidade ao vapor de água (WVP) é uma característica determinante quando se pretende utilizar materiais para embalar alimentos. A transferência de humidade é um factor que leva muitas vezes a alterações da qualidade dos alimentos durante a distribuição e o armazenamento. Valores críticos de actividade da água ( $a_w$ ) devem ser mantidos para manter a qualidade e uma segurança aceitável. A velocidade

de reacções enzimáticas e químicas deteiorativas podem aumentar se a  $a_w$  aumentar. O crescimento microbiano pode ocorrer quando a  $a_w$  excede 0.85, 0.70 e 0.60 para bactérias, leveduras e fungos, respectivamente.

### Influência do Grau de Acetilação

Os resultados obtidos para a WVP (tabela 3-21 e 3-22) mostram que à medida que aumenta o GA a WVP também aumenta. Os resultados obtidos mostram que apesar de se verificarem pequenas diferenças nos valores de WVP, para  $p < 0.05$  todos são significativamente diferentes, contradizendo o que foi anteriormente descrito por Wiles *et al* (2000) e Hwang *et al* (2003) de notar que os filmes analisados por estes investigadores não incluíram plastificante e não foram neutralizados.

O volume dos grupos acetilo influencia a conformação das moléculas criando espaços vazios entre estas. Este facto origina um menor empacotamento das cadeias de quitosano e conseqüentemente o aumento do tamanho dos poros, facilitando a permeabilidade ao vapor de água (e a % do grau de inchamento, secção 3.4.2).

**Tabela 3-21** Valores de WVP obtidos para filmes de QP com diferentes GA

Filmes	WVP (mm g/h kPa m <sup>2</sup> )
QPGA0	0.374
QPGA6	0.422
QPGA13	0.443
QPGA20	0.496
QPGA27	0.605

✦ Média dos resultados (n=3)

**Tabela 3-22** Valores de WVP obtidos para filmes QPrim

Filmes	WVP (mm g/h kPa m <sup>2</sup> )
QPrim7	0.333 <sup>a</sup>
QPrim15	0.312 <sup>a</sup>
QPrim17	0.419 <sup>b</sup>

✦ Média dos resultados (n=3) com diferentes letras são significativamente diferentes a  $p < 0.05$

Rhim *et al* (1998) descreveram valores de WVP na gama dos 3.0-8.8 gmm/m<sup>2</sup>hkPa para filmes de quitosanos (com glicerol; não neutros) preparados utilizando diferentes ácidos. Estes valores são notoriamente diferentes dos que foram determinados neste trabalho. No entanto, Butler *et al* (1996) descreveram valores de WVP para filmes de quitosano não neutralizados e plastificados com diferentes quantidades de glicerol nas gamas de 0.07-0.17 gmm/m<sup>2</sup>hkPa e de 0.03-0.08 gmm/m<sup>2</sup>hkPa para teores de glicerol de 0.63 g glicerol/g quitosano e de 0.32 g glicerol/g quitosano, respectivamente.

A discrepância entre os valores descritos na literatura, incluindo os obtidos neste trabalho, será devida à influência de diversos factores sobre a WVP para filmes hidrofílicos, tais como variações na composição, diferentes métodos utilizados, as condições da medição como o gradiente de HR, a correcção do efeito da *air gap*, e a espessura do filme (McHugh *et al*, 1993).

#### **Influência da Massa Molecular**

A massa molecular parece ter uma pequena influência na permeabilidade ao vapor de água na gama testada, aumentando esta propriedade à medida que aumenta a massa molecular conforme se pode verificar pela tabela 3-23. Hwang *et al* (2003) verificaram a mesma tendência apesar da falta de significância dos resultados.

**Tabela 3-23** Valores de WVP obtidos para filmes de QP com diferentes  $M_v$ 

Filmes	WVP (mm g/h kPa m <sup>2</sup> )
QPpur	0.380 <sup>a</sup>
QPFO1	0.370 <sup>a</sup>
QPFO2	0.298 <sup>b</sup>
QPFO3	0.318 <sup>c</sup>

✦ Média dos resultados (n=3) com diferentes letras são significativamente diferentes a  $p < 0.05$

A maior organização das cadeias de quitosano à medida que a massa molecular diminui permite um maior empacotamento das cadeias e permite a diminuição do poro da matriz do filme explicando assim o facto da permeabilidade ao vapor e do grau de inchamento diminuírem com a diminuição da massa molecular. O facto do quitosano se encontrar totalmente desacetilado, justifica uma conformação das moléculas mais estendidas devido à repulsão de cargas. Assim, o facto de existir um melhor empacotamento das moléculas com menor massa molecular pode ser atribuído ao n° e posição dos grupos NH<sub>2</sub>. Assim, as moléculas com menor  $M_v$  devem conseguir uma conformação em que conseguem minimizar as repulsões de carga melhorando o empacotamento e diminuindo o tamanho do poro.

Os valores de WVP obtidos quer para a influência da massa molecular, quer para a influência do grau de acetilação podem ser considerados como moderados, considerando a classificação descrita por Krochta e Mulder-Johnson (1997). Kittur *et al* (1998) descreveram resultados semelhantes, considerando também os filmes de quitosano como barreiras moderadas ao vapor de água. Pode assim concluir-se que os filmes de quitosano apresentam propriedades barreira moderadas quando se trata de vapor de água. Valores de WVP de filmes polímeros sintéticos como o PVC (cloreto de polivinilo), HDPE e LDPE encontrados na literatura são de respectivamente, 0.029, 0.005 e 0.001 gmm/m<sup>2</sup>hkPa (Robertson, 1993) indicando que estes filmes constituem boas propriedades barreira no que respeita ao vapor de água. Filmes preparados a partir de proteínas possuem reduzidas propriedades barreira ao vapor de água apresentando valores de 14.3 gmm/m<sup>2</sup>hkPa no caso de WPI e de 17.3 gmm/m<sup>2</sup>hkPa no caso de filmes de caseinato de sódio (Banerjee *et al*, 1994).

## CAPITULO 4- CONCLUSÕES

Os estiletos de pota revelaram ser uma fonte de  $\beta$ -quitina. O processo de obtenção é relativamente simples principalmente quando comparado com o tradicionalmente utilizado para a extracção de quitina de crustáceos.

A  $\alpha$ - quitina possui cristalitos de maiores dimensões e conseqüentemente um índice de cristalinidade superior ao da  $\beta$ -quitina obtida neste trabalho. O comportamento reológico da quitina comercial e da quitina obtida a partir de potas apresentou diferenças significativas. A viscosidade das duas soluções é muito diferente, sendo necessária uma concentração 7 vezes superior da solução de quitina comercial para se atingir a viscosidade da quitina de potas.

Quitosanos com diferentes graus de acetilação (27, 20, 13, 6 e 0%) foram obtidos por tratamento alcalino com tempos de reacção diferentes. A desacetilação descontínua é mais eficaz que a desacetilação contínua. A massa molecular dos diferentes quitosanos obtidos no processo de desacetilação não é significativamente influenciada. Soluções de quitosanos com diferentes GA a 1% (m/V) exibem um comportamento reofluidificante. O comportamento em solução do quitosano (GA=0%) a 1% em dois solventes diferentes (AcOH 0.1mol/L e AcOH 0.5 mol/L/NaCl 0.25 mol/L) é semelhante, verificando-se apenas que a viscosidade aparente é superior para soluções preparadas a partir de AcOH 0.1mol/L. O aumento da força iónica por incorporação do NaCl leva à diminuição da repulsão electroestática entre os grupos amina carregados, dando-se a contracção da molécula, traduzindo-se na diminuição da viscosidade.

Quitosanos com diferentes massas moleculares podem ser obtidos por reacção com ácido nítrico, sendo a diminuição da massa molecular mais acentuada à medida que aumenta a concentração deste e para um mesmo tempo de reacção. A influência da massa molecular nas propriedades reológicas de quitosanos com GA  $\cong$ 0% mostrou ser significativa, tendo-se verificado que a diminuição da massa molecular leva ao comportamento Newtoniano (soluções a 1% m/V).

Os filmes de quitosano foram preparados por dissolução do biopolímero em AcOH 0.1 mol/L e obtidos por evaporação do solvente.

O grau de acetilação influenciou as propriedades dos filmes de quitosano. No que diz respeito ao comportamento mecânico verifica-se que o módulo de Young, a alongação, a tensão de ruptura e a tensão de cedência aumentam com a diminuição do grau de acetilação. Este aumento das propriedades mecânicas dos filmes com o grau de acetilação mostra que as moléculas de quitosano se organizam melhor com a diminuição do grau de acetilação, provavelmente por um mais fácil empacotamento das cadeias do polímero, obtendo-se filmes mais resistentes e com maior capacidade de alongação. A absorção de água e de tampão ácido é também influenciada pelo grau de acetilação; à medida que aumenta o grau de acetilação aumenta a capacidade de absorção. A permeabilidade ao vapor de água também aumenta à medida que aumenta o grau de acetilação. Estas propriedades (WVP e absorção de água/ácido) dependem também da capacidade de organização das moléculas de quitosano nos filmes. O volume dos grupos acetilo não permite um grande empacotamento das moléculas dando origem a poros que permitem a permeação de moléculas. Ou seja, a capacidade de organização das moléculas de quitosano aumenta com a diminuição do grau de acetilação permitindo obter melhores propriedades mecânicas e melhores propriedades barreira ao vapor de água e menor capacidade de absorção. A opacidade e a espessura dos filmes aumentaram com o aumento do grau de acetilação, provavelmente devido ao aumento das interações polímero-polímero e a formação de agregados.

Verificou-se igualmente que a massa molecular influencia as propriedades dos filmes de quitosano. À medida que a massa molecular diminui os filmes perdem capacidade de alongação (% de alongação) e rigidez, o que pode ser atribuído à maior densidade da rede macromolecular formada durante a formação do filme, resultando numa menor alongação do filme.

A maior organização das cadeias de quitosano à medida que a massa molecular diminui permite um maior empacotamento das cadeias e permite a diminuição do poro da matriz do filme explicando assim o facto da permeabilidade ao vapor e do grau de inchamento diminuírem com a diminuição da massa molecular. O facto do quitosano se encontrar totalmente desacetilado, justifica uma conformação

das moléculas mais estendida devido à repulsão de cargas. Assim, o facto de existir um melhor empacotamento das moléculas com menor massa molecular pode ser atribuído ao nº e posição dos grupos  $\text{NH}_2$ . Assim, as moléculas com menor  $M_v$  devem conseguir uma conformação em que conseguem minimizar as repulsões de carga melhorando o empacotamento e diminuindo o tamanho do poro.

Verificou-se ainda que à medida que diminui a massa molecular do polímero a opacidade também diminui.





## CAPITULO 5- BIBLIOGRAFIA

ASTM: Standard Test Method for Tensile Properties of Thin Plastic Sheeting. D 882- 97, In: Annual Books of ASTM Standards (1997).

ASTM: Standard test methods for water vapor transmission of materials (96-95). Vol.4.06, P697. In: Annual Books of ASTM Standards (1995).

Agboh, O.C. e Qin, Y. (2000) "Chitin and Chitosan Fibers" *Polymers for Advanced Technologies*, 8:355-365.

Agulló, E., Rodríguez, M.S., Ramos, V. e Albertengo, L. (2003) "Present and future role of chitin and chitosan in food" *Macromolecular Bioscience*, 3(10):521-530

Aiba, S. (1986) "Studies on chitosan: 1. Determination of the degree of N-acetylation of chitosan by ultraviolet spectrophotometry and gel permeation chromatography" *International Journal of Biological Macromolecules*, 8:173

Allan, G.G. e Peyron, M. (1995a) "Molecular weight manipulation of chitosan I: kinetics of depolymerization by nitrous acid" *Carbohydrate Research*, 277: 257-272

Allan, G.G. e Peyron, M. (1995b) "Molecular weight manipulation of chitosan II: prediction and control of depolymerization by nitrous acid" *Carbohydrate Research*, 273: 273-282

Arvanitoyannis, I., Nakayama, A. e Aiba, S. (1998) "Chitosan and gelatin based films: state diagrams, mechanical and permeation properties" *Carbohydrate Polymers*, 37:371-382

Assis, O. B. G. e Leoni, A.M. (2003) "Filmes comestíveis de quitosana" *Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento*, 30:33-39

Assis, O. B. G. e Valmir, L.S.(2003) "Caracterização estrutural e da capacidade de absorção de água em filmes finos de quitosana processados em diversas concentrações" *Polímeros*, 13(4):223-228

Association of Official Analytical Chemistry - AOAC. (1984), *Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists*. 14. ed. Arlington. pp 1141.

Austin, P.R., Castle, J.E. e Albiesetti, C.J. (1989) " Beta-Chitin from squid: new solvents and plasticizers" in *Chitin and Chitosan: sources, chemistry, biochemistry, physical properties and applications*, Elsevier Science London, 749-755

Baldwin, E. (1999) "Surface treatments and edible coatings in food preservation" in *Handbook of food preservation*, Marcel Dekker

Baldwin, E.A., Nisperos-Carriedo, M.O. e Baker, R.A. (1995) "Use of edible coatings to preserve quality of lightly (and slightly) processed products" *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 35:509-524.

- Banerjee, R., Chen, H., Hendricks, G. e Levis, J. (1994) "Functional Properties of edible films from whey protein concentrate" *Journal of Dairy Science*, 77(1):7
- Baxter, A., Dillon, M., Taylor, K. e Roberts, G. (1992) "Improved method for I.R. Determination of the degree of N-acetylation of chitosan" *International Journal of Biological Macromolecules*, 14:166-169.
- Baxter, S., Zivanovic, S. e Weiss, J. (2005) "Molecular weight and degree of acetylation of high-intensity ultrasonicated chitosan" *Food Hydrocolloids*, 19:821-830
- Bégin, A. e Calsteren, M.R.V. (1999) "Antimicrobial films produced from chitosan" *International Journal of Biological Macromolecules*, 26:63-67
- Berth, G., Dautzenberg, H. e Peter, M.G. (1998) "Physico-chemical characterization of chitosan varying in the degree of acetylation" *Carbohydrate Polymers*, 36:205-216
- Bhale, S., No, H.K., Prinyawiwatkul, W., Farr, A.J., Nadarajah, K. e Meyers, S.P. (2003) "Chitosan coatings improves shelf life of eggs" *Journal of Food Science*, 68(7):2378-2383
- Brousignac, P. (1968) "Chitosan, a natural polymer not well known by the industry" *Chimie Industrie Genie Chimique* 99:88-102
- Brugnerotto, J., Lizardi, J., Goycoolea, F.M., Arguelles-Monal, W., Desbrières, J. e Rinaudo, M. (2001) "An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization" *Polymer*, 42:3569-3580
- Buhler, E., e Rinaudo, M. (2000) "Structural and Dynamical Properties of Semirigid Polyelectrolyte Solutions: A Light-Scattering Study" *Macromolecules*, 33(6):2098-2106
- Butler, B.L., Vergano, P.J., Testin, R.F., Bunn, J.M. e Wiles, J.L. (1996) "Mechanical and barrier properties of edible chitosan films as affected by composition and storage" *Journal of Food Science*, 61: 953-955, 961.
- Campana Filho, S. P. e Signini, R. (2001) "Efeito de Aditivos na Desacetilação de Quitina" *Polímeros*, 11(4):169-173
- Campana Filho, S. P. e Signini, R. (2004) "Efeito de Aditivos na Desacetilação de Quitina" *Polímeros*, 11(4):169-173
- Caner, C.; Vergano, P.J. e Wiles, J.L. (1998) "Chitosan film mechanical and permeation properties as affected by acid, plasticizer, and storage" *Journal of Food Science*, 63(6): 1049-1053
- Cardenas, G., Cabrera, G. e Casals, B. (2004) "Chitosan derivatives. Agricultural applications as slow release biocides" in livro de resumos III simposio Iberoamericano de quitina, Córdoba- Espanha
- Cardenas, G., Cabrera, G., Taboada, E. e Miranda, S.P. (2004) "Chitin characterization by SEM, FTIR, XRD, and <sup>13</sup>C cross polarization/magic angle spinning NMR" *Journal of Applied Polymer Science*, 93: 1876-1885

- Cardoso, M.B., Signini, R. e Campana-Filho, S.P. (2001) "On the sonication of chitin: effects on its structure and morphology and influence on its deacetylation" *Polymer Bulletin*, 47:183-190
- Chamdupai A., Singhpibulporn, N. Faroongsarng, D.e Sornparasit, P. (2004) "Preparation and physico-chemical characterization of chitin and chitosan from the pens of the squid species, *Loligo lessoniana* and *Loligo formosana*" *Carbohydrate Polymers*, 54: 467-474
- Chandra, P. K. e Sobral, P. J. A (2000) "Calculation of viscoelastic properties of edible films: application of three models" *Ciência Tecnologia Alimentos*, 20(2):250-256
- Chang, K.L.B., Tsai, G., Lee, J.e Fu, W-R. (1997) "Heterogeneous N-deacetylation of chitin in alkaline solution" *Carbohydrate Research*, 303:327-332
- Chen, H. (1995) "Functional properties and applications of edible films made of milk proteins" *Journal of Dairy Science*, 78:2563-2583
- Chen, M., Yeh, G., e Chiang, B. (1996) "Antimicrobial and physicochemical properties of methylcellulose and chitosan films films containing a preservative" *Journal of Food Processing and Preservation*, 20:379-390
- Chen, P., Lin, H. e Yang, M. (1994) "Relationships between the chain flexibilities of chitosan molecules and the physical properties of their casted films" *Carbohydrate Polymers*, 24:41-46
- Chen, R.H. e Hwa, H-D. (1996) "Effect of molecular wheight of chitosan with the same degree of deacetylation on the thermal, mechanical, and permeability properties of the prepared membrane" *Carbohydrate Polymers*, 29:353-358.
- Chen, R.H. e Tsaih, M.L. (1998) " Effect of temperature on the intrinsic viscosity and conformation of chitosan in dilute HCl solution" *International Journal of Biological Macromolecules*, 23:135-141
- Chen, X.G., Zheng, L., Wang, Z., Lee, C.Y. e Park, H.J. (2002) "Molecular affinity and permeability of different molecular wheight chitosan membranes" *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50:5915-5918.
- Commitee on codex specification. *Food Chemical Codex*. 181 3rd edn., Washington, D.C.: National Academy Press. ISBN 0-309-06366-3
- Cuq, B., Gontard, N., Cuq, J.L. e Guilbert, S. (1996) " Rheological model for the mechanical properties of myofibrillar protein-based films" *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44:1116-1122
- Desbrieres, J. (2002) "Viscosity of semiflexible chitosan solutions:influence of concentration, temperature, ande role of intermolecular interactions" *Biomacromolecules*, 3:342-349
- Domard, A. (1987) "Determination of N-acetyl content in chitosan samples by c.d. Measurements" *Int. J. Biol. Macromol.*, 9(6): 333-336.

- Domard, A. e Rinaudo, M. (1983) "Preparation and characterization of fully deacetylated chitosan" *International Journal of Biological Macromolecules*, 5:49-52
- Duarte, M.L., Ferreira, M. C. e Marvão, M.R. (2004) "Spectroscopic methods to determine the degree of acetylation of chitin/chitosan: a critical review" in *Simposio Iberoamericano de Quitina*
- Duarte, M.L., Ferreira, M.C., Marvão, M.R. e Rocha, J. (2001) "Determination of the degree of acetylation of chitin materials by  $^{13}\text{C}$  CP/MAS NMR spectroscopy" *International Journal of Biological Macromolecules*, 28:359-363
- Duarte, M.L., Ferreira, M.C., Marvão, M.R. e Rocha, J. (2002) "An optimised method to determine the degree of acetylation of chitin and chitosan by FTIR spectroscopy" *International Journal of Biological Macromolecules*, 00:1-8
- Ebert, A. e Fink, H.-P. (1996) "Solid-state NMR spectroscopy" in *Chitin Handbook*. R.A.A. Mwzzarelli e M.G. Peter
- El Gaouth, A., Arul, J., Wilson, C. e Benhamou, N. (1997) "Biochemical and cytochemical aspects of the interactions of chitosan and *Botrytis cinerea* in bell pepperfruit" *Postharvest Biology and Technology*, 12:183-194
- El Ghaouth, A., Arul, J., Ponnampalalan, R. e Boulet, M. (1991) "Chitosan coating effect on storability and quality of fresh strawberries" *Journal of Food Science*, 56:1618-1624.
- El-Gaouth, A. (1997) "Biologically based alternatives to synthetic fungicides to control postharvest diseases" *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 19:160-162
- El-Gaouth, A., Smilanick, J.L. e Wilson, C.L. (2000) "Enhancement of the performance of *Candida saitoana* by the addition of glycolchitosan for the control of postharvest decay of apple and citrus fruit" *Postharvest Biology and Technology*, 19:103-110
- Galed, G. Fernandez-Valle, M.E., Martinez, A. e Heras, A. (2004) "Application of MRI to monitor the process of ripening and decay in citrus treated with chitosan solutions" *Magnetic Resonance Imaging*, 22:127-137
- Goosen, M.F.A., (1997) "Applications of chitin and chitosan", Technomic Publishing Company, Inc, Chapters 1, 4 and 16.
- Goycoolea, F.M., Higuera-Ciapara, I., Herneandez, G., Lizardi, J. e Garcia, K.D. (1997) "Preparation of chitosan from squid (*loligo soo.*) pen by a micrwave accelirated thermochemical process" *Advances in Chitin Science*. A.Domard, G.A.F.Roberts e K.M. Varum
- Han, C., Zhao, Y., Leonard, S.W. e Traber, M.G. (2004) "Edible coatings to improve storability and enhanced nutritional value of fresh and frozen strawberries (*Fragaria x ananassa*) and raspberries (*Rubus ideaus*)" *Postharvest Biology and Technology*, 33:67-78
- Heux, L., Brugnerotto, J., Desbrières, J., Versali, M.F. e Rinaudo, M. (2000) "Solid state NMR for determination of degree of acetylation of chitin and chitosan" *Biomacromolecules*, 1(4): 746-751

- Hirano, S. (1999) " Chitin and chitosan as novel biotechnological materials" *Polymer International*, 48:732-734
- Hoagland, P.D. e Parris, N. (1996) "Chitosan/Pectin laminated films" *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44:1915-1919
- Hsu, S.-H., Whu, S.W., Tsai, C.-L., Wu, Y.-H., Chen, Y.-H. e Hsieh, K.- H. (2004) "Chitosan as scaffold materials: effects of molecular weight and degree of deacetylation" *Journal of Polymer Research*, 00:1-7
- Hwang, K.T., Kim, J.T., Jung, S.T., Cho, G.S. e Park, H.J. (2003) "Properties of chitosan-based biopolymer films with various degrees of deacetylation and molecular weights " *Journal of Applied Polymer Science*, 89:3476-84.
- Immirzi, B., Malinconico, M., Romano, G., Russo, R. e Santagata, G. (2003) "Biodegradable films of natural polysaccharides blends" *Journal of Materials Science Letters*, 22:1389-1392
- Inove, Y. (1996) "NMR determination of the degree of acetylation" in *Chitin Handbook*. R.A.A.Muzzarelli e M.G.Peter
- Kam, H.M., Khor, E. e Lim, L.Y. (1999) " Storage of partially deacetylated chitosan films" *Journal of Biomedicine Materials Research*, 48:881-888
- Kasaai, M., Arul, J. e Charlet, G. (2000) " Intrinsic viscosity-molecular weight relationship for chitosan" *Journal of Polymer Science: Part B*, 38:2591-2598
- Kassai, M., Arul, J., e Charlet, G. (2000) "Intrinsic viscosity-molecular weight relationship for chitosan" *Journal of Polymer Science parte B*, 38:2591-2598
- Kester, J.J. e Fennema, O. (1986) "Edible films and coatings: A review" *Food Technologie*, 40(12): 47-59.
- Khor, E. (2002) " Chitin:a biomaterial in waiting" *Cuerrent Opinion in Solid State nad Materials Science*, 6:313-317
- Kim, S.S., Kim, S.H. e Lee, Y.M. (1996) " Preparation, characterization, and properties of beta-chitin and N-acetylated beta-chitin" *Journal of Polymer Science, Part B: Polymer Physics*, 34:2367-2374.
- Kittur, F., Prashanth, K.V., Sankar, K.U. e Tharanathan, R.N. (2002) "Characterization of chitin, chitosan and their carboxymethyl derivatives by differential scanning calorimetry", *Carbohydrate Polymers*, 49:185-193.
- Kittur, F.S., Kumar, K.R. e Tharanathan, R.N. (1998) "Functional packaging properties of chitosan films", *-Z. Lebensm Unters Forsch A.*, 206:44-47
- Knorr, D. (1991) "Recovery and utilization of chitin and chitosan in food processing waste management" *Food Technology*, 45:114-122

- Kondo, Y., Nakatani, A., Hayashi, K. e Ito, M. (2000) "Low molecular weight chitosan prevents the progression of low dose streptozotocin induced slowly progressive diabetes mellitus in mice" *Biological Pharmacy Bulletin* 23-1458-1464
- Kristbergson, K., Einarsson, J.M., Hauksson, S.P. e Gillason, J. (2003) "Recent Developments in deacetylation of chitin and possible applications in food applications" *cit in Quitina y quitosano: obtencion, caracterization y aplicaciones*, Ana Pastor de Abram (2004)
- Krochta, J.M. e Mulder-Johnston, C. (1997) "Edible and biodegradable polymer films: challenges and opportunities" *Food Technology*, 51(2):61-74.
- Kumar, A.B.V. e Tharanathan, R.N. (2004) "A comparative study on depolymerization of chitosan by proteolytic enzymes" *Carbohydrate Polymers*, 58:275-283
- Kumar, A.B.V., Varadaj, M.C., Lalitha, R.G. e Tharanathan, R.N. (2004) "Low molecular weight chitosans: preparation with the aid of papain and characterization" *Biochimica et Biophysica Acta*, 1670:137-146
- Kumar, M.N.V.R. (2000) "A review of chitin and chitosan applications" *Reactive & Functional Polymers*, 46:1-27
- Kurita, K. (2001) "Controlled functionalization of the polysaccharide chitin" *Progress Polymer Science*, 26:1921-1971.
- Kurita, K., Mori, Y. e Nishiyama, Y. (2000) "Enzymatic degradation of -chitin: susceptibility and the influence of deacetylation" *Carbohydrate Polymers*, 42: 19-21
- Kurita, K., Tomita, K., Tada, T., Ishii, S., Nishimura, S. e Shimoda, K. (1993) "Squid chitin as a potential alternative chitin source: Deacetylation behavior and characteristic properties" *Journal Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 31:485-492.
- Kurita, K., Tomita, K., Tada, T., Ishii, S., Nishimura, S. e Shimoda, K. (1993), "Squid chitin as a potencial alternative chitin source: deacetylation behaviour and characteristic properties" *Journal of Polymer Science*, 31:485-491.
- Lai, L. e Chiang, H. (2002) "Rheology of decolorized hsian-tsoo leaf gum in the dilute domain" *Food Hydrocolloids*, 16:427-440
- Lapasin, R. e Pricl, S. (1995) *In Rheology of industrial polysaccharides theory and applications*, Blackie Academic
- Larena, A. e Cáceres, D.A.. (2004) "Variability between chitosan membrane surface characteristics as function of its composition and environmental conditions" *Applied Surface Science*, 238:273-277
- Makino, Y. e Hirata, T. (1997) "Modified atmosphere packaging of fresh produce with a biodegradable laminate of chitosan-cellulose and polycaprolactone" *Postharvest Biology and Technology*, 10:247- 254

- Martinou, A., Kafetzopoulos, D. e Bouriotis, V. (1995) "Chitin deacetylation by enzymatic means: monitoring of deacetylation process" *Carbohydrate Research*, 273:235-242.
- Mchugh, T.H., Avena-Bustillos, R. e Krochta, J.M. (1993) "Hydrophilic edible films: Modified procedure for water vapor permeability and explanation of thickness effects" *Journal of Food Science*, 58(4):899-903
- McLean, C.H. e Addison, P.A. (1995) " Squid Chitin: an untapped resource" in *Proceedings IPENZ Annual Conference-Innovative Technology*, 2:231-233
- Methacanon, P., Prasitsilp, M., Pothsree, P. e Pattaraarchachai, J. (2003) "Heterogenous N-deacetylation of squid chitin in alkaline solution" *Carbohydrate Polymers*, 52:119-123
- Milas, M. Rinaudo, M., Knipper, M. e Schuppiser, J.L. (1990) " Flow and viscoelastic properties of xanthan gum solutions" *Macromolecules*, 23(9): 2506-2511
- Miller, K.S. e Krochta, J.M. (1997) "Oxygen and aroma barrier properties of edible films: A review" *Trends in Food Science and Technology*, 8:228-237
- Miya, M., Iwamoto, R. Ohta, K. e Mima, S.(1980) "I.r. spectroscopic determination of CONH content in highly deacylated chitosan" *International Journal of Biological Macromolecules*, 2:323
- Molloy, C., Cheah, L.H. e Koolaard, J. P. (2004) "Induced resistance against *Sclerotinia sclerotiorum* in carrots treated with enzymatically hydrolysed chitosan" *Postharvest Biology and Technology*, 33:61- 65
- Muzzarelli, R.A.A. e Rocchetti, R. (1985) "Determination of the degree of acetylation of chitosans by first derivativeultraviolet spectrophotometry" *Carbohydrate Polymers*, 5:461-472
- Muzzarelli, R.A.A., (1997) "Chitin handbook", European Chitin Society.
- Myia, M.,Iwaamoto, R., Yoshikawa, S. e Mima, S. (1980) "IR spectroscopic determination of amide (CONH) content in highly deacetylated chitosan" *International Journal of Biological Macromolecules*, 2:115-116
- Niola, F., Basora, N., Chornet, E. e Vidal, P. (1993) "A rapid method for the determination of the degree of N-acetylation of chitin-chitosan samples by acid hydrolysis and HPLC" *Carbohydrate Research*, 238:1
- No, H.K. e Meyers, S.P. (1995) "Preparation and characterization of chitin and chitosan- A review" *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 4(2):27-52
- No, H.K., Meyers, S.P. e Lee, K.S. (1989) "Isolation and characterization of chitin from crawfish shell waste" *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 37: 575-580.
- No, H.K., Nah, J. W. e Meyers, S.P. (2003) "Effect of time temperature treatment parameters on depolymerization of chitosan" *Journal of Applied Polymer Science*, 87:1890-1894.



- No, H.K., Nah, J. W. e Meyers, S.P., Lee, K. (1989) "Isolation and characterization of chitin from crawfish shell waste" *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 37(3):575-579
- Nunthanid, J., Puttipipatkachorn, S., Yamamoto, K. e Peck, G. E. (2001) "Physical properties and molecular behavior of chitosan films" *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 27(2):143-157.
- Ottoy, M., Varum, K.M. e Smidsrod, O. (1996) "Compositional heterogeneity of heterogeneously deacetylated chitosans" *Carbohydrate Polymers*, 29:17-24
- Parris, N., Coffin, D., Joubran, R. e Pessen, H. (1995) "Composition factors affecting the water vapor permeability and tensile properties of hydrophilic films" *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43:1432-1435
- Pedroni, V.I., Schulz, P.C., Gschaidner, M.E. e Andreucetti, N. (2003) "Chitosan structure in aqueous solution" *Colloid Polymer Science*, 282:100-102
- Peniche, C., Arguelles-Monal, W., Peniche, H. e Acosta, N. (2003) "Chitosan: an attractive biocompatible polymer for microencapsulation" *Macromolecular Bioscience*, 3:511-520
- Poirier, M. e Charlet, G. (2002) "Chitin fractionation and characterization in N,N-dimethylacetamide/lithium chloride solvent system" *Carbohydrate Polymers*, 50:363-370
- Prashanth, K.V., Kittur, F.S. e Tharanathan, R. N. (2002) "Solid state structure of chitosan prepared under different N-deacetylating conditions", *Carbohydrate Polymers*, 50:27-33.
- Rao, S. B. e Sharma, C.P. (1997) "Use of chitosan as a biomaterial: studies on its safety and hemostatic potencial" *Journal Biomedical Materials Research*, 34: 21-28
- Rashidova, S., Milusheva, R., Voropaeva, N.V., Pulatova, S., Nikonovich, G. e Ruban, I.N (2004) "Isolation of chitin from a variety of raw materials, modification of the material, and interaction its derivatives with metal ions" *Chromatographia*, 59:783-786
- Rathke, T. e Hudson, S. (1993) "Determination of the degree of N-deacetylation in chitin and chitosan as well as their monomer sugar ratios by near infrared spectroscopy" *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 31:749-753
- Raymond, L., Morin, F.G. e Marchessault, R.H. (1993) "Degree of acetylation of chitosan using conductometric titration and solid-state NMR" *Carbohydrate Research*, 246: 331-336.
- Reddy, M.V., Belkacemi, K., Corcuff, R., Castaigne, F. e Arul, J. (2000) "Effect of pre-harvest chitosan sprays on post-harvest infection by *Botrytis cinerea* and quality of fresh strawberry fruit" *Postharvest Biology and Technology*, 20: 39-51
- Rege, P. R. e Block, L.H. (1999) "Chitosan processing: influence of process parameters during acidic and alkaline hydrolysis and effect of the processing sequence on the resultant chitosan's properties" *Carbohydrate Research*, 321:235-245

- Rhazi, M., Desbrières, J., Tolmaite, A.M., Alagui, A. e Vottero, P. (2000) "Investigation of different natural resources of chitin: influence of the source and deacetylation process on the physicochemical characteristics of chitosan" *Polymer International*, 49:337-344
- Rhim, J.W., Weller, C.L. e Ham, K.S. (1998) "Characteristics of chitosan films as affected by type of solvent acid" *Food Science Biotechnology*, 7(4):263-268.
- Richardson, S.C.W., Kolbe, H.V.J. e Duncan, R. (1999) "Potential of low molecular mass chitosan as a DNA delivery system: biocompatibility, body distribution and ability to complex and protect DNA" *International Journal of Pharmaceutics*, 178:231-243
- Rinaudo, M., Le Dung, P., Gey, C. e Milas, M. (1992) "Substituent distribution on O,N-carboxymethylchitosans by  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  N.M.R." *International Journal Biological Macromolecules*, 14: 122-128
- Rinaudo, M., Milas, M. e Dung, P.L. (1993) "Characterization of chitosan. Influence of ionic strength and degree of acetylation on chain expansion" *International Journal of Biological Macromolecules*, 15:281-285
- Rinaudo, M., Pavlov, G. e Desbrières, J. (1999) "Influence of acetic acid concentration on the solubilization of chitosan" *Polymer*, 40:7029-7032
- Rinaudo, M. e Domard, A. (1988) "Solution properties of chitosan" in 4th International conference on chitin and chitosan in Trondheim p71-86
- Roberts, G.A.F. (1992) "Chitin Chemistry", MacMillan., Ch 3.
- Roberts, G.A.F. (1997) "Determination of the degree of N-acetylation of chitin and chitosan" Em: "Chitin Handbook", R.A.A. Muzzarelli e M.G. Peter (Eds.), European Chitin Society.
- Roberts, G.F.A. e Domszy, J.G. (1982) "Determination of the viscosimetric constants for chitosan" *International Journal of Biological Macromolecules*, 4:374-377
- Robertson, G. (1993) in *Food packaging: principles and practice*, Marcel Dekker
- Rodriguez, M.S., Ramos, V. e Agulló, E. (2003) "Antimicrobial action of chitosan against spoilage organisms in precooked pizza" *Journal of Food Science*, 68:271-274
- Romanazzi, G., Nigro, F. e Ippolito, A. (2003) "Short hypobaric treatments potentiate the effect of chitosan in reducing storage decay of sweet cherries" *Postharvest Biology and Technology*, 29: 73- 80
- Romanazzi, G., Nigro, F. Ippolito, A., Di Venere e Salerno, M. (2002) "Effects of pre and postharvest chitosan treatments to control storage grey mold of table grapes" *Journal of Food Science*, 67: 1862-1867
- Rueda, D.R., Secall, T. e Bayer, R.K. (1999) "Differences in the interaction of water with starch and chitosan films as revealed by I.R. and DSC", *Carbohydrate Polymers*, 40:49-56

- Santos, C., Seabra, P., Delgadillo, I. e Lopes da Silva, J.A.(2004) "Membranas de quitosano e interações com a água- efeito do grau de acetilação do biopolímero" in Encontro Nacional da Sociedade Portuguesa de Química
- Santos, J.E., Soares, J.P. e Dockal, E.R. (2003) "Caracterização de quitosanas comerciais de diferentes origens" *Polímeros*, 13(4):242-249
- Santosa, F.X., e Padua, G.W. (1999) "Tensile properties and water absorption of zein sheets plasticized with oleic and linoleic acids" *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47: 2070-2074
- Senel, S. e McClure, S. (2004) "Potencial applications of chitosan in veterinary medicine" *Advanced Drug Delivery Reviews*, 56(10):1467-1480
- Shahidi, F. e Synowiecki, J. (1991) "Isolation and characterization of nutrients and value-added products from snow crab (*Chionoectes opilio*) and shrimp(*Pandalus borealis*) procesing discards" *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 39: 1527-1532
- Shahidi, F., Arachchi, J.K.V. e Jeon, Y. (1999) "Food applications of chitin and chitosan" *Trends in Food Science & Technology*, 10:37-51
- Shepherd, R., Reader, S. e Falshaw, A. (1997) "Chitosan functional properties" *Glycoconjugate Journal*, 14:535-542
- Shigemasa Y., Matsuura, H. Sashiwa, H. e Saimoto, H. (1996) "Evaluation of different absorbance ratios from infrared spectroscopy for analyzing the degree of deacetylation in chitin" *International Journal of Biological Macromolecules*, 18:237-242
- Signini, R. e Filho-Campana, S.P. (2001) "Características e propriedades de quitosanas purificadas nas formas neutra, acetato e cloridrato" *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, 11:58-64
- Signini, R. e Filho-Campana, S.P. (2002) "Rheology of chitosan solutions" in livro de resumos do Euchis 2002.
- Sriegel, A.M. e Timpa, J. D. (1995) "Molecular characterization of polysaccharides dissolved in Me<sub>2</sub>NAC-LiCl by gel -permeation chromatography" *Carbohydrate Research*, 267:271-290
- Srinivasa, P., Baskaran, R., Ramesh, M.N., Prashanth, K.V. R. e Tharanathan, R. (2002) "Storage studies of mango packed using biodegradable chitosan film" *European Food Research Technology*, 215: 504-508
- Srinivasa, P., Susheelamma, N., Ravi, R. e Tharanathan, R. (2004) "Quality of mango fruits during storage: effect of syntetic and eco-friendly films" *Journal Science of Food and Agriculture*, 84: 818-824
- Srinivasa, P.C., Ramesh, M.N., Kumar,K.R. e Tharanathan, R.N. (2004) "Properties of chitosan films prepared under different drying conditions" *Journal of Food Engineering*, 63:79-85

- Tanada-Palmu, P., Fakhouri, F., Grosso, C. (2002) "Filmes Biodegradáveis: extensão da vida útil de frutos tropicais" *Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento*, 26:12-17
- Terbojevich, M. e Cosan, A. (1997) "Molecular weight determination of chitin and chitosan" in *Chitin Handbook*. R.A.A. Muzzarelli e M.G. Peter
- Terbojevich, M., Carraro, C. e Cosani, A. (1988) "Solution studies of the chitin-lithium chloride-N,N-di-methylacetamide system" *Carbohydrate Research*, 180:73-86
- Tharanathan, R.N. (2003) "Biodegradable films and composite coatings: past, present and future" *Trends in Food Science & Technology*, 14:71-78
- Tharanathan, R.N. e Kittur, F. (2003) "Chitin- the undisputed biomacromolecule of great potential" *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 43 (1):61-87
- Tolmaite, A., Desbrières, J., Rhazi, M., Alagui, A., Vincendon, M. e Vottero, P. (2000) "On the influence of deacetylation process on the physicochemical characteristics of chitosan from squid chitin" *Polymer*, 41:2463-2469
- Tommeraaas, K., Varum K., Chritensen B. e Smidsrod O. (2001) "Preparation and characterization of oligosaccharides produced by nitrous acid depolymerisation of chitosans" *Carbohydrate Research*, 333:137-144.
- Tripathi, P. e Dubey, N.K. (2004) "Exploitation of natural products as an alternative strategy to control postharvest fungal rotting of fruit and vegetables" *Postharvest Biology and Technology*, 32:235-245
- Tsai, G., Wu, Z.Y. e Su, W.H. (2000) "Antibacterial activity of chito oligosaccharide mixture prepared by cellulase digestion of shrimp chitosan and its application in milk preservation" *Journal of Food Protection*, 63:747-752
- Tsaih, M. L. e Chen, R.H. (2003) "Effect of degree of deacetylation of chitosan on the kinetics of ultrasonic degradation of chitosan" *Journal of Applied Polymer Science*, 90:3526-3531
- Tsaih, M. L. e Chen, R.H. (2003) "The effect of reaction time and temperature during heterogeneous alkali deacetylation on degree of deacetylation and molecular weight of resulting chitosan" *Journal of Applied Polymer Science*, 88:2917-2923
- Tsaih, M.L. e Chen, R.H. (1999) "Molecular weight determination of 83% degree of deacetylation chitosan with non-gaussian and wide range distribution by high-performance size exclusion chromatography and capillary viscometry" *Journal of Applied Polymer Science*, 71:1905-1913
- Varma, A.J., Deshpande, S.V. e Kennedy, J.F. (2004) "Metal complexation by chitosan and its derivatives: a review" *Carbohydrate polymers*, 55:77-93
- Varum, K.M., Anthonsen, M.W., Grasdalen, H. e Smidsrod, O. (1991) "Determination of the degree of N-acetylation and the distribution of N-acetyl groups in partially N-deacetylated chitins (chitosans) by high-field n.m.r. spectroscopy" *Carbohydrate Research*, 211: 17-23.

- Vikhoreva, G. A., Kil'deeva, N. R., Yu, M. U. e Nochevkina, Y.N. (2002) "Fabrication and Study of the Degradability of Chitosan Films" *Fibre Chemistry*, 34(6):407-411
- Wang, W., Bo, S., Li, S. e Quin, W. (1991) "Determination of the Mark-Houwink equation for chitosans with different degrees of deacetylation " *International Journal of Biological Macromolecules*, 13:281-285
- Wiles, J.L., Vergano, P.J., Barron, F.H., Bunn, J.M. e Testin, R.F. (2000) "Water vapor transmission rates and sorption behavior of chitosan films" *Journal Food Science*, 65(7):1175-1179.
- Wong, D.W.S., Gastineau, F.A., Gragorsky, K.S., Tillin, S.J. e Pavlath, A.E. (1992) " Chitosan-lipid films: microstructure and surface energy" *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40:540-544
- Worrell, D., Carrington, C.M. e Huber, D.J. (2002) "The use of low temperature and coatings to maintain storage quality of breafruit, *Artocarpus altilis* (Parks.) Fosb." *Postharvest Biology and Technology*, 25:33- 40
- Xu, J., McCarthy, P. Gross, R. e Kaplan, D. (1996) "Chitosan film acylation and effects on biodegradability" *Macromolecules*, 29: 3436-3440
- Young, L. e Paulson, A. (2000) "Effects of lipids on the mechanical and moisture barrier properties of edible gellan films" *Food Research International*, 33:571-578.
- Yu, G., Morin, F.G., Nobes, G.A.R. e Marchessault, R.H. (1999) "Degree of acetylation of chitin and extent of grafting PHB on chitosan determined by solid state <sup>15</sup>N NMR" *Macromolecules*, 32: 518-520.
- Zhang, D. e Quantick, P. (1997) "Effects of chitosan on enzymatic browning and decay during postharvest storage of litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) fruit" *Postharvest Biology and Technology*, 12:195-202
- Zhang, H. e Neau, S.H. (2001) "In vitro degradation of chitosan by a commercial enzyme preparation: effect of molecular weight and degree of deacetylation" *Biomaterials*, 22:1653-1658