



Henrique Tiago Martins Marçal

Licenciado em Ciências de Engenharia Química e Bioquímica

**Produção de Filmes de Quitina com Líquidos
Iónicos Biocompatíveis para Aplicações
Biomédicas**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Química e Bioquímica

Orientador: Doutora Luísa Alexandra Graça Neves
Co-orientador: Professora Doutora Isabel Maria Rôla Coelho
Professor Doutor João Paulo Serejo Goulão Crespo

Júri:

Presidente: Professor Doutor Rui Manuel Freitas Oliveira
Arguente: Professor Doutor Vítor Manuel Delgado Alves
Vogal: Doutora Luísa Alexandra Graça Neves

Henrique Tiago Martins Marçal

Licenciado em Ciências de Engenharia Química e Bioquímica

**Produção de Filmes de Quitina com Líquidos
Iónicos Biocompatíveis para Aplicações
Biomédicas**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Química e Bioquímica

Outubro 2013

Henrique Tiago Martins Marçal

Licenciado em Ciências de Engenharia Química e Bioquímica

**Produção de Filmes de Quitina com Líquidos Iónicos
Biocompatíveis para Aplicações Biomédicas**

“Copyright”

Eu, Henrique Tiago Martins Marçal, declaro que a Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Dedicatória

Desde o dia 21 de Dezembro de 1999 que confesso que não sabia como iria reagir quando chegasse um momento como este. Agora já sei, felizmente ou infelizmente!!

Porque não há nada que aconteça na minha vida, da coisa mais importante à coisa mais insignificante, em que não me dê instantaneamente uma vontade gigante de partilhar contigo.

Por tudo o que representas para mim, por tudo o que me ensinaste, pelo orgulho que tinhas em mim, pela maneira como sempre me trataste e me fizeste sentir... por tudo o que sempre foste, és, e sempre serás para mim e por seres simplesmente “a minha pessoa”!! Onde quer que estejas, sei que te sentes a pessoa mais orgulhosa do mundo!!

“Toda a tua vida agiste na perfeição, jamais te esquecerei avô do meu coração”

- Henrique Marçal

Esta minha tese é dedicada inteiramente a ti!!

Agradecimentos

“No meio da dificuldade encontra-se a oportunidade”

- Albert Einstein

É com uma grande alegria e satisfação, mas acima de tudo com um orgulho enorme que chego a este tão desejado momento. Momento esse que como em todos os outros momentos da vida, só faz sentido quando partilhado com quem viveu, acompanhou, partilhou, sofreu, e de certa maneira contribuiu, deixando uma parte de si, para a sua chegada...

Queria agradecer em primeiro lugar e em especial, à minha orientadora, a Doutora Luísa Neves. Em primeiro lugar por ter acreditado e confiado em mim de uma maneira que já nem eu começava a acreditar e a confiar, muito obrigado!! Em segundo lugar, por ter sempre sempre, uma palavra encorajadora, um conselho, uma alternativa, uma solução, uma resposta, e tudo com um sorriso e uma enorme simpatia, muito obrigado!! E por último por toda a entrega e dedicação a este trabalho, por todo o apoio mesmo nas alturas mais difíceis, por todos os desafios lançados, por tudo o que me ensinou, por tudo que me fez crescer, e por me ter ensinado a ver a vida de uma maneira diferente e mais responsável. Muito, muito obrigado por me ter feito voltar a acreditar em mim!!

Aos meus co-orientadores, a Professora Isabel Coelho e o Professor João Paulo Crespo, queria agradecer em primeiro lugar, o facto de me terem proporcionado a oportunidade de fazer parte deste projecto, deste grupo, desta ideia, deste tema, muito obrigado!! Muito obrigado também por toda a ajuda, motivação, esclarecimento, e principalmente por tudo o que me ensinaram, não só na realização deste trabalho, mas também ao longo de todo o curso. Por serem dois exemplos a seguir. Muito obrigado!!

Ao Doutor Vítor Alves, por toda a ajuda na realização dos ensaios de reologia, por todo o conhecimento partilhado, pela inteira disponibilidade e prontidão que sempre demonstrou no esclarecimento de dúvidas, ou apenas curiosidades, e por todo o encorajamento de que é sempre possível fazer mais e melhor. Muito obrigado!!

Ao Nuno Costa, e à Carla Rodrigues por todo o trabalho nas análises de HPLC e DSC respectivamente, e pela simpatia e prontidão com que sempre responderam aos meus (inúmeros) pedidos. Muito obrigado!!

À doutora Filomena Freitas, à Inês Farinha e à Diana, pela produção do CQG, e por toda ajuda e simpatia demonstradas no esclarecimento das minhas (muito frequentes) dúvidas. Muito obrigado a todas!!

Um agradecimento muito especial para a minha amiga Mónica, por toda toda toda a inúmera ajuda, disponibilidade, paciência, e amizade que demonstra diariamente comigo. Muito obrigado!!

Um agradecimento especial também a todas as pessoas do grupo BPEG que me acolheram de braços abertos, sempre disponíveis para me ajudar no que fosse preciso. Quero destacar a Carina, por toda a ajuda e paciência que teve comigo na medição dos ângulos de contacto, a Joana Pais pela ajuda e apoio e por ter estado presente numa altura muito complicada, e em especial à “má friend” Carla Daniel por toda a alegria e boa disposição, por todos os conselhos, pelas horas de conversa, e pela grande amizade e bondade que sempre sempre demonstrou comigo. Muito obrigado a todos!!

À minha “amiga” Professora Ana Luísa Custódio, por ter sido uma grande ajuda, por todo o apoio, por tudo o que me ensinou, e por tudo o que fez por mim sempre com a maior boa vontade. Muito obrigado!!

Aos meus amigos “FCTenses” por toda a amizade, ajuda, carinho, e partilha de inúmeros e bons momentos ao longo destes anos, mas também e principalmente por todo o apoio e ajuda quando a hora não era de “festa”. Destaco especialmente o Major, a Susana (minha companheira de carro), a Rita Ferreira e a Carolina. Muito obrigado!!

Aos meus “irmãos” do Barreiro, companheiros de uma vida, que seja qual for o motivo ou a razão estão sempre lá para mim para o que eu precisar. Vocês sabem quem são!! Muito obrigado!!

Aos meus amigos de Almada, que acompanharam também todo este meu percurso nos momentos bons e nos menos bons!! Muito obrigado!!

À Andreia, que de uma maneira mais próxima ou menos próxima, sempre acompanhou todo este meu caminho. Muito obrigado!!

À minha família, muito obrigado por tudo, por todo o apoio e carinho que sempre demonstraram, principalmente ao pessoal de “London” e à minha querida e única, avó São. Muito obrigado!!

E por último, e porque os últimos são os sem dúvida os primeiros, um agradecimento muito muito muito especial e diferente de todos os outros para os meus dois anjos da guarda, os dois pilares que tornaram a realização deste sonho possível, pelo apoio e amor incondicional, pela educação e valores que me inculcaram, por toda a ajuda, por me defenderem acima de tudo e de todos, por me fazerem sentir diariamente que sou a pessoa mais importante que existe, e também, e em tom de piada, porque se não fossem eles eu não estaria aqui!! Do fundo do coração, o meu muito muito muito obrigado aos meus pais!! Tenho o maior orgulho em vocês!!

Resumo

O principal objectivo deste trabalho foi o desenvolvimento de estruturas poliméricas, nomeadamente filmes, produzidos a partir da dissolução do Complexo de Quitina-Glucanos (CQG) em líquidos iónicos biocompatíveis, para aplicações biomédicas.

Neste trabalho, foram utilizados dois CQG diferentes, um comercial, marca Vitipure™ Sensation, e outro produzido biologicamente na Faculdade de Ciências e Tecnologia a partir da parede celular da levedura *Pichia pastoris*. O CQG é um polissacarídeo hidrofílico, insolúvel em água, composto por quitina e β -glucanos, unidos por ligações glicosídicas, e que combina as propriedades biológicas da quitina e dos glucanos num material biocompatível com a capacidade regenerativa de feridas. Os CQG testados foram caracterizados quanto ao teor em água e em sais inorgânicos (cinzas); ao conteúdo em proteína; à sua composição em açúcares (glucose, glucosamina e manose); e também por ensaios de termogravimetria para determinar a sua estabilidade térmica.

À semelhança da quitina, e de outros biopolímeros, o CQG é apenas solúvel em alguns solventes orgânicos específicos, que são bastante tóxicos e corrosivos. Devido a este facto e ao desenvolvimento de aplicações para a área biomédica, surgiu a necessidade de utilizar líquidos iónicos biocompatíveis, para dissolver o CQG. Foram utilizados para a dissolução do CGC dois líquidos iónicos biocompatíveis, Colina Acetato, e Guanidina Acetato, ambos possuindo o anião CH_3COO^- , bastante estável e com capacidade de romper ligações por pontes de hidrogénio.

As misturas de CQG-Líquido Iónico foram caracterizadas por ensaios de reologia para determinar as suas propriedades de viscosidade e viscoelasticidade, por HPLC para determinar a sua composição em açúcares, por calorimetria diferencial de varrimento (DSC) para determinar a sua temperatura de transição vítrea e por ensaios de termogravimetria.

Após a dissolução do CQG no líquido iónico, foi feito o “cast” da mistura, e pelo método de inversão de fase utilizando água como solvente, promoveu-se a remoção do líquido iónico. A mistura foi posteriormente deixada a secar à temperatura ambiente para formação do filme. Os filmes obtidos foram caracterizados por diferentes técnicas: HPLC para determinar a sua composição, DSC, ensaios de termogravimetria, e medição de ângulos de contacto para determinar a sua hidrofobicidade.

Dos resultados obtidos verificou-se que os dois CQG possuem água, embora apenas o CQG-FCT possua cinzas; que o conteúdo em proteína no CQG-FCT e no CQG-Comercial é de cerca de 10.23% e 4.24%, respectivamente; e que o rácio da composição em quitina:glucanos é de 16:84 nos CQG puros e nas misturas CQG-líquido iónico, alterando-se significativamente após a lavagem com água no método de inversão de fase. Verificou-se também que as misturas CQG-líquido iónico possuem uma elevada viscosidade assim como propriedades viscoelásticas, apresentando um comportamento normalmente observado em géis fracos. Concluiu-se finalmente também que, os filmes produzidos são amorfos à temperatura ambiente, termicamente estáveis a 100 °C, e que são extremamente hidrofílicos.

Abstract

The main objective of this work was the development of polymeric structures, films in particular, produced from the dissolution of the Chitin-Glucans Complex (CGC) in biocompatible ionic liquids for biomedical applications.

In this work, two different CGC were used, a commercial one by Vitipure Sensation™, and other, biologically produced in the Faculdade de Ciências e Tecnologia, extracted from the cell wall of the yeast *Pichia pastoris*. The CGC is an hydrophilic polysaccharide, water-insoluble, composed by chitin and β -glucans, linked by glycosidic linkages, which combines the biological properties of chitin and glucan in a biocompatible material with the capacity of regenerating wounds. The two CGC tested were characterized for water and inorganic salts (ash) content, protein content, their composition in sugars (glucose, mannose and glucosamine) and also by thermogravimetry tests to evaluate its thermal stability.

Like chitin, and other biopolymers, the CGC is only soluble in some special solvents which are quite toxic and corrosive. Due to this fact and the urgent development of biomedical applications, the need to use biocompatible ionic liquids to dissolve the CGC is mandatory. For the dissolution of CGC, two biocompatible ionic liquids were used, Choline acetate and Guanidine acetate, both containing the CH_3COO^- anion, which is very stable and capable of breaking hydrogen bonds.

Mixtures of CGC-Ionic Liquid were characterized by rheological assays to determine their rheological properties of viscosity and elasticity; by HPLC to determine their composition in sugars; by differential scanning calorimetry (DSC) to determine its glass transition temperature; and by thermogravimetric tests to evaluate their stability at high temperatures.

After the dissolution of the CGC in the biocompatible ionic liquid, the mixtures were casted, and by the phase inversion method using water as a solvent, the ionic liquid was removed. The mixture was then left to dry at room temperature for film formation. The films were characterized by different techniques: HPLC to determine their composition, DSC, thermogravimetry tests, and by contact angle measurements to determine its hydrofobicity.

From the results obtained it was found that both CGG contained water, although only CGC-FCT had ashes. The protein content in the FCT-CGC and Commercial-CGC was about 10.23% and 4.24%, respectively, and the composition ratio of chitin:glucans was about 16:84. When compared the films obtained with the pure CGC and ionic liquid-CGC mixtures, it was found that the composition changed. It was also found that the ionic liquid-CGC mixtures had a high viscosity, and also viscoelastic properties, exhibiting a typical behavior of a weak gel. Finally it was also concluded that the films produced are amorphous at room temperature, thermally stable at 100 ° C, and are highly hydrophilic.

Índice Geral

1. Introdução.....	1
2. Materiais e Métodos.....	9
2.1 Materiais	9
Determinação do conteúdo em proteína:	9
Determinação da composição em açúcares (glucosamina, glucose e manose):	9
Preparação dos Filmes de CQG	10
2.2 Métodos.....	11
2.2.1 Produção CQG por via biológica.....	11
2.2.2 Caracterização do complexo quitina-glucanos produzido biologicamente e comercial 12	
2.2.2.1 Determinação do conteúdo em água e sais inorgânicos (cinzas)	12
2.2.2.2 Determinação do conteúdo em proteína	12
2.2.2.3 Determinação da composição em açúcares (glucosamina, glucose e manose).....	13
2.2.2.4 Termogravimetria	14
2.2.3 Caracterização da mistura CQG-líquido Iónico	14
2.2.3.1 Estudos de reologia.....	14
Ensaio de Viscosidade	15
Testes Oscilatórios	15
2.2.3.2 Determinação da composição em açúcares (glucosamina, glucose e manose).....	16
2.2.3.3 Calorimetria diferencial de varrimento (DSC).....	16
2.2.3.4 Termogravimetria	17
2.2.4 Preparação dos filmes de CQG.....	17
2.2.5 Caracterização dos filmes de CQG	18
2.2.5.1 Medição de ângulos de contacto	18
3. Resultados e Discussão	21
3.1 Caracterização dos complexos quitina-glucanos produzido biologicamente e comercial 21	
3.1.1 Determinação do conteúdo em água e sais inorgânicos (cinzas)	21
3.1.2 Determinação do conteúdo em proteína	22
3.1.3 Determinação da composição em açúcares (glucosamina, glucose e manose).....	22
3.1.4 Termogravimetria	23
3.2 Caracterização da mistura CQG-líquido Iónico	25
3.2.1 Estudos de reologia.....	25
Ensaio de Viscosidade	26

Testes Oscilatórios	27
3.2.2 Determinação da composição em açúcares (glucosamina, glucose e manose).....	35
3.2.3 Calorimetria diferencial de varrimento (DSC)	36
3.2.4 Termogravimetria	37
3.3 Caracterização dos Filmes de CQG.....	39
3.3.1 Determinação da composição em açúcares (glucose, manose, glucosamina)	40
3.3.2 Calorimetria diferencial de varrimento (DSC)	41
3.3.3 Termogravimetria	42
3.3.4 Ângulos de Contacto	43
4. Conclusão	45
5. Trabalho Futuro	47
6. Bibliografia	49
7. Anexos.....	51
7.1 Anexo I – Curva de calibração para determinação do conteúdo em proteína	51
7.2 Anexo II – HPLC	52
7.3 Anexo III – Resultados de DSC.....	53

Índice de Figuras

Figura 1: Estrutura da Quitina e do Quitosano [3].	1
Figura 2: Estrutura do Complexo Quitina-Glucanos Vitipure™ Sensation [6].	3
Figura 3: Aplicações dos Líquidos Iônicos [8].	4
Figura 4: Representação Esquemática das Propriedades dos Pensos para Feridas [3].	6
Figura 5: Espectrofótopômetro Thermo Spectronic, Heλios α.	13
Figura 6: Reômetro Hakke Mars III, Thermo Scientific.	15
Figura 7: Calorímetro de Varrimento Diferencial, DSC 131, Setaram.	17
Figura 8: Montagem do sistema óptico para a medição do ângulo de contacto.	19
Figura 9: Representação da Perda de Percentagem de Massa dos CQG em Função da Temperatura.	24
Figura 10: Representação da Perda de Percentagem de Massa dos CQG em Função da Temperatura até 100 °C.	24
Figura 11: Representação da Curva de Escoamento das misturas CQG-Líquido Iônico.	26
Figura 12: Representação da Variação do G' e G'' (Pa) em função da Tensão de Corte τ (Pa) para as Misturas (a) CQG-FCT + Colina 110°C; (b) CQG-FCT + Guanidina 110°C; (c) CQG-Comercial + Colina 110°C; (d) CQG-Comercial + Guanidina 110°C; (e) CQG-Comercial + Colina 80°C.	29
Figura 13: Representação da Variação do G' e G'' (Pa) em função da Frequência f (Hz) para as Misturas (a) CQG-FCT + Colina 110°C; (b) CQG-FCT + Guanidina 110°C; (c) CQG-Comercial + Colina 110°C; (d) CQG-Comercial + Guanidina 110°C; (e) CQG-Comercial + Colina 80°C.	32
Figura 14: Representação da Variação do G' e G'' (Pa) em função da Frequência f (Hz) para as Misturas CQG-Comercial + Colina 110 °C e CQG-Comercial + Colina 80 °C.	33
Figura 15: Representação da Variação do G' e G'' (Pa) em função da Frequência f (Hz) para as Misturas (a) CQG-FCT + Colina 110 °C e CQG-Comercial + Colina 110 °C; (b) CQG-FCT + Guanidina 110 °C e CQG-Comercial + Guanidina 110 °C.	34
Figura 16: Representação da Variação da Percentagem de Massa das Misturas CQG-Líquido Iônico em Função da Temperatura.	38
Figura 17: Representação da Variação da Percentagem de Massa das Misturas CQG-Líquido Iônico em Função da temperatura até 100 °C.	38
Figura 18. Imagens dos filmes obtidos. (a) CQG-Comercial+Colina Acetato 80 ° C; (b) CQG-Comercial+Colina Acetato 110 ° C.	39
Figura 19: Representação da Variação da Percentagem de Massa dos Filmes de CQG em Função da Temperatura.	42

Figura 20: Representação da Variação da Percentagem de Massa dos Filmes de CQG em Função da Temperatura até 100 °C.	42
Figura 21. Curva de Calibração para Determinação do Conteúdo em Proteína dos CQG estudados.....	51
Figura 22. Espectro da glucose e da manose.	52
Figura 23. CQG-FCT.	53
Figura 24. CQG-Comercial.....	54
Figura 25. Colina Acetato.	55
Figura 26. Guanidina Acetato.....	56
Figura 27. CQG-FCT+Colina 110 °C.	57
Figura 28. CQG-FCT+Guanidina 110 °C.....	58
Figura 29. CQG-Comercial+Colina 80 °C.	59
Figura 30. CQG-Comercial+Colina 110 °C.....	60
Figura 31. CQG-Comercial+Guanidina 110 °C.	61
Figura 32. Filme CQG-FCT+Colina 110 °C.	62
Figura 33. Filme CQG-FCT+Guanidina 110 °C.....	63
Figura 34. Filme CQG-Comercial+Colina 80 °C.	64
Figura 35. Filme CQG-Comercial+Colina 110 °C.	65
Figura 36. Filme CQG-Comercial+Guanidina 110 °C.....	66

Índice de Tabelas

Tabela 1: Pensos para Feridas Produzidos a Partir de Quitina, Quitosano e seus Derivados [3]..	7
Tabela 2: Fórmula Molecular, Estrutura Molecular e Peso Molecular dos Líquidos Iônicos.	10
Tabela 3: Quantificação do Conteúdo em Água e Sais Inorgânicos (cinzas) dos CQG.	21
Tabela 4: Quantificação do Conteúdo em Proteína dos CQG.	22
Tabela 5: Composição em Glucosamina e Glucanos dos CQG.	23
Tabela 6: Composição em Glucosamina e em Glucanos das Misturas CQG-Líquido Iônico.	35
Tabela 7: Temperaturas de Transição Vítreas dos CQG, dos Líquidos Iônicos, e das Misturas CQG-Líquido Iônico.	36
Tabela 8: Composição em Glucosamina e Glucanos dos Filmes de CQG.	40
Tabela 9: Temperatura de Transição Vítreas dos Filmes de CQG.	41

Abreviaturas

CQG	Complexo Quitina-Glucanos
DSC	Calorimetria Diferencial de Varrimento
F	Frequência (Hz)
FTIR	Fourier Transformed Infrared Spectroscopy
G'	Módulo elástico, energia armazenada (Pa)
G''	Módulo viscoso, energia dissipada (Pa)
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
p/p	Peso por peso
SEM	Scanning Electron Microscopy
Tg	Temperatura de Transição Vítrea (°C)
XRD	X-Ray Diffraction

Letras Gregas

η	Viscosidade Aparente (Pa.s)
$\dot{\gamma}$	Taxa de Escoamento (s^{-1})
τ	Tensão de Corte (Pa)

1. Introdução

Os materiais biológicos, ou biomateriais, têm vindo a ganhar um crescente interesse, uma vez que permitem diminuir a dependência dos combustíveis fósseis. Biopolímeros são macromoléculas, como os polissacáridos, poliésteres, poliamidas, entre outros, que são obtidos de forma natural [1].

A quitina, poli (β -(1 \rightarrow 4)-*N*-acetil-D-glucosamina) é um dos mais importantes e abundantes biopolímeros. É o segundo biopolímero mais abundante na natureza, logo a seguir à celulose, com uma produção anual estimada de 1×10^{13} kg. A quitina foi pela primeira vez isolada em 1811, a partir da parede de um cogumelo e chamada “fungina”. Um outro material muito semelhante foi isolado por Odier a partir do exoesqueleto de insectos e chamado “chitine”.

A quitina ocorre na natureza sob a forma de microfibras cristalinas presentes nos exoesqueletos dos insectos e de invertebrados marinhos como os artrópodes e os moluscos, assim como constituinte da parede celular de diversos fungos e leveduras. Quando a quitina é desacetilada para cerca de 50% da sua amina livre, é chamada quitosano. A grande maioria do quitosano é obtido a partir de um tratamento químico da quitina, mas este também pode ser encontrado na natureza em alguns fungos como o *Mucor rouxii*, onde se forma por acção de uma enzima de desacetilase na quitina [2]. Na Figura 1 estão representadas as estruturas da quitina e do quitosano.

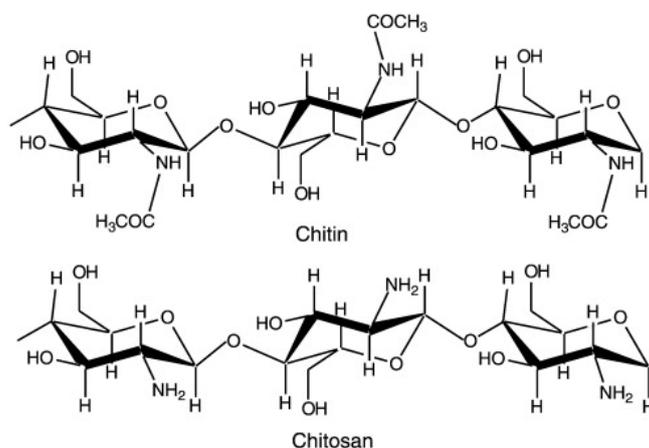


Figura 1: Estrutura da Quitina e do Quitosano [3].

Devido à sua biocompatibilidade e biodegradabilidade, a quitina tem sido utilizada em inúmeras aplicações biomédicas. Matrizes porosas de quitina foram usadas no transplante de células para a regeneração de tecidos, membranas de quitina (Vinaquitina) têm sido utilizadas no tratamento de queimaduras profundas, úlceras, e em tratamentos ortopédicos [1].

Apesar de ocorrer de diversas maneiras na natureza, as grandes fontes comerciais da quitina têm sido os crustáceos e os invertebrados marinhos. A extração da quitina requer um intenso e longo tratamento químico, que tem que ser sempre adaptado consoante a origem da mesma [4]. O carácter sazonal das matérias primas e a variabilidade da composição dos organismos de onde provem, tornam o processo de extração da quitina muito caro e com pouca reprodutibilidade, assim como todo o processo de desmineralização e desproteínização necessário, em que são utilizados ácidos e bases fortes tornam o processo de produção de quitina prejudicial para o meio ambiente [5].

Surgiu então a necessidade de encontrar processos alternativos para a obtenção de quitina. O complexo de quitina-glucanos (CQG) é o principal componente da parede celular de leveduras e fungos. A sua estrutura consiste em quitina, um polímero composto por unidades repetitivas de N-acetilglucosamina, ligadas covalentemente com β -1-3-glucanos, um polímero composto por unidades repetitivas de glucose. O CQG pode ser hidrolisado facilmente dando origem à produção de vários derivados, como a quitina pura, o quitosano e β -glucanos. A produção de quitina a partir de CQG garante um produto com propriedades e uma composição estáveis. Estes factores têm vindo aumentar o interesse no CQG devido à sua ampla gama de aplicações, desde a agricultura, tratamento de águas residuais, imunologia, medicina e biomedicina, nomeadamente na engenharia de tecidos [5].

A *Pichia pastoris* é uma levedura metilotrófica muito utilizada na indústria farmacêutica que, como a maioria das leveduras, possui CQG na sua parede celular, tendo a particularidade de atingir elevadas densidades celulares durante a fermentação. Esta possui a vantagem de utilizar eficientemente diversos substratos, incluindo matérias primas baratas, como o glicerol e o metanol, tornando a produção de CQG a partir da *Pichia pastoris*, com o substrato glicerol, economicamente viável e sustentável. O glicerol é uma matéria prima barata uma vez que se trata de um resíduo do biodiesel, sendo que por cada 9 kg de biodiesel produzido obtém-se 1 kg de glicerol. Com a crescente produção mundial de biodiesel, o resíduo glicerol tem-se vindo a tornar numa abundante matéria prima [5].

O complexo de quitina-glucanos comercial, Vitipure™ Sensation, Clariant é um complexo polissacarídeo patenteado que combina os benefícios da quitina e β (1,3)-glucanos. Trata-se de

um biopolímero de origem não animal, de alta qualidade e pureza, cientificamente suportado por cinco estudos clínicos e três testes *in vitro*. Tem a aparência de um pó fino e não possui odor nem cheiro [6]. Na Figura 2 está representada a estrutura do CQG Vitipure™ Sensation.

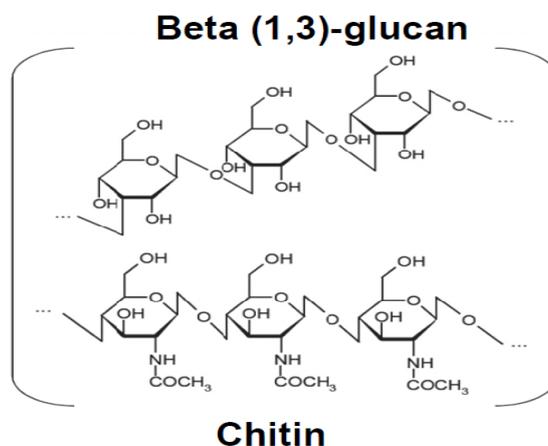


Figura 2: Estrutura do Complexo Quitina-Glucanos Vitipure™ Sensation [6].

O CQG produzido a partir da *Pichia pastoris* é um biopolímero insolúvel em água e bastante hidrofílico, que, à semelhança da quitina, do CQG Vitipure™ Sensation, e de CQG extraído de outros organismos, apenas é solúvel em alguns solventes orgânicos específicos, que são altamente tóxicos e/ou corrosivos [1].

Devido a este facto, o desenvolvimento de aplicações para estes polímeros tem sido bastante limitado para algumas áreas como a biomédica. Tem surgido portanto, cada vez mais a necessidade de encontrar solventes seguros e biocompatíveis.

Os líquidos iónicos, também conhecidos como “solventes verdes”, têm vindo a emergir como uma classe de solventes alternativos para uma grande variedade de aplicações em que são utilizados tipicamente solventes orgânicos. São, por definição, sais líquidos à temperatura ambiente, com propriedades físico-químicas únicas, nomeadamente uma pressão de vapor residual, excelente estabilidade química e térmica, elevada condutividade iónica e fácil reciclabilidade [7]. As propriedades físicas dos líquidos iónicos podem ser modificadas quer pela variação do tamanho e das ramificações da cadeia do catião, quer também pela variação do precursor aniónico. Assim, os líquidos iónicos são solventes que podem ser desenhados especificamente para determinadas aplicações. Estes factores, juntamente com o facto de existirem quase ilimitadas possibilidades de estruturas dos líquidos iónicos, o que contrasta com as limitações de variedade na estrutura dos solventes moleculares, tornam os líquidos

iónicos potenciais solventes para inúmeras e diversas aplicações [8]. Na Figura 3 estão representadas algumas das diversas aplicações dos líquidos iónicos.

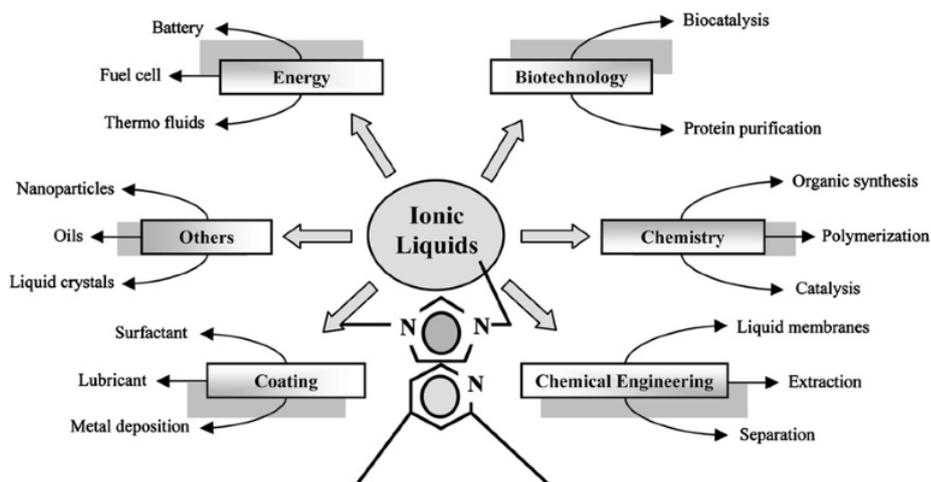


Figura 3: Aplicações dos Líquidos Iónicos [8].

O comportamento de dissolução da quitina e outros derivados, em líquidos iónicos tem vindo a ser intensamente estudado e investigado. Os resultados indicam que esse comportamento está relacionado quer com a estrutura da quitina, quer também, com a estrutura dos líquidos iónicos. Wu *et. al.* demonstraram que o líquido iónico [BMIM]Ac se mostra um bom solvente para dissolver quitina proveniente de diversas origens. Foi também mostrado ser possível dissolver quitina pura no líquido iónico [AMIM]Ac, com uma solubilidade de 5%, assim como nos líquidos iónicos [AMIM]Cl, [MMIM][Me₂PO₄] e [EMIM][Me₂PO₄], no entanto com uma solubilidade inferior, a temperaturas de 45°C e 65 °C, respectivamente. Foi também provado que quanto maior o grau de acetilação da quitina, maior é a dificuldade na sua dissolução. Quitinas com graus de acetilação de 38.1%, 23.8% e 18.1% (quitosanos) foram solúveis no líquido iónico [AMIM]Cl em 3%, 5%, e 8% (p/p), enquanto que quitina com grau de acetilação superior a 50% só foi dissolvida em [AMIM]Cl com uma solubilidade abaixo de 1%. Resultados mostraram ainda que o anião do líquido iónico com a maior capacidade de aceitador de ligações de hidrogénio se mostra mais eficiente na dissolução da quitina, nomeadamente o ião acetato [7].

A dissolução de quitina em líquidos iónicos tem-se mostrado possível e eficaz, principalmente e maioritariamente em líquidos iónicos que possuem catiões de imidazólio. No entanto, na grande maioria dos casos, e apesar dos líquidos iónicos serem considerados “solventes

verdes”, testes de ecotoxicidade demonstraram que alguns líquidos iónicos contendo o catião imidazólio, revelaram ser tão tóxicos, ou em alguns casos até, mais tóxicos ainda, que os solventes orgânicos convencionais que os líquidos iónicos pretendem substituir, o que se torna um factor limitante se a aplicação da quitina ou do complexo quitina-glucanos for na área biomédica [9]. Deste modo, é estritamente necessário o aparecimento/desenvolvimento de líquidos iónicos biocompatíveis, ou seja, líquidos iónicos “amigos do ambiente”, não tóxicos, não ecotóxicos.

Têm sido feitos inúmeros e intensivos estudos de toxicidade, ecotoxicidade, entre outros, aos diferentes catiões e aniões dos líquidos iónicos, como por exemplo o imidazólio, a guanidina, piridina, entre outros. Estes estudos têm sido realizados em diversos microorganismos, mas também já foram realizados em células humanas cancerígenas, como por exemplo em células do cólon. Os principais resultados mostraram que, a toxicidade dos líquidos iónicos depende de vários factores: i) relativamente ao efeito do catião, a toxicidade aumenta com o aumento da cadeia alquílica; ii) a presença de um grupo COOH tende a reduzir a toxicidade de líquidos iónicos que possuam o catião imidazólio; iii) a presença da funcionalidade éter tende a reduzir a toxicidade de líquidos iónicos com o catião metil-guanidina. Concluiu-se também que o tipo de anião seleccionado afecta fortemente a toxicidade dos líquidos iónicos [10].

A medicina e a biomedicina, são também umas das áreas de aplicação mais promissoras para a quitina, nomeadamente para o desenvolvimento de pensos para feridas e pomadas (géis). Pela sua natureza adesiva, combinada com o seu carácter antifúngico e antibactericida e com a sua permeabilidade ao oxigénio, a quitina reúne propriedades muito determinantes para o tratamento de feridas e queimaduras [3].

Uma ferida consiste numa ruptura da pele. A sua cura da ruptura restaura a integridade dos tecidos lesados assim como previne a desregulação e a homeostasia dos organismos. O tratamento de feridas tem vindo a evoluir ao longo dos tempos. Inicialmente a aplicação de pensos nas feridas tinha como principais objectivos impedir a ferida de sangrar, proteger a ferida de irritações causadas pelo meio ambiente, da água e de outros factores externos. Actualmente, assim que acontece uma ferida, a pele tem que ser imediatamente coberta com um penso, uma vez que a pele tem um papel fundamental na homeostasia e na protecção contra a invasão de microorganismos [3].

Existem três tipos de pensos para feridas muito usados nos tratamentos clínicos: os biológicos, como por exemplo os pensos feitos a partir de pele de porco, muito comuns, mas que apresentam algumas desvantagens como uma elevada antigenicidade, fracas propriedades

adesivas, e fornecimento limitado; os pensos sintéticos, que têm um prazo de validade longo, causam poucas inflamações e não possuem o risco de transmissão de agentes patogênicos; e os pensos biológico-sintéticos que consistem numa dupla camada de um polímero de cadeia longa e materiais biológicos.

Os pensos para feridas devem ser portanto, não tóxicos, não causadores de alergias, não aderentes e facilmente removíveis. Devem também manter um ambiente húmido na interface da ferida, funcionar como uma barreira para microorganismos, permitir a troca gasosa e remover o exsudado em excesso. Deste modo, os pensos devem ser feitos de um biomaterial que esteja prontamente disponível sem que seja necessário um grande processamento, que possua propriedades anti-microbianas, e que promova a cura da ferida [3]. Na Figura 4 estão representadas esquematicamente as propriedades dos pensos para feridas.

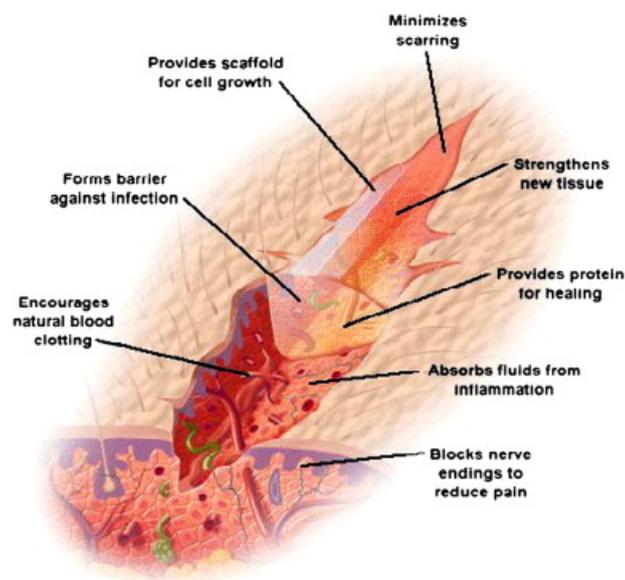


Figura 4: Representação Esquemática das Propriedades dos Pensos para Feridas [3].

Já existem a nível mundial diversas empresas farmacêuticas assim como outras fábricas que produzem pensos para feridas feitos a partir de quitina, quitosano e seus derivados. Na Tabela 1 estão representados alguns dos pensos disponíveis no mercado, a sua marca e o seu fabricante.

Tabela 1: Pensos para Feridas Produzidos a Partir de Quitina, Quitosano e seus Derivados [3].

Material	Marca	Fabricante
Quitina e seus derivados	Syvek-Patch®	Marine Polymer Technologies
	Chitopack C®	Eisai Co. Japan
	Chitopack S®	Eisai Co. Japan
	Beschitin®	Unikita Co. Japan
Quitosano e seus derivados	Tegasorb®	3M
	Tegaderm®	3M
	HemCon Bandage™	HemCon
	Chitodine®	IMS
	Trauma DEX®	Medafor

Para além dos pensos para feridas, dentro das áreas da medicina e da biomedicina, a quitina e o quitosano são também utilizados em inúmeras aplicações, como por exemplo na regulação da homeostasia e da angiogénese, na engenharia de tecidos, na regeneração guiada de tecidos nervosos, na regeneração da cartilagem, para tratar defeitos nos ossos, na fotoquímica e cirurgia experimental, entre outras [11].

Através da combinação de quitina com líquidos iónicos ([BMIM]Ac) e da tecnologia de fluidos supercríticos, foram também já produzidas estruturas porosas de quitina. Neste tipo de experiências, os fluidos supercríticos são utilizados para remoção do líquido iónico da mistura, através de uma extracção com soxhlet. Estas estruturas têm um enorme potencial para possíveis aplicações biomédicas [12].

O principal objectivo deste trabalho foi o desenvolvimento de estruturas poliméricas, nomeadamente filmes, produzidos a partir da dissolução do complexo de quitina glucanos em líquidos iónicos biocompatíveis, para aplicações biomédicas.

Foram utilizados dois CQG diferentes, um comercial da marca Vitipure™ Sensation, Clariant, e outro produzido biologicamente a partir da levedura *Pichia pastoris* utilizando o glicerol como substrato. Os dois complexos foram caracterizados relativamente ao seu teor em água e sais inorgânicos (cinzas), conteúdo em proteína, composição em açúcares (glucosamina, glucose e manose) e por termogravimetria para determinar a sua estabilidade a altas temperaturas. Para a dissolução dos dois complexos, foram utilizados dois líquidos iónicos biocompatíveis, a colina acetato, e a guanidina acetato. As misturas CQG-líquido iónico foram caracterizadas por

ensaios de reologia, para determinar a sua viscosidade e elasticidade; por *High Pressure Liquid Chromatography* (HPLC) para determinar a sua composição em açúcares; por calorimetria diferencial de varrimento (DSC), para determinar a sua temperatura de transição vítrea (Tg), e por termogravimetria para determinar a sua estabilidade a altas temperaturas. Pelo método de inversão de fase utilizando água como solvente, o líquido iónico foi removido e após secagem e a formação dos filmes, estes foram também caracterizados quanto à sua composição em açúcares, por DSC, por termogravimetria, e também pela medição de ângulos de contacto, para determinar a sua hidrofobicidade.

2. Materiais e Métodos

2.1 Materiais

Para a realização deste trabalho experimental foram utilizados dois complexos de quitina-glucanos (CQG): Complexo de Quitina-Glucanos (designado nesta tese por CQG-FCT) produzido biologicamente pelo Grupo Engenharia Bioquímica e de Processos (BPEG) na Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa; e o Complexo de Quitina-Glucanos comercial (designado por CQG-Comercial), Vitipure™ Sensation, *Clariant*, Espanha.

Os dois complexos de quitina-glucanos estudados neste trabalho foram caracterizados recorrendo a diferentes técnicas, nas quais foram utilizados os seguintes reagentes:

Determinação do conteúdo em proteína:

- Carbonato de Sódio Anidro, Na_2CO_3 , *Panreac*, Espanha;
- Hidróxido de Sódio, NaOH , *EKA*, Portugal;
- Reagente de Folin-Ciocalteus, *Panreac*, Espanha;
- Sulfato de Cobre Penta-hidratado, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, *Merck*, Alemanha;
- Tartrato de Sódio/Potássio (1% p/v), $\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, *Sigma-Aldrich*, Alemanha;
- Albumina (BSA), *Sigma-Aldrich*, Alemanha.

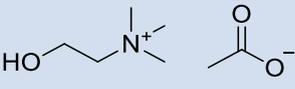
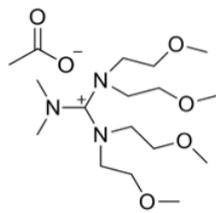
Determinação da composição em açúcares (glucosamina, glucose e manose):

- Ácido Clorídrico, HCl (36,5-38% (p/v)) *Sharlau*, Espanha;
- Ácido Trifluoroacético, TFA (99% (p/v)), CF_3COOH , *Sigma-Aldrich*, Alemanha;
- Glucose Anidra, *José M. Vaz Pereira*, Portugal;
- Manose, *Fluka*, Biochemika, Alemanha;
- Glucosamina, *Sigma-Aldrich*, Alemanha.

Preparação dos Filmes de CQG

Na preparação dos filmes foram utilizados dois líquidos iónicos biocompatíveis, colina acetato e guanidina acetato, sintetizados pelo Professor Doutor Carlos Afonso na Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa. Na Tabela 2 estão representadas a fórmula molecular, a estrutura molecular e o peso molecular desses líquidos iónicos.

Tabela 2: Fórmula Molecular, Estrutura Molecular e Peso Molecular dos Líquidos Iónicos.

Líquido Iónico	Fórmula Molecular	Estrutura Molecular	Peso molecular (g.mol ⁻¹)
Colina Acetato	C ₇ H ₁₇ NO ₃		163
Guanidina Acetato	C ₁₇ H ₃₇ N ₃ O ₆		379

2.2 Métodos

2.2.1 Produção CQG por via biológica

O complexo de quitina-glucanos (CQG) foi produzido num reactor biológico a partir da parede celular da levedura *Pichia pastoris*. A levedura foi cultivada num meio mineral padrão específico, contendo 80 gL^{-1} de glicerol proveniente de um resíduo de biodiesel. A fase de preparação do pré-inóculo e inóculo decorreu durante três dias.

A experiência decorreu durante aproximadamente 42 h num bioreactor de 5 L, a temperatura e pH controlados, $30 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0.1$ e 5.0 ± 0.05 , respectivamente. O pH foi controlado adicionando hidróxido de amónia, NH_4OH (25% *Sharlau*, Espanha), que serviu também como fonte de azoto. Durante a duração da experiência foram sendo retiradas amostras de duas em duas horas para controlar a produção do CQG. No final da experiência a biomassa formada foi tratada com hidróxido de sódio, NaOH 1 N, a $65 \text{ }^\circ\text{C}$ durante aproximadamente 2 h para promover a solubilização e a desproteínização dos componentes da parede celular [5].

Após a paragem do reactor, deixou-se sedimentar a biomassa e recolheu-se o sobrenadante. De seguida, a biomassa foi centrifugada durante 15 min a 6000 rpm, e posteriormente neutralizada com HCl 6 N até atingir um valor de pH aproximadamente igual a 6. Após a neutralização, a biomassa foi sucessivamente lavada e centrifugada com medições do pH e da condutividade até um pH e condutividade finais de 7.5 e $\sim 300 \text{ } \mu\text{S cm}^{-1}$, respectivamente. Para finalizar, a biomassa já tratada foi liofilizada durante 48 h para remoção da água, obtendo-se assim o CQG no estado sólido, em forma de pó.

2.2.2 Caracterização do complexo quitina-glucanos produzido biologicamente e comercial

2.2.2.1 Determinação do conteúdo em água e sais inorgânicos (cinzas)

Com o objectivo de determinar o conteúdo em água e sais inorgânicos (cinzas), 50 mg de CQG foram pesados num filtro de fibra de vidro (tamanho de poro 1.2 μm , VWR, Bélgica), previamente tarado, e colocados numa estufa a 100°C, durante a noite. Após retirar a amostra da estufa, o conjunto filtro + CQG foi pesado para quantificação do conteúdo em água do polímero.

Seguidamente a mesma amostra foi colocada numa mufla a 550°C durante 24h. Após as 24h, o conjunto filtro + CQG voltou a ser pesado para a quantificação do conteúdo em cinzas.

2.2.2.2 Determinação do conteúdo em proteína

Para a determinação do conteúdo em proteína foi necessário preparar previamente as seguintes soluções e padrões:

Solução 1: Diluiu-se 10 g de Na_2CO_3 em 100 mL de NaOH 0.5 N.

Solução 2: Diluiu-se 250 mg de $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ em 50 mL de uma solução de 500 mg de tartrato de sódio e potássio diluída em 50 mL de água miliQ.

Reagente de Cobre: Diluiu-se 1 volume da solução 2 em 10 volumes da solução 1. Esta solução foi guardada no escuro.

Reagente de Folin-Ciocalteus: Diluiu-se 1 mL de reagente de Folin-Ciocalteus em 10 mL de água destilada. Esta solução foi guardada no frio.

Padrões: Pesou-se para cada tubo 0; 0.5; 1.5; 3; 4.5 e 6 mg de Albumina (BSA).

Preparadas então as soluções e os padrões, foram pesados 7 mg de CQG seco. Em seguida, foi adicionado 1 mL de uma solução de NaOH 2M e efectuada uma hidrólise a 120°C durante 15 minutos. No final deste tratamento a amostra foi arrefecida num banho de gelo, passada para eppendorfs de 1.5 mL e posteriormente centrifugada a 10 000 rpm durante 10 min. Após a

centrifugação, recolheu-se o sobrenadante para um tubo de 10 mL, adicionou-se 1 mL de reagente de cobre e deixou-se repousar durante 10 min no escuro. Seguidamente adicionaram-se 3 mL de reagente de Folin-Ciocalteus e deixou-se incubar no escuro durante 30 minutos. Por fim, foi medida a absorvância a 750 nm num espectrofotómetro Thermo Spectronic, Heλios α, Alemanha. Na Figura 5 está representado o espectrofotómetro utilizado as medições das absorvâncias.

No final do tratamento dos padrões, através dos valores das absorvâncias a diferentes concentrações, construiu-se um gráfico e obteve-se um polinómio de 2º grau como curva de calibração (Anexo I).



Figura 5: Espectrofotómetro Thermo Spectronic, Heλios α.

2.2.2.3 Determinação da composição em açúcares (glucosamina, glucose e manose)

Para a quantificação da composição em açúcares no CQG, foram realizadas duas hidrólises: uma hidrólise com ácido trifluoroacético (TFA), para quantificação dos glucanos e manose, e uma hidrólise com ácido clorídrico (HCl), para a quantificação da parte da quitina (glucosamina).

Para a hidrólise com TFA, foram pesados 5 mg de CQG e ressuspendidos em 5 mL de água desionizada e 0.1 ml de TFA 99%. A hidrólise ocorreu a 120°C durante 2 horas.

Para a hidrólise com HCl, foram pesados 5 mg de CQG e ressuspensos em 5 mL de HCL 12 N, a 120°C durante 5h.

Após os respectivos tratamentos, ambas as amostras hidrolisadas foram analisadas quanto à sua composição por High Pressure Liquid Chromatography (HPLC).

Soluções de glucose, manose e glusosamina foram utilizadas como padrões e foram sujeitas ao mesmo tratamento que as amostras. Para esta análise foi utilizada uma coluna CarboPac PA10 (Dionex), equipada com um detector amperimétrico. As análises foram efectuadas a 30°C, usando uma solução de NaOH 4 mM como eluente, com um caudal de 0.9 ml min⁻¹.

2.2.2.4 Termogravimetria

A termogravimetria é uma técnica termoanalítica que permite determinar a estabilidade a altas temperaturas dos materiais, através da variação da massa em função da temperatura.

Os ensaios realizaram-se num sistema *Shimadzu TGA-50*, numa atmosfera de azoto, a um caudal de 20 mL.min⁻¹ e uma velocidade de aquecimento de 10°C.min⁻¹. A partir deste teste, tornou-se possível a determinação da variação no peso total da amostra em função do aumento controlado da temperatura. Esta análise foi realizada pela Doutora Maria Celeste Azevedo no laboratório de análises CICECO na Universidade de Aveiro.

2.2.3 Caracterização da mistura CQG-líquido Iónico

2.2.3.1 Estudos de reologia

Após a dissolução do CQG no líquido iónico, efectuaram-se estudos de reologia. Estes ensaios foram realizados no Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa, com o auxílio do Prof. Vítor Alves.

A reologia é o estudo do fluxo e do comportamento de deformação dos materiais submetidos a tensões, sob determinadas condições termodinâmicas ao longo de um intervalo de tempo. Destacam-se propriedades como a viscosidade e a viscoelasticidade [13].

Estes estudos foram realizados num reómetro Haake Mars III, Thermo Scientific, Alemanha, tendo sido a geometria das placas paralelas utilizada a TMP20 S (serrada) de 20 mm, sendo gap entre as placas de 1mm. Na Figura 6 está representado o reómetro utilizado nesses estudos.

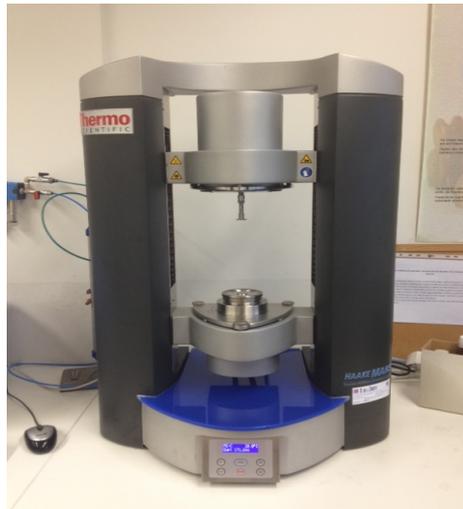


Figura 6: Reómetro Haake Mars III, Thermo Scientific.

Ensaio de Viscosidade

Neste ensaio é medida a viscosidade aparente η (Pa.s) em função da taxa de escoamento $\dot{\gamma}$ (s^{-1}). Com este ensaio consegue-se representar a curva de escoamento da mistura. O ensaio decorreu à temperatura de 20°C, tendo a taxa de escoamento variado entre 0.1 e 700 s^{-1} .

Testes Oscilatórios

- Varrimento de Tensão

Neste ensaio fixa-se a frequência (Hz), e mede-se o módulo elástico (energia armazenada), G' (Pa), e o módulo viscoso (energia dissipada), G'' (Pa), em função de um varrimento de tensão τ (Pa), com o objectivo de determinar a zona de viscoelasticidade linear (onde os dois módulos são constantes), e a tensão crítica do material. O ensaio decorreu à temperatura de 20°C, a frequência fixada foi 1 Hz, e o varrimento de tensão foi entre 0.1 e 10000 Pa.

- Varrimento de Frequências

Neste ensaio fixa-se a tensão (na zona de viscoelasticidade linear medida no varrimento de tensão) e mede-se a energia armazenada, G' (Pa), e a energia dissipada, G'' (Pa), em função de um varrimento de frequências (Hz). O ensaio decorreu à temperatura de 20°C, a tensão fixada foi de 10 Pa e o varrimento de frequências foi entre 0.01 e 100 Hz.

2.2.3.2 Determinação da composição em açúcares (glucosamina, glucose e manose)

A mistura CQG-líquido iónico foi caracterizada quanto à sua composição em açúcares (glucosamina, glucose e manose), de acordo com o método descrito no ponto 2.2.2.3.

2.2.3.3 Calorimetria diferencial de varrimento (DSC)

A calorimetria diferencial de varrimento (DSC) é uma técnica de análise térmica que regista o fluxo de energia calorífica associado a transições nos materiais em função da temperatura. É um método de variação entálpica, no qual a diferença no fornecimento de energia calorífica entre uma substância e um material de referência é medida em função da temperatura, enquanto ambas são submetidas a um mesmo programa de aquecimento ou arrefecimento, rigorosamente controlado.

Estes ensaios permitiram obter informações relativas à temperatura de transição vítrea (T_g) da mistura CQG-líquido iónico, e foram realizados num calorímetro de varrimento diferencial, Setaram, França, modelo DSC 131. Na Figura 7 está representado esse calorímetro. Este equipamento trabalhou na gama de temperaturas entre -130°C e 30°C, a uma velocidade de aquecimento de 10°C min⁻¹. O sinal de fluxo de calor variou entre -100 e 100 mW e a resolução foi de $\pm 0.2 \mu\text{W}$.

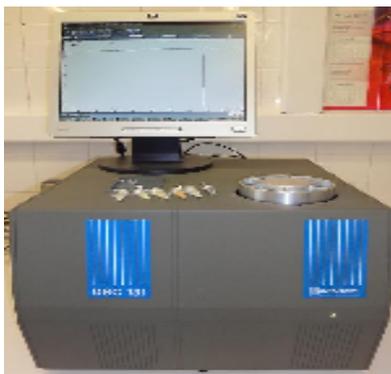


Figura 7: Calorímetro de Varrimento Diferencial, DSC 131, Setaram.

2.2.3.4 Termogravimetria

Os ensaios de termogravimetria foram realizados às mistura CQG-líquido iónicos de acordo com o método descrito no ponto 2.2.2.4.

2.2.4 Preparação dos filmes de CQG

Em estudos anteriores a este trabalho, foi determinada a percentagem máxima de dissolução dos dois complexos quitina-glucanos nos dois líquidos iónicos seleccionados, tendo-se obtido um valor de ~12% p/p. Tendo este valor em consideração, para a preparação dos filmes de CQG, pesou-se uma determinada quantidade de líquido iónico num copo e aqueceu-se. Foram estudadas duas temperaturas distintas: 80° e 110°C. Seguidamente, pesou-se o CQG e introduziu-se para dentro do copo. A mistura ficou a agitar e a aquecer durante 24h. Após o aquecimento fez-se o “cast” da mistura numa placa de aço e, pelo método de inversão de fase utilizando água como solvente, promoveu-se a remoção do líquido iónico durante 24h. Uma vez lavada, a mistura deixou-se a secar à temperatura ambiente durante 48h.

2.2.5 Caracterização dos filmes de CQG

Os filmes obtidos de CQG foram caracterizados relativamente à sua composição em açúcares, à sua temperatura de transição vítrea através da técnica DSC e à sua estabilidade a altas temperaturas por termogravimetria, como descrito na secção anterior 2.2.4. Para além destas técnicas, os filmes de CQG foram caracterizados relativamente à sua hidrofobicidade.

2.2.5.1 Medição de ângulos de contacto

A medição de ângulos de contacto tem como objectivo conhecer propriedades de superfície dos materiais, especialmente a adesão, molhabilidade e hidrofobicidade. Para tal é medido o ângulo de contacto resultante entre uma gota de um líquido colocado sobre a superfície de um material.

Para a medição do ângulo de contacto são utilizados um sistema óptico, e o software CAM2008 da KSV. Este método baseia-se na aquisição de projecções da imagem de uma gota por parte do sistema óptico, sendo posteriormente analisadas pelo software que calcula o ângulo que a gota de água forma com a superfície das membranas.

Para efectuar a medição do ângulo de contacto dos filmes produzidos colocou-se a amostra numa lamina sob o sistema óptico, e posteriormente foi colocada com ajuda de uma seringa uma gota de solvente. O software analisou então as imagens e calculou o ângulo de contacto.

O ângulo formado, entre o plano tangente da fase líquido-ar e o plano formado entre o sólido-líquido, expressa esta característica. No caso da utilização de água como solvente, se este ângulo for superior a 90° o material é hidrofóbico, se for inferior a 90° o material é hidrofílico. Na Figura 8 está representada a montagem do sistema óptico utilizado.

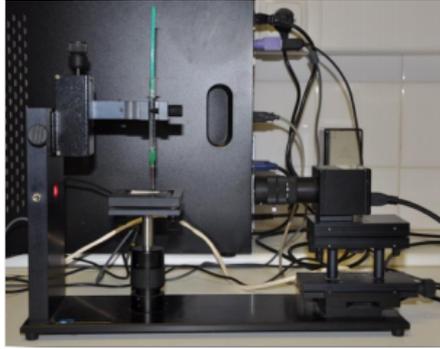


Figura 8: Montagem do sistema óptico para a medição do ângulo de contacto.

3. Resultados e Discussão

3.1 Caracterização dos complexos quitina-glucanos produzido biologicamente e comercial

3.1.1 Determinação do conteúdo em água e sais inorgânicos (cinzas)

Para uma melhor caracterização dos dois biopolímeros, foi determinado o seu conteúdo em água e em sais inorgânicos (cinzas), de acordo com o método descrito na secção 2.2.2.1. Na Tabela 3 encontram-se descritos os resultados obtidos para o conteúdo em água e em cinzas dos dois complexos quitina-glucanos.

Tabela 3: Quantificação do Conteúdo em Água e Sais Inorgânicos (cinzas) dos CQG.

Tipo de CQG	Massa Inicial (mg)	Massa de Água (mg)	Cinzas (mg)
CQG-FCT	49.4	3.7 (~7.5% p/p)	2.7 (~5.5% p/p)
CQG-Comercial	49.9	5.9 (~12% p/p)	Não tem

Pela análise dos valores apresentados na Tabela 3, verifica-se que o CQG-FCT contém cerca de 7.5% p/p de água, enquanto que o CQG-Comercial contém cerca de 12% p/p. Isto poderá ser devido a uma maior capacidade de absorção de água do CQG-Comercial, sendo portanto aparentemente mais hidrofílico que o CQG-FCT. No entanto, o CQG-Comercial não contém cinzas, enquanto que o CQG-FCT contém cerca de 5.5% p/p. A diferença observada nos dois CQG relativamente ao teor em cinzas poderá ser devido a diferenças no método de purificação do polímero. Os valores obtidos relativamente ao teor em água para o CQG-FCT estão de acordo com o descrito na literatura [5].

3.1.2 Determinação do conteúdo em proteína

Para a determinação do conteúdo em proteína foi feita, entre outros tratamentos, uma hidrólise e posteriormente uma medição da absorvância a 750 nm, de acordo com o método descrito na secção 2.2.2.2. Na Tabela 4 estão representados os valores da absorvância, da concentração em proteína, e da percentagem de proteína dos dois complexos quitina glucanos. No anexo I encontra-se representado o gráfico da absorvância em função da concentração em proteína, e a equação da curva de calibração resultantes do tratamento dos padrões.

Tabela 4: Quantificação do Conteúdo em Proteína dos CQG.

Tipo de CQG	Massa Inicial (mg)	Absorvância (750 nm)	Concentração em Proteína (mg/ml)	% Proteína (p/p)
CQG-FCT	7.22	0.894	0.74	10.23
CQG-Comercial	7.29	0.034	0.31	4.24

Pela análise da Tabela 4, podemos verificar que quer a concentração em proteína, quer a percentagem de proteína no CQG-FCT é superior à do CQG-Comercial, de onde podemos concluir que este não se apresenta num estado tão puro como o CQG-Comercial, facto esse, que vem comprovar o que foi concluído em 3.1.1, relativamente ao teor em cinzas.

3.1.3 Determinação da composição em açúcares (glucosamina, glucose e manose)

Para a determinação da composição dos dois biopolímeros, amostras dos dois CQG foram tratadas, hidrolisadas e posteriormente analisadas por HPLC, como descrito na secção 2.2.2.3.

Na Tabela 5 está representada a composição em glucosamina e em glucanos nos dois complexos, assim como a razão quitina:glucanos. No caso do CQG-FCT, não foi possível quantificar por HPLC o pico correspondente à glucosamina, pelo que se utilizou o valor obtido

na literatura [5] para o polímero produzido usando as mesmas condições operatórias deste trabalho.

Tabela 5: Composição em Glucosamina e Glucanos dos CQG.

Tipo de CQG	Glucosamina (ppm)	Glucanos (ppm)	Razão Quitina-Glucanos (% molar)
CQG-FCT	-	-	16:84 [5]
CQG-Comercial	124.71	637.31	16:84

Pela análise da Tabela 5, podemos verificar que a composição dos dois complexos é idêntica. Os complexos quitina-glucano, produzido biologicamente na FCT e comercial, possuem a mesma razão quitina:glucanos 16:84.

Pela análise do HPLC pôde concluir-se que o pico correspondente à manose (tempo de retenção entre 9-13 min) não aparece, o que pode dever-se ao facto deste estar muito próximo do pico correspondente à glucose (tempo de retenção entre 8-12 min), e este ser muito intenso e de certa maneira “mascarar” o pico correspondente à manose, assumindo-se que o pico que se pode ver corresponde então à glucose e à manose, designado na tabela por glucanos. No anexo II encontra-se um exemplo de um espectro obtido para a quantificação da glucose e manose.

3.1.4 Termogravimetria

A termogravimetria é uma técnica termoanalítica na qual a variação da massa dos materiais é obtida em função da temperatura, o que permite determinar a estabilidade dos materiais a altas temperaturas. A Figura 9 representa a variação da perda de massa dos complexos quitina-glucanos (%), em função da temperatura, enquanto que a Figura 10 representa a perda de percentagem de massa dos CQG apenas no intervalo 0-100 °C.

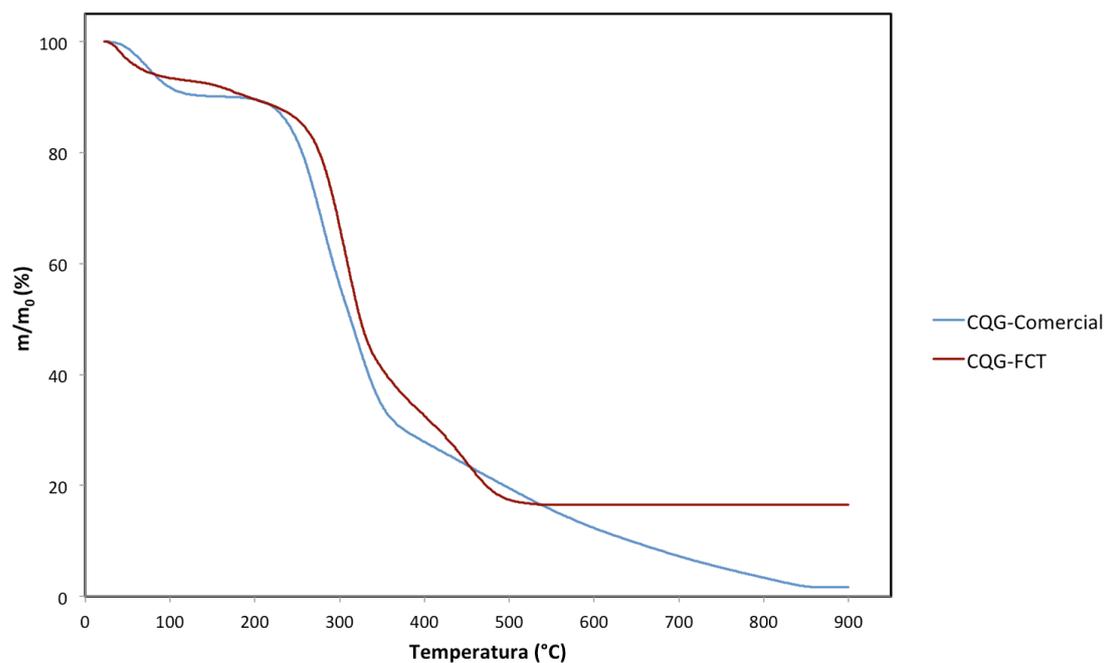


Figura 9: Representação da Perda de Percentagem de Massa dos CQG em Função da Temperatura.

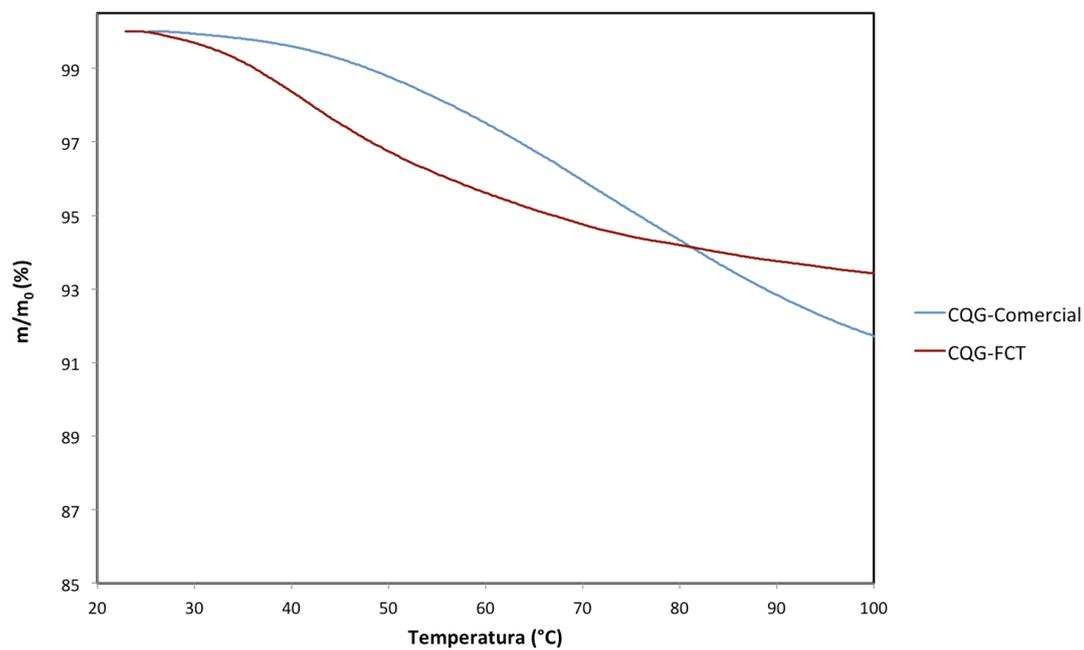


Figura 10: Representação da Perda de Percentagem de Massa dos CQG em Função da Temperatura até 100 °C.

Pela análise das Figuras 9 e 10 podemos verificar que ambas as amostras apresentam um processo de desidratação seguido da decomposição do biopolímero. Pela análise da ampliação feita na Figura 10 entre os 0 e os 100 °C, correspondente à zona de evaporação da água,

conclui-se que o CQG-FCT tem uma perda de água de cerca de 7% da massa inicial, enquanto que o CQG-Comercial tem uma perda de água de cerca de 9% da massa inicial. Estes valores comprovam o facto de ambos os complexos serem hidrofílicos e estão de acordo com os valores obtidos na secção 3.1.1. Podemos também concluir que o CQG-Comercial, embora perca uma percentagem total de água mais elevada que o CQG-FCT, começa a perder água a temperaturas superiores às do CQG-FCT, o que poderá estar associado a diferenças no grau de agregação das moléculas de água dentro de cada CQG. Podemos também verificar que o CQG-Comercial se degrada na sua totalidade, enquanto que o CQG-FCT apresenta ainda cerca de 18% da massa inicial que não se decompõe com o aumento da temperatura. Estes valores poderão ser devidos ao facto do CQG-FCT conter matéria inorgânica (cinzas), enquanto que o CQG-Comercial não, como observado na secção 3.1.1.

3.2 Caracterização da mistura CQG-líquido Iónico

3.2.1 Estudos de reologia

A reologia define-se como o estudo do fluxo e da deformação dos materiais (com especial ênfase para o fluxo) submetidos a tensões, sob determinadas condições termodinâmicas ao longo de um intervalo de tempo. Destacam-se propriedades como a viscosidade e a viscoelasticidade.

Em fluxo, as partículas adjacentes do líquido estão a deformar-se, movendo-se os pontos adjacentes do líquido uns em relação aos outros. Existem dois tipos de fluxo com movimento relativo das partículas adjacentes do líquido, o fluxo de escoamento (viscosidade e viscoelasticidade) e o fluxo extensional (*extensional fluid*) (deformações). No fluxo de escoamento, as partículas adjacentes do líquido movem-se através ou por passagem/contacto (*over or past each other*), enquanto que no fluxo extensional as partículas movem-se afastando-se ou aproximando-se umas das outras.

O estudo do fluxo em sistemas de polímeros atrai particularmente os reólogos uma vez que os polímeros exibem frequentemente propriedades muito viscoelásticas [13].

Ensaio de Viscosidade

Estudando agora o fluxo de escoamento, um ensaio de viscosidade consiste na medição da variação da viscosidade aparente η (Pa.s) em função da taxa de escoamento $\dot{\gamma}$ (s^{-1}), obtendo assim a curva de escoamento de um material. Na Figura 11 estão representadas as curvas de escoamento de algumas das misturas CQG-líquido iônico. Nas misturas CQG-FCT+Colina 110 °C e CQG-FCT+Guanidina 110 °C não foi feita a curva de escoamento uma vez que as duas misturas se encontravam no estado sólido à temperatura de 20 °C.

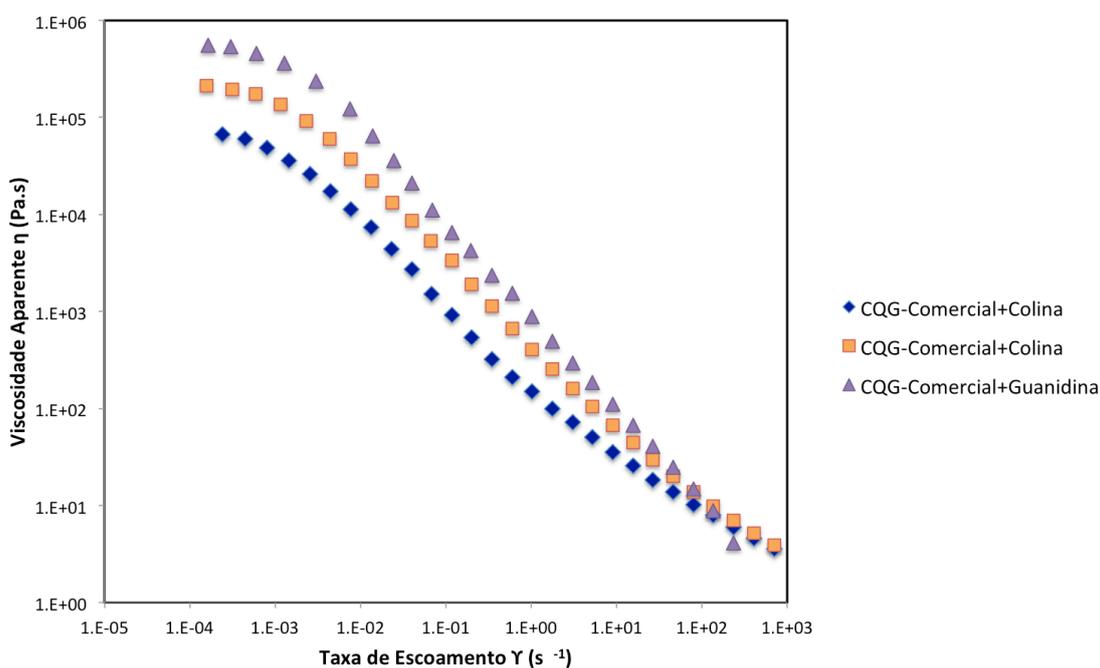


Figura 11: Representação da Curva de Escoamento das misturas CQG-Líquido Iônico.

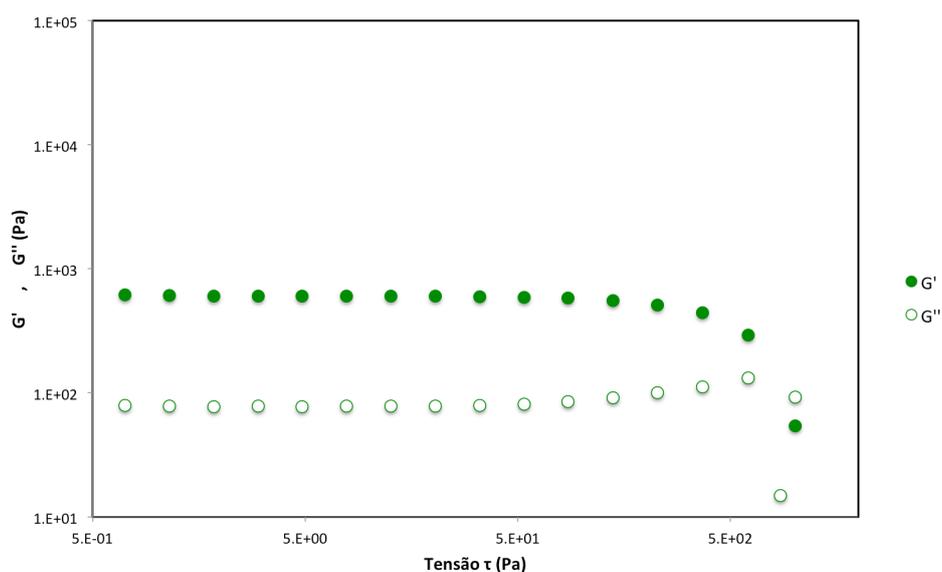
Observando a Figura 11, podemos analisar as curvas de escoamento das três misturas, onde se pode observar que para uma variação da taxa de escoamento entre aproximadamente 9×10^{-5} e $700 s^{-1}$, as viscosidades aparentes das três misturas são elevadas (na ordem 10^5 , 10^6 Pa.s) e variaram de forma semelhante, apresentando todas elas uma curva que descreve um comportamento reofluidificante, curva essa, que é típica do comportamento de um fluido não Newtoniano como seria de esperar. Para valores de taxas de escoamento mais elevadas, aproximadamente para valores superiores a $100 s^{-1}$, os resultados já não são tão fiáveis uma vez que já se encontra pouca amostra na geometria. Verifica-se que a mistura CQG-Comercial+Guanidina Acetato 110 °C é a que apresenta os valores de viscosidade mais elevados..

Testes Oscilatórios

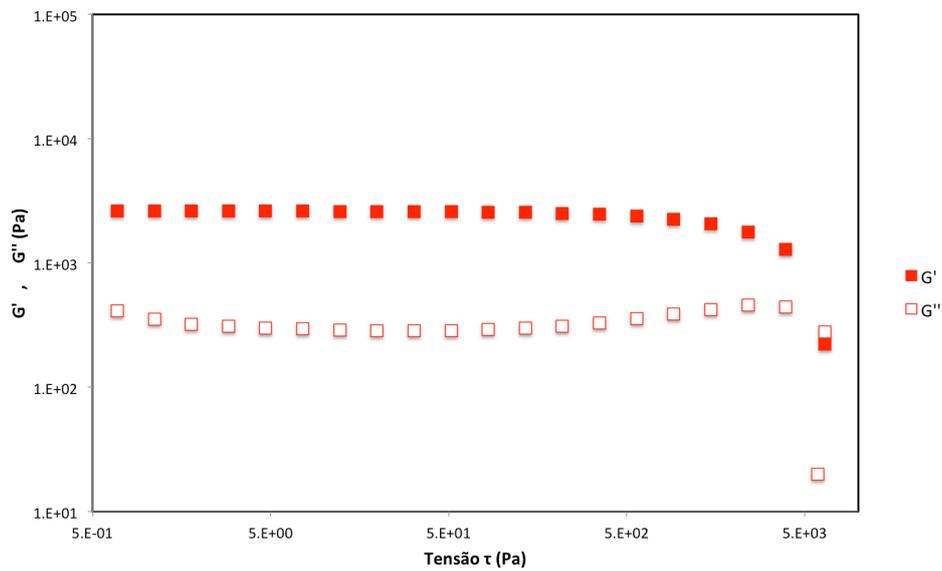
Uma vez que todas as misturas têm na sua composição biopolímeros, ou seja, apresentam à partida propriedades viscoelásticas, foram feitos também testes oscilatórios para estudar o comportamento viscoelástico das misturas. Foram feitos dois testes oscilatórios a cada mistura, inicialmente um varrimento de tensão, onde são medidos os módulos G' e G'' (Pa), a uma frequência fixa, em função da variação da tensão de corte τ (Pa), para determinar a zona de viscoelasticidade linear das misturas, zona essa onde o valor dos dois módulos é constante, e posteriormente um varrimento de frequências, realizado numa zona onde a mistura apresenta uma viscoelasticidade linear, zona essa que foi determinada pelo varrimento de tensão feito anteriormente. Quando aplicada uma tensão sob uma mistura, existe energia que é dissipada, e energia que é armazenada. À energia dissipada está associada a componente viscosa do material, e à energia armazenada está associada a componente elástica. No varrimento de frequências os módulos G' (energia armazenada, módulo elástico) e o G'' (energia dissipada, módulo viscoso) são medidos, a uma tensão fixa determinada no varrimento de tensão, em função da variação da frequência. Na Figura 12 encontram-se os resultados obtidos relativamente ao varrimento de tensão para as misturas CQG-líquido iónico.

- Varrimento de Tensão

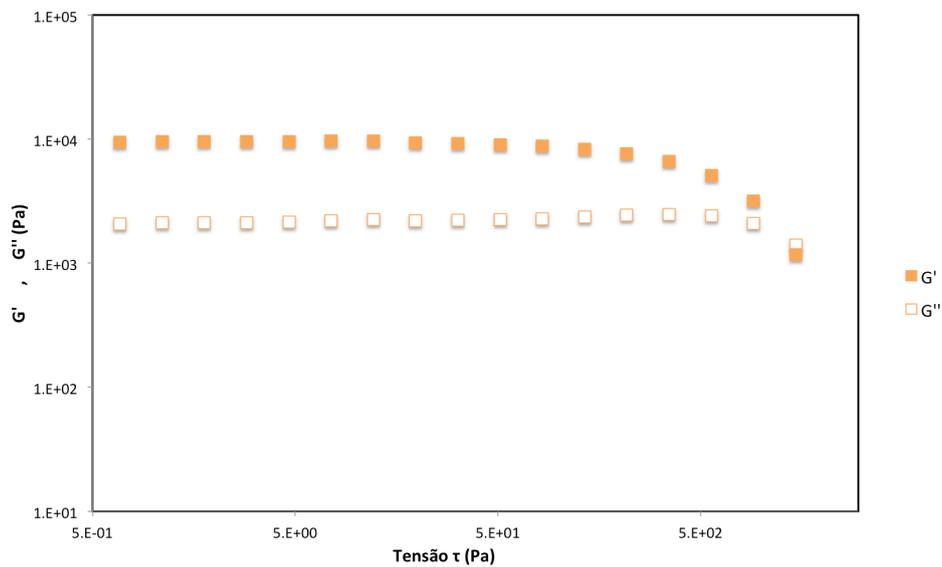
(a) CQG-FCT + Colina 110°C



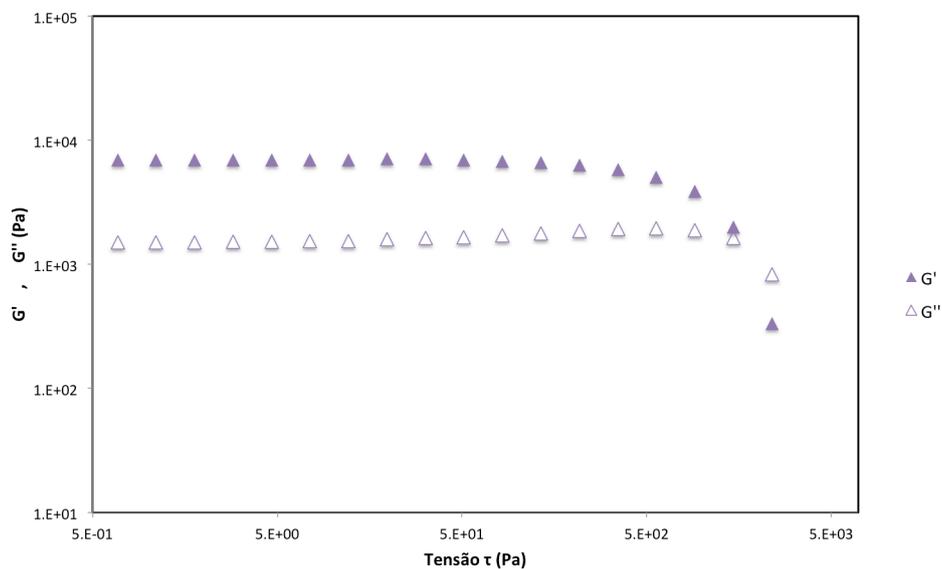
(b) CQG-FCT + Guanidina 110°C



(c) CQG-Comercial + Colina 110°C



(d) CQG-Comercial + Guanidina 110°C



(e) CQG-Comercial + Colina 80°C

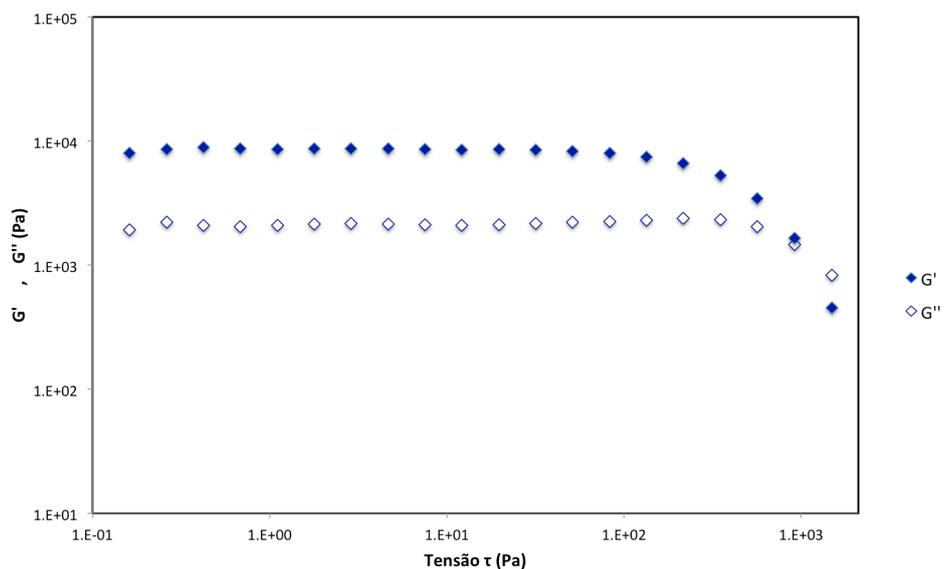


Figura 12: Representação da Variação do G' e G'' (Pa) em função da Tensão de Corte τ (Pa) para as Misturas (a) CQG-FCT + Colina 110°C; (b) CQG-FCT + Guanidina 110°C; (c) CQG-Comercial + Colina 110°C; (d) CQG-Comercial + Guanidina 110°C; (e) CQG-Comercial + Colina 80°C.

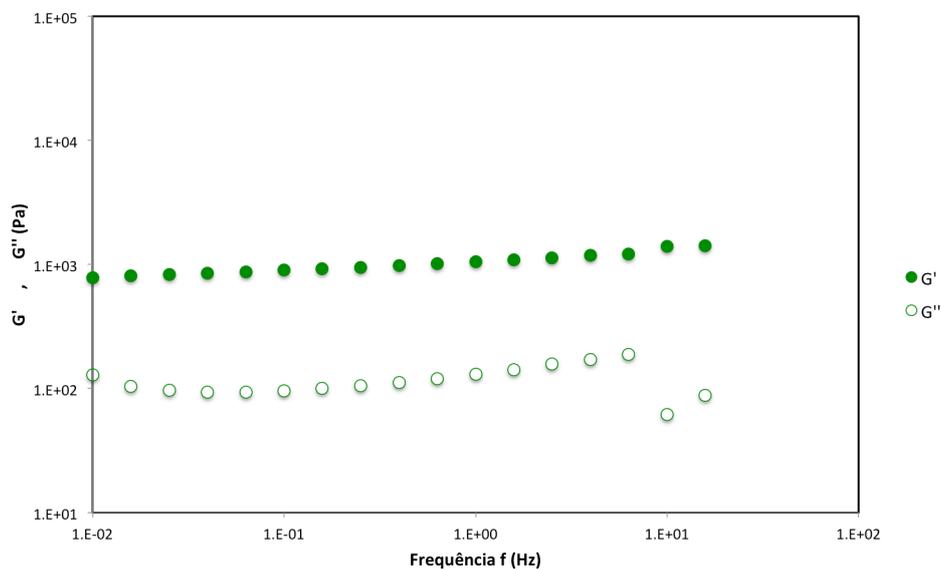
Da análise da Figura 12, observa-se a zona de viscoelasticidade linear das diferentes misturas. Este varrimento foi feito com o valor da frequência fixo em 1 Hz. Pode-se verificar que todas as misturas possuem uma zona de viscoelasticidade linear comum sensivelmente entre 1 e 50 Pa. Deste modo o varrimento de frequências para as misturas irá ser realizado a uma tensão de 10 Pa.

A tensão onde o valor dos módulos G' e G'' começa a deixar de ser linear, é designada por tensão crítica. Como se pode verificar pela análise da Figura 12, todas as misturas possuem um valor de tensão crítica muito semelhante, superior a 500 Pa e inferior a 1000 Pa.

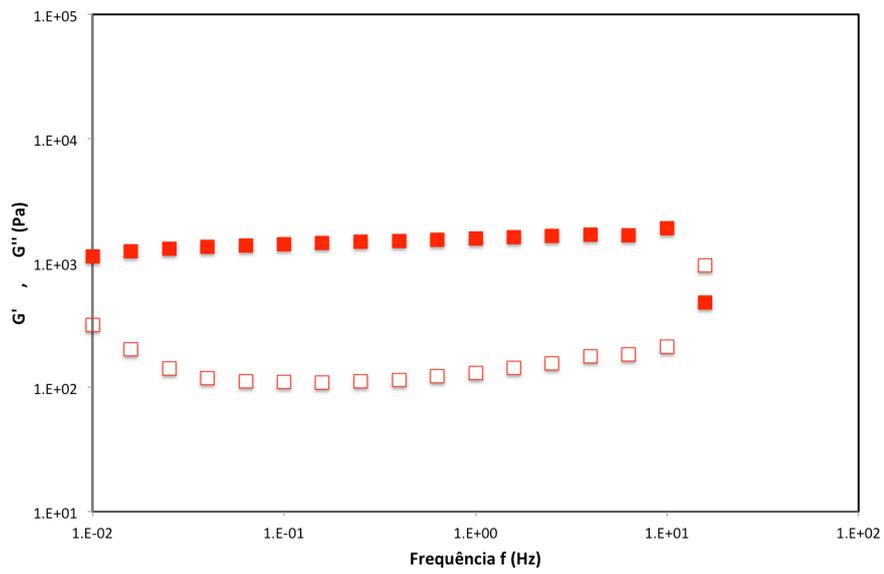
Na Figura 13 encontram-se os resultados obtidos relativamente ao varrimento de frequências para as misturas CQG-líquido iónico.

- Varrimento de Frequências

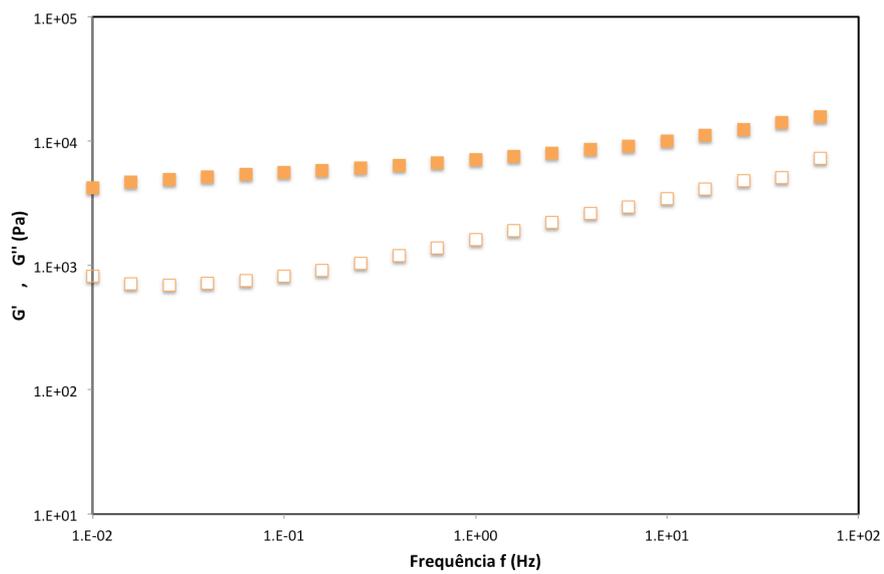
(a) CQG-FCT + Colina 110°C



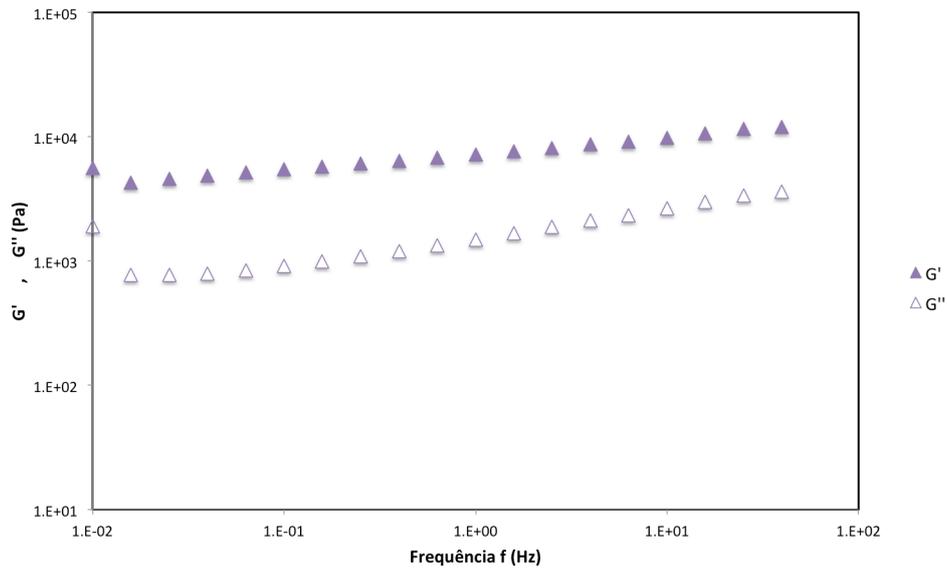
(b) CQG-FCT + Guanidina 110°C



(c) CQG-Comercial + Colina 110°C



(d) CQG-Comercial + Guanidina 110°C



(e) CQG-Comercial + Colina 80°C

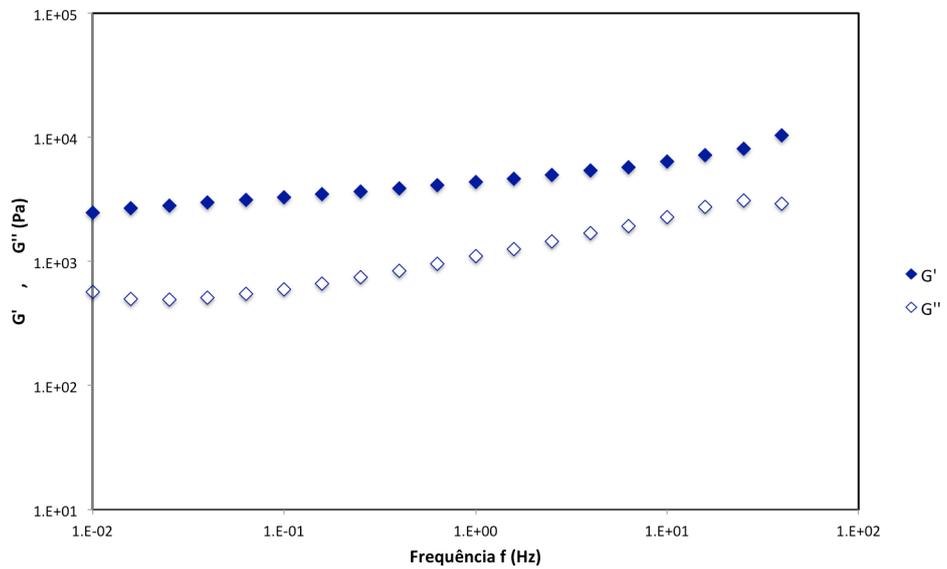


Figura 13: Representação da Variação do G' e G'' (Pa) em função da Frequência f (Hz) para as Misturas (a) CQG-FCT + Colina 110°C; (b) CQG-FCT + Guanidina 110°C; (c) CQG-Comercial + Colina 110°C; (d) CQG-Comercial + Guanidina 110°C; (e) CQG-Comercial + Colina 80°C.

Pela análise da Figura 13, podemos verificar que em todas misturas o módulo elástico G' , tem um valor superior ao módulo viscoso G'' , as distâncias entre os dois módulos são idênticas, aproximadamente uma década, e os valores de G' e G'' vão aumentando com o aumento da frequência. Estas curvas descrevem o comportamento típico de um gel fraco.

Verifica-se também que para as misturas CQG-Comercial com qualquer um dos líquidos iônicos testados, os valores obtidos para os dois módulos são da mesma grandeza, 10^3 o G'' e 10^4 o G' , o mesmo se passa com as misturas com o CQG-FCT para os dois líquidos iônicos, mas sendo que neste caso, os módulos apresentam valores mais baixos 10^2 para o G'' e 10^3 para o G' , de onde se pode concluir que os líquidos iônicos utilizados para a dissolução dos CQG não têm grande influência na estrutura interna da mistura.

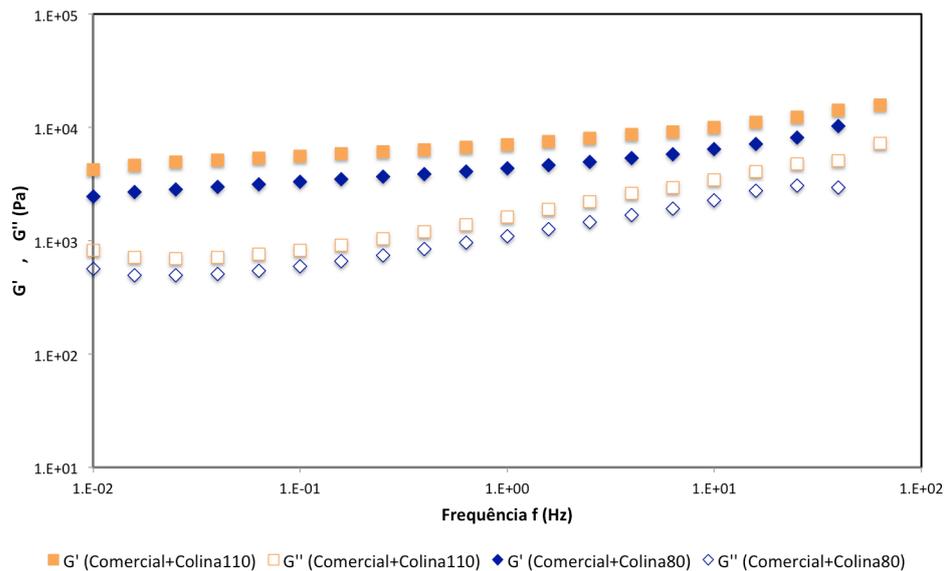
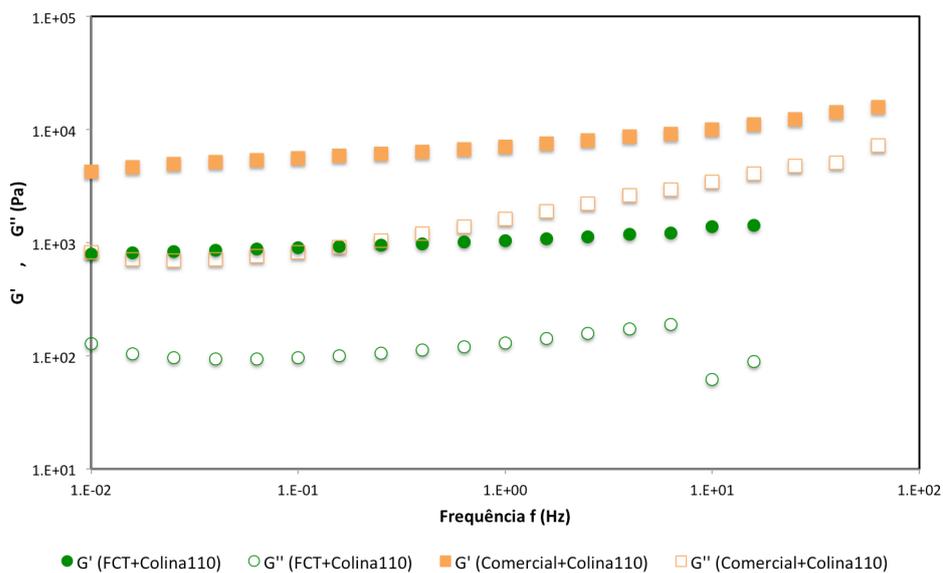


Figura 14: Representação da Variação do G' e G'' (Pa) em função da Frequência f (Hz) para as Misturas CQG-Comercial + Colina 110 °C e CQG-Comercial + Colina 80 °C.

Pela análise da Figura 14 podemos estudar o efeito da temperatura para uma mistura contendo o mesmo CQG e o mesmo líquido iônico, neste caso a colina acetato. Podemos verificar que os módulos G' e G'' da mistura CQG-Comercial + Colina 110 °C são ligeiramente superiores aos módulos da mistura CQG-Comercial + Colina 80 °C, mas que este valor não é significativo, pelo que se pode concluir que o aumento da temperatura de aquecimento de 80 °C para 110 °C, não tem grande influência na estrutura interna da mistura.

(a) CQG-FCT + Colina 110 °C e CQG-Comercial + Colina 110 °C



(b) CQG-FCT + Guanidina 110 °C e CQG-Comercial + Guanidina 110 °C

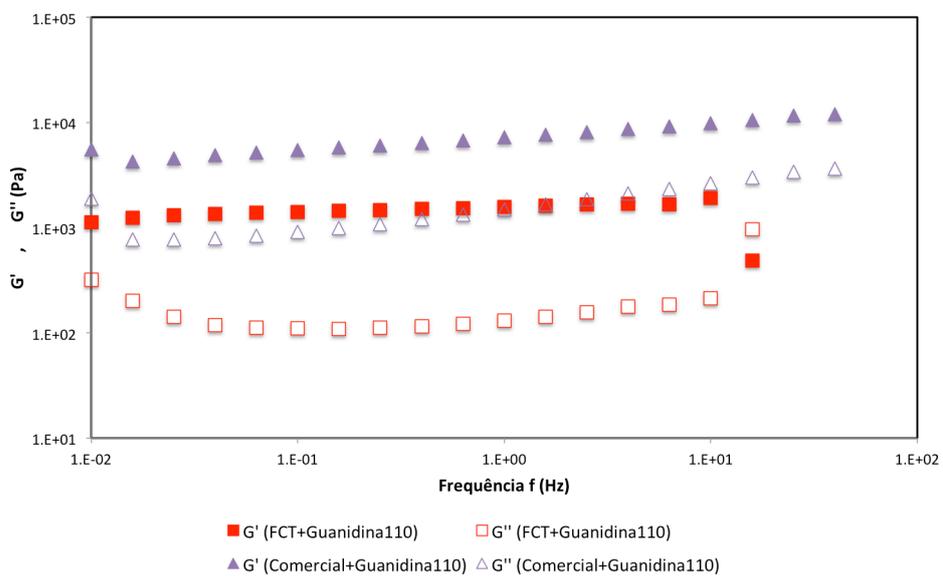


Figura 15: Representação da Variação do G' e G'' (Pa) em função da Frequência f (Hz) para as Misturas (a) CQG-FCT + Colina 110 °C e CQG-Comercial + Colina 110 °C; (b) CQG-FCT + Guanidina 110 °C e CQG-Comercial + Guanidina 110 °C.

Pela análise da Figura 15, podemos comparar as estruturas das misturas, uma vez que são ambas preparadas com o mesmo líquido iónico, colina acetato na Figura 15a e guanidina acetato na Figura 15b, e com a mesma temperatura 110 °C. Podemos então verificar que, em todas as misturas o módulo elástico G' , tem um valor superior ao módulo viscoso G'' , todas as misturas contendo o CQG-Comercial possuem os módulos G' e G'' superiores em cerca de uma década aos módulos das misturas contendo o CQG-FCT, e que em todas as misturas as distâncias entre os módulos G' e G'' se mantém constante, aproximadamente uma década. Este é o comportamento típico de um gel fraco, e significa também que todas as misturas têm uma estrutura interna semelhante, no entanto podemos concluir que as misturas que contêm o CQG-Comercial têm uma estrutura interna mais forte que as misturas que contêm o CQG-FCT, sendo portanto géis mais fortes.

3.2.2 Determinação da composição em açúcares (glucosamina, glucose e manose)

Para determinar a composição das misturas de CQG-líquido iónico, as amostras foram analisadas por HPLC, como descrito anteriormente. Na Tabela 6 está representada a composição das misturas CQG-líquido iónico assim como a razão quitina:glucanos.

Tabela 6: Composição em Glucosamina e em Glucanos das Misturas CQG-Líquido Iónico.

Mistura	Glucosamina (ppm)	Glucanos (ppm)	Razão Quitina:Glucanos (% molar)
CQG-Comercial+Colina 80 °C	n.d.*	532.00	
CQG-Comercial+Colina 110 °C	94.75	556.88	15:85
CQG-Comercial+Guanidina 110 °C	n.d.*	129.07	
CQG-FCT+Colina 110 °C	30.11	127.28	19:81
CQG-FCT+Guanidina 110°C	n.d.*	117.24	

*n.d.- não detectado

Pela análise da Tabela 6, podemos verificar que a razão quitina:glucanos é de 15:85 na mistura CQG-Comercial+Colina 110 °C e de 19:81, valores que são muito semelhantes aos valores dos

complexos puros que é de 16:84 (Tabela 5). Estes valores fazem sentido uma vez que a única coisa que foi feita foi a dissolução dos complexos no líquido iónico, o que faz com que a sua composição não se altere.

3.2.3 Calorimetria diferencial de varrimento (DSC)

A calorimetria diferencial de varrimento é uma técnica que permite, entre outras coisas, determinar a temperatura de transição vítrea (T_g) dos materiais. Na Tabela 7 estão representados os valores das temperaturas de transição vítrea (T_g) dos CQG puros, dos líquidos iónicos puros, e das misturas CQG-líquido iónico. No anexo III encontra-se o perfil do fluxo de calor em função da temperatura para as várias amostras.

Tabela 7: Temperaturas de Transição Vítrea dos CQG, dos Líquidos Iónicos, e das Misturas CQG-Líquido Iónico.

Amostra	Temperatura de Transição Vítrea, T_g (°C)
CQG-FCT	não detectada
CQG-Comercial	não detectada
Colina Acetato	-96.64
Guanidina Acetato	-70.70
CQG-FCT + Colina Acetato 110 °C	-101.80
CQG-FCT + Guanidina Acetato 110 °C	-72.75
CQG-Comercial + Colina Acetato 80 °C	-97.64
CQG-Comercial + Colina Acetato 110 °C	-98.71
CQG-Comercial + Guanidina Acetato 110 °C	-75.48

Pela análise dos resultados obtidos na Tabela 7, verifica-se que as T_g dos líquidos iónicos são de -96.64 °C para colina acetato, e -70.70 °C para a guanidina acetato. Observa-se também que os valores das T_g das misturas CQG-líquido iónico contendo o líquido iónico colina acetato, são

todos muito próximos entre as diferentes misturas, e com valores muito semelhantes ao valor da Tg do próprio líquido iônico. O mesmo acontece para misturas que contêm o líquido iônico guanidina acetato. A quitina pura apresenta um comportamento de um material cristalino ($T_g > 300^\circ\text{C}$) [14], enquanto que os glucanos apresentam um comportamento mais amorfo. Neste trabalho e usando esta técnica experimental, não foi possível determinar a Tg dos dois CQG puros. Seria expectável que a dissolução dos complexos quitina-glucanos em líquidos iônicos (que têm uma estrutura amorfa à temperatura ambiente), modificassem a estrutura do CQG de um estado mais cristalino para mais amorfo. Resultados publicados na literatura [7] mostram que líquidos iônicos não biocompatíveis, como o [AMIM]Cl, [BMIM]Cl têm esse efeito quando utilizados para dissolver a quitina pura. No entanto, com os dados obtidos neste trabalho não é possível concluir sobre esse efeito, uma vez que a Tg obtida para as diferentes misturas é muito semelhante à dos líquidos iônicos puros.

3.2.4 Termogravimetria

Os ensaios de termogravimetria foram também realizados para as misturas de CQG-líquido iônico. A Figura 16 representa a variação da perda de percentagem de massa das misturas CQG-líquido iônico, em função do aumento da temperatura. A Figura 17 representa uma ampliação da perda de percentagem de massa das misturas CQG-líquido iônico apenas no intervalo 0-100 °C.

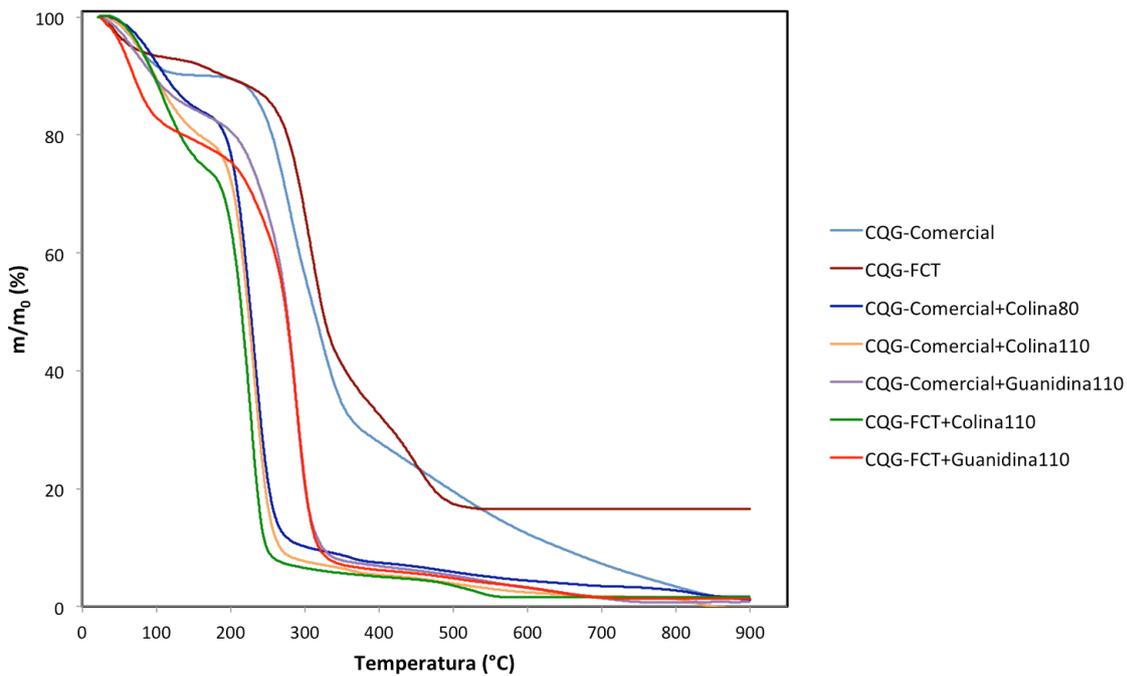


Figura 16: Representação da Variação da Porcentagem de Massa das Misturas CQG-Líquido Iônico em Função da Temperatura.

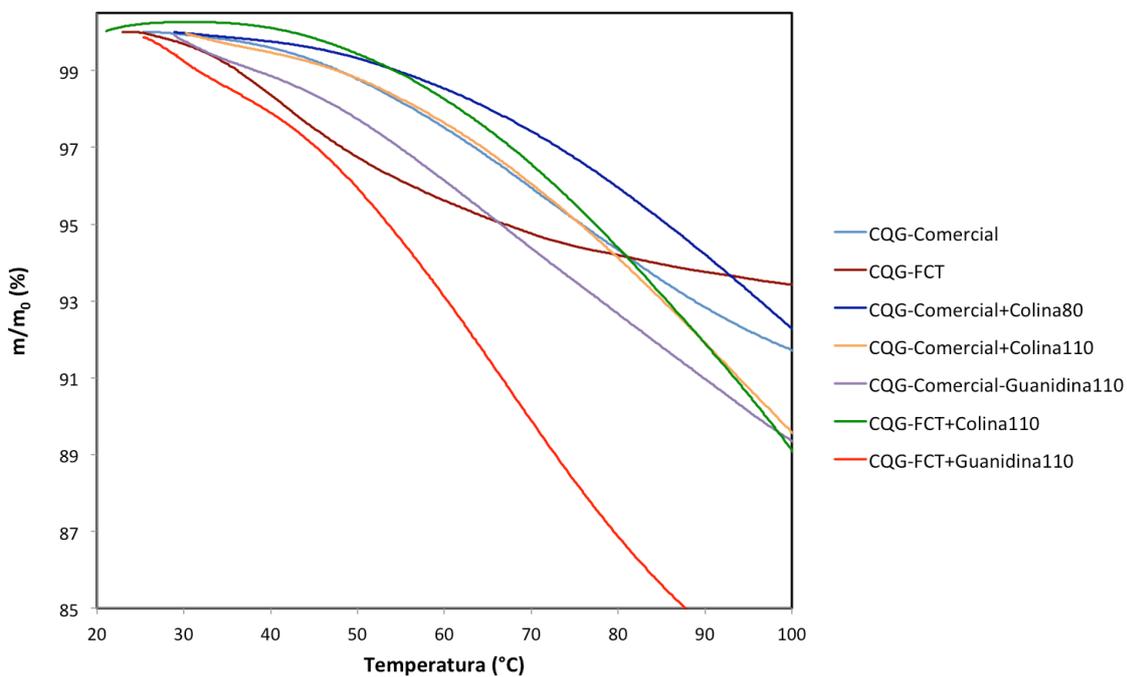


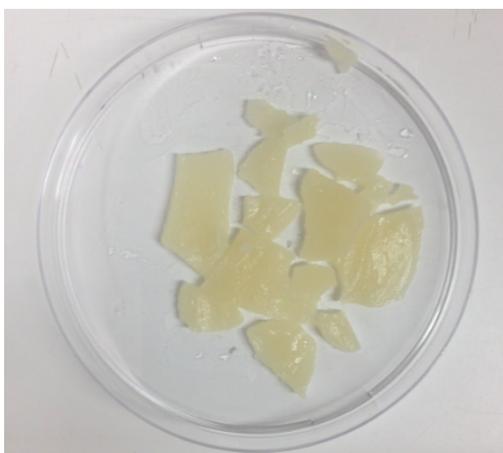
Figura 17: Representação da Variação da Porcentagem de Massa das Misturas CQG-Líquido Iônico em Função da temperatura até 100 °C.

Pela análise da Figura 16 podemos verificar que todas as misturas CQG-líquido iónico apresentam uma zona de desidratação no intervalo 0-100 °C, correspondente à perda de água, seguida da decomposição das misturas. Pela análise da Figura 17 correspondente à ampliação da zona de desidratação, podemos verificar que a mistura CQG-FCT+Guanidina 110 °C é a mistura que perde mais rapidamente água, sendo também a que perde uma maior quantidade de água, cerca de 20%. As misturas CQG-Comercial+Colina 110 °C, CQG-Comercial+Guanidina 110 °C e CQG-FCT + Colina 110 °C perdem sensivelmente a mesma quantidade de água, cerca de 10%, enquanto que a mistura que perde menos água, cerca de 7% é a mistura CQG-Comercial+Colina 80 °C. Podemos verificar também que todas as misturas se degradam totalmente.

3.3 Caracterização dos Filmes de CQG

Na Figura 18, encontram-se as imagens de alguns dos filmes de CQG produzidos neste trabalho.

(a)



(b)



Figura 18. Imagens dos filmes obtidos. (a) CQG-Comercial+Colina Acetato 80 ° C; (b) CQG-Comercial+Colina Acetato 110 ° C.

3.3.1 Determinação da composição em açúcares (glucose, manose, glucosamina)

Os filmes de CQG foram também caracterizados quanto à sua composição em glucosamina e glucanos. Na Tabela 8 está representada a composição dos filmes de CQG em glucosamina e glucanos, assim como a razão quitina:glucanos.

Tabela 8: Composição em Glucosamina e Glucanos dos Filmes de CQG.

Filme	Glucosamina (ppm)	Glucanos (ppm)	Razão Quitina:Glucanos (% molar)
CQG-Comercial+Colina 80 °C	n.d.*	271.75	
CQG-Comercial+Colina 110 °C	n.d.*	178.96	
CQG-Comercial+Guanidina 110 °C	210.75	559.75	27:73
CQG-FCT+Guanidina 110 °C	n.d.*	204.11	
CQG-FCT+Colina 110°C	57.28	129.14	31:69

n.d. – não detectado

Pela análise da Tabela 8, verifica-se que a razão quitina:glucanos nos filmes de CQG-Comercial+Guanidina 110 °C é de 27:73, e nos filmes de CQG-FCT+Colina 110 °C é de 31:69. Comparando as razões quitina:glucanos dos filmes com a razão quitina:glucanos dos CQG puros e das misturas CQG-líquido iónico, que é de aproximadamente 16:84, conclui-se que a lavagem das misturas com água feita no método de inversão de fase, altera a composição das misturas. O objectivo do método de inversão de fase utilizando água como solvente foi a remoção do líquido iónico biocompatível do CQG, uma vez que este é insolúvel em água. O facto da composição em açúcares ter sido alterada após a lavagem, poderá indicar que não apenas o líquido iónico é removido, mas também alguns dos açúcares das misturas.

3.3.2 Calorimetria diferencial de varrimento (DSC)

Na Tabela 9 estão representadas as temperaturas de transição vítrea dos filmes de CQG obtidos na realização deste trabalho.

Tabela 9: Temperatura de Transição Vítrea dos Filmes de CQG.

Filme	Temperatura de Transição Vítrea, Tg (°C)
CQG-FCT + Colina 110 °C	-114.92
CQG-FCT + Guanidina 110 °C	-77.18
CQG-Comercial + Colina 80 °C	-108.32
CQG-Comercial + Colina 110 °C	não detectada
CQG-Comercial + Guanidina 110 °C	não detectada

Pela análise da Tabela 9, pode-se ver que a temperatura de transição vítrea dos filmes de CQG-FCT+Colina 110 °C e de CQG-Comercial+Colina 110 °C é de -114.92 °C e -108.32 °C respectivamente, enquanto que a Tg do filme de CQG-FCT+Guanidina 110 °C é de -77.18 °C. Embora quando comparados estes valores com as Tg dos complexos puros e das misturas (Tabela 7), estes sejam inferiores, pode concluir-se na mesma que estes estejam a ser também mascarados pelas Tg dos líquidos iónicos, o que poderá indicar que a lavagem com água não foi eficiente na remoção total do líquido iónico biocompatível .

Pode-se também concluir que os filmes de CQG são amorfos à temperatura ambiente, uma vez que apresentam uma Tg negativa.

3.3.3 Termogravimetria

Os ensaios de termogravimetria foram também realizados para os filmes de CQG. A Figura 19 representa a variação da perda de percentagem de massa dos filmes de CQG, em função do aumento da temperatura. A Figura 20 representa a perda de percentagem de massa das misturas CQG-líquido iónico apenas no intervalo 0-100 °C.

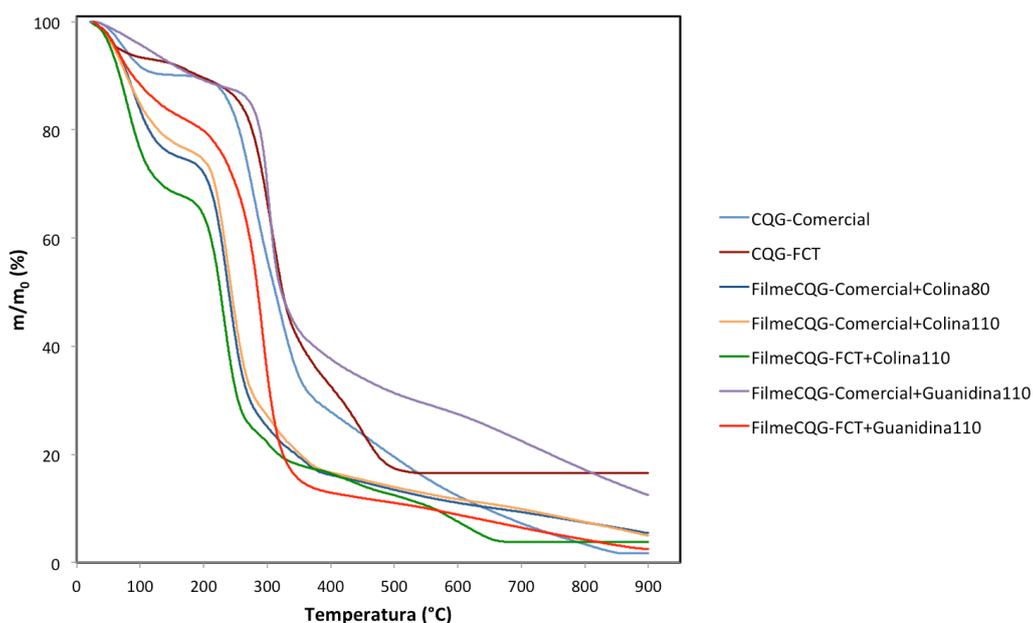


Figura 19: Representação da Variação da Percentagem de Massa dos Filmes de CQG em Função da Temperatura.

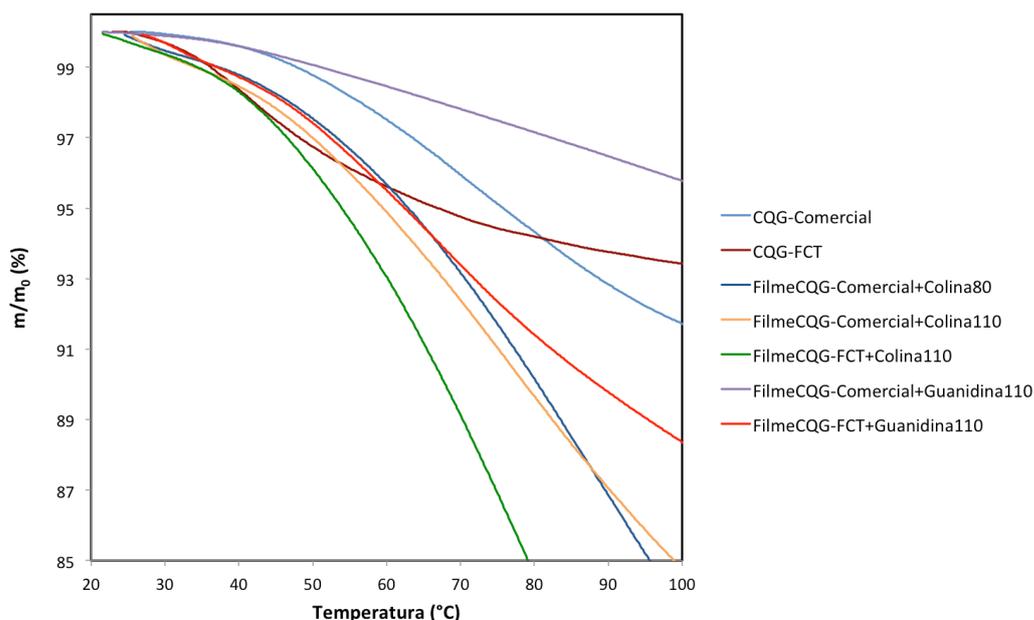


Figura 20: Representação da Variação da Percentagem de Massa dos Filmes de CQG em Função da Temperatura até 100 °C.

Pela análise da Figura 19 podemos verificar que todos os filmes de CQG apresentam uma zona de desidratação no intervalo 0-100 °C, correspondente à perda de massa de água, seguida da sua decomposição. Pela análise da Figura 20 correspondente à zona de desidratação (20-100 °C), podemos verificar que o filme de CQG-Comercial+Guanidina 110 °C é o que perde menos massa de água, cerca de 3%, enquanto que o filme de CQG-FCT+Colina 110 °C é o que perde uma maior quantidade de água, cerca de 20%. Os restantes filmes perdem sensivelmente a mesma quantidade de água, entre 12 e 15%.

Verifica-se também que, em todos os filmes a decomposição nunca começa antes dos 200-300 °C, o que significa que, uma vez que uma das principais aplicações dos mesmos, seria em pensos para feridas, e em revestimentos ou enxertos de pele, estes filmes seriam resistentes e estáveis para as aplicações desejáveis.

3.3.4 Ângulos de Contacto

A medição de ângulos de contacto tem como objectivo conhecer propriedades de superfície dos materiais, destacando-se a adesão, molhabilidade e hidrofobicidade. Para tal é medido o ângulo de contacto resultante entre uma gota de um líquido (normalmente água) colocado sobre a superfície de um material. Se o ângulo for superior a 90° o material é hidrofóbico se for inferior a 90° o material é hidrofílico.

Para a medição dos ângulos de contacto, foram testados neste trabalho, cinco solventes diferentes, pela seguinte ordem: água, glicerol, isopropanol, polietilenoglicol 200 (solução 10%), e polietilenoglicol 400. Nos filmes de CQG-Comercial+colina acetato (80 °C), CQG-Comercial+colina acetato (110°C) e CQG-Comercial+guanidina (110 °C) acetato, o software de captura de imagem não conseguiu detectar sequer a presença da gota, uma vez que imediatamente após ser colocada, esta se espalhava completamente na superfície, o que aconteceu com todos os seis solventes testados. Concluiu-se então que os filmes são extremamente hidrofílicos, o que veio comprovar o que era esperado [7]. No entanto, foi impossível arranjar uma amostra dos filmes que possuísse uma superfície minimamente plana onde fosse possível fazer a medição correctamente.

Para os filmes de CQG-FCT+colina acetato (110 °C) e CQG-FCT+guanidina acetato (110 °C) não foi sequer possível colocar a gota na superfície dos filmes para efectuar a medição dos ângulos de contacto, uma vez que a superfície dos filmes apresentava muita rugosidade e não o permitia.

4. Conclusão

O principal objectivo deste trabalho foi o desenvolvimento de estruturas poliméricas, nomeadamente filmes, produzidos a partir da dissolução do complexo quitina-glucanos em líquidos iónicos para aplicações biomédicas.

Os CQG-FCT e o CQG-Comercial, ambos continham água, e apresentaram um conteúdo em proteína de 10.23% e 4.24% respectivamente, no entanto apenas no CQG-FCT foi detectada a presença de cinzas, concluindo-se portanto que não é um biopolímero tão puro como o CQG-Comercial.

Estudos de reologia realizados mostraram que as misturas CQG-líquido iónico apresentam uma viscosidade elevada, propriedades viscoelásticas, e possuíam um comportamento característico de um gel fraco.

Tendo como principal aplicação os pensos para feridas e queimaduras, após a caracterização realizada por diferentes técnicas, o facto dos filmes produzidos serem amorfos à temperatura ambiente, apresentarem perfeita estabilidade até 100 °C e serem extremamente hidrofílicos, confere-lhes características e propriedades ideais e indispensáveis à sua utilização e aplicação. Pode concluir-se que a lavagem com água realizada pelo método de inversão de fase, não se mostrou totalmente eficiente na remoção do líquido iónico biocompatível, uma vez que os filmes produzidos continham ainda algum líquido iónico na sua composição, como se pode aferir pelos resultados da determinação da temperatura de transição vítrea. Pode verificar-se também que a lavagem com água altera significativamente a composição dos complexos quitina-glucanos.

Com o trabalho experimental desenvolvido podemos então concluir que a produção de filmes de CQG com líquidos iónicos biocompatíveis se apresenta como uma forte alternativa, e como uma inovadora solução na área da biomedicina, mais precisamente na sua aplicação em pensos para feridas e queimaduras.

5. Trabalho Futuro

Na investigação científica, nenhum trabalho está acabado. Perguntas dão origem a respostas, que por sua vez voltam a originar novas perguntas, assim como problemas originam soluções, soluções essas que voltam a criar novos problemas e novos desafios, e é este um dos grandes estímulos de quem faz ciência.

O objectivo do trabalho desenvolvido foi a produção de filmes de quitina com líquidos iónicos biocompatíveis para aplicações biomédicas. De seguida serão efectuadas algumas sugestões para a continuação do desenvolvimento deste trabalho:

- Optimizar o “cast” da mistura de modo a conseguir obter-se um filme com espessura controlada (por exemplo utilizando um aplicador automático de solução com velocidade e espessura controlada);
- Melhorar a lavagem com água pelo método de inversão de fase, para uma melhor remoção do líquido iónico da mistura (mergulhando a mistura numa corrente de água);
- Utilização de um plastificante adequado aquando da lavagem para manter ao máximo a estrutura, e secar os filmes em ambiente controlado de temperatura e humidade, impedindo que os filmes produzidos se partam quando secam;
- Realizar ensaios de permeabilidade ao O₂, CO₂ e ao vapor de água, para perceber o seu comportamento na presença destes gases;
- SEM (*Scanning Electron Microscopy*) para estudar a morfologia interna dos filmes;
- FTIR (*Fourier Transformed Infrared Spectroscopy*) e NMR (*Nuclear Magnetic Resonance*) para melhorar a análise da composição dos filmes;
- XRD (*X-Ray Diffraction*) para determinar o grau de cristalinidade dos filmes;
- Testes in-vitro e in-vivo para avaliar a biocompatibilidade e a actividade biológica (actividade antimicrobiana) e capacidade antioxidante dos filmes.

6. Bibliografia

- [1] Sang Hyunn Lee, Minoru Miyauchi, Jonathan S. Dordick, Robert J. Linhart, Preparation of Biopolymer-Based Materials Using Ionic Liquids for the Biomedical Application, *ACS Symposium Series, American Chemical Society: In Ionic Liquids Applications: Pharmaceuticals, Therapeutics, and Biotechnology*, 2010, 115-134
- [2] Samuel M. Hudson, David W. Jenkins, Chitin and chitosan, *Encyclopedia of Polymer Science and Technology*, John Wiley, 569-580
- [3] R. Jayakumar, M. Prabakaran, P.T. Sudheesh Kumar, S.V. Nair, H. Tamura, Biomaterials based on chitin and chitosan in wound dressing applications, *Biotechnology Advances*, 29 (2011) 322-337
- [4] Marguerite Rinaudo, Chitin and chitosan: Properties and applications, *Prog. Polym. Sci.* 31 (2006) 603-632
- [5] Christophe Roca, Bárbara Chagas, Inês Farinha, Filomena Freitas, Luís Mafra, Filipe Aguiar, Rui Oliveira, Maria A.M. Reis, Production of yeast chitin-glucan complex from biodiesel industry bioproduct, *Process Biochemistry*, 47 (2012) 1670-1675
- [6] <http://clariant.com/C12576720021BF8F/vwWebPagesByID/EEE199D1BC117938C12579160040A91D> (último acesso a 5/10/2013)
- [7] Wen-Tao Wang, Jiang Zhu, Xiu-Li Wang, Yan Huang, Yu-Zhong Wang, Dissolution Behavior of Chitin in Ionic Liquids, *Journal of Macromolecular Science, Part B: Physics*, 49 (2010) 528-541
- [8] Thi Phuong Thuy Pham, Chul-Woong Cho, Yeoung-Sang Yun, Environmental fate and toxicity of ionic liquids: A review, *Water Research*, 44 (2010) 352-372
- [9] Nicola Wood, Gill Stephens, Accelerating the discovery of biocompatible ionic liquids, *Physical Chemistry Chemical Physics*, 12 (2010) 1670-1674
- [10] Raquel M. Frade, Andreia A. Rosatella, Carolina S. Marques, Luís C. Branco, Prashant Kulkarni, Nuno M.M. Mateus, Carlos A.M. Afonso, Catarina M.M. Duarte, Toxicological evaluation on human colon carcinoma cell line (CaCo-2) of ionic liquids based on imidazolium, guanidinium, ammonium, phosphonium, pyridinium and pyrrolidinium cations, *Green Chemistry*, 11 (2009) 1660-1665

- [11] Riccardo A.A. Muzzarelli, Chitins and chitosans for the repair of wounded skin, nerve, cartilage and bone, *Carbohydrate Polymers*, 76 (2009) 167-182
- [12] Simone S. Silva, Ana Rita C. Duarte, Ana Paula Carvalho, João F. mano, Rui L. Reis, Green processing of porous chitin structures for biomedical applications combining ionic liquids and supercritical fluid technology, *Acta Biomaterialia*, 7 (2011) 1166-1172
- [13] Howard A. Barnes, A Handbook of Elementary Rheology, *University of Wales, Institute of Non-Newtonian Fluid Mechanics*, Aberystwyth, 2000
- [14] AUSA Chandumpai, Narongsak Singhpibulporn, Damrongsak Faroongsarng, Prasart Sornprasit, Preparation and physico-chemical characterization of chitin and chitosan from the pens of the squid species, *Loligo lessoniana* and *Loligo formosana*, *Carbohydrate Polymers*, 58 (2004) 467-474

7. Anexos

7.1 Anexo I - Curva de calibração para determinação do conteúdo em proteína

Para a determinação do conteúdo em proteína dos dois CQG estudados, foi necessário determinar a curva de calibração que relaciona a concentração em BSA (mg/mL) com a absorvância medida a 750 nm, como se pode ver na Figura 21.

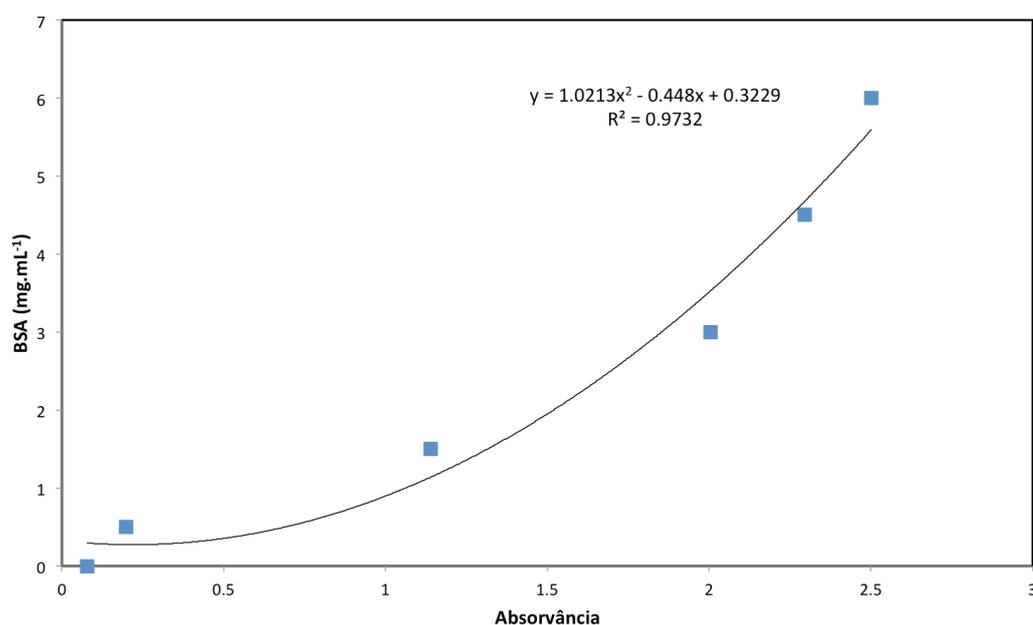


Figura 21. Curva de Calibração para Determinação do Conteúdo em Proteína dos CQG estudados.

7.2 Anexo II – HPLC

Na Figura 22 encontra-se um exemplo de um espectro obtido para a quantificação do pico da manose e da glucose.

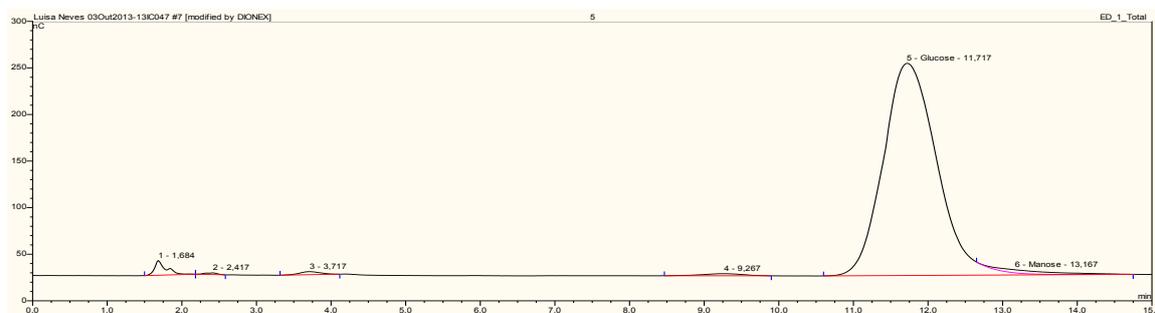


Figura 22. Espectro da glucose e da manose.

7.3 Anexo III – Resultados de DSC

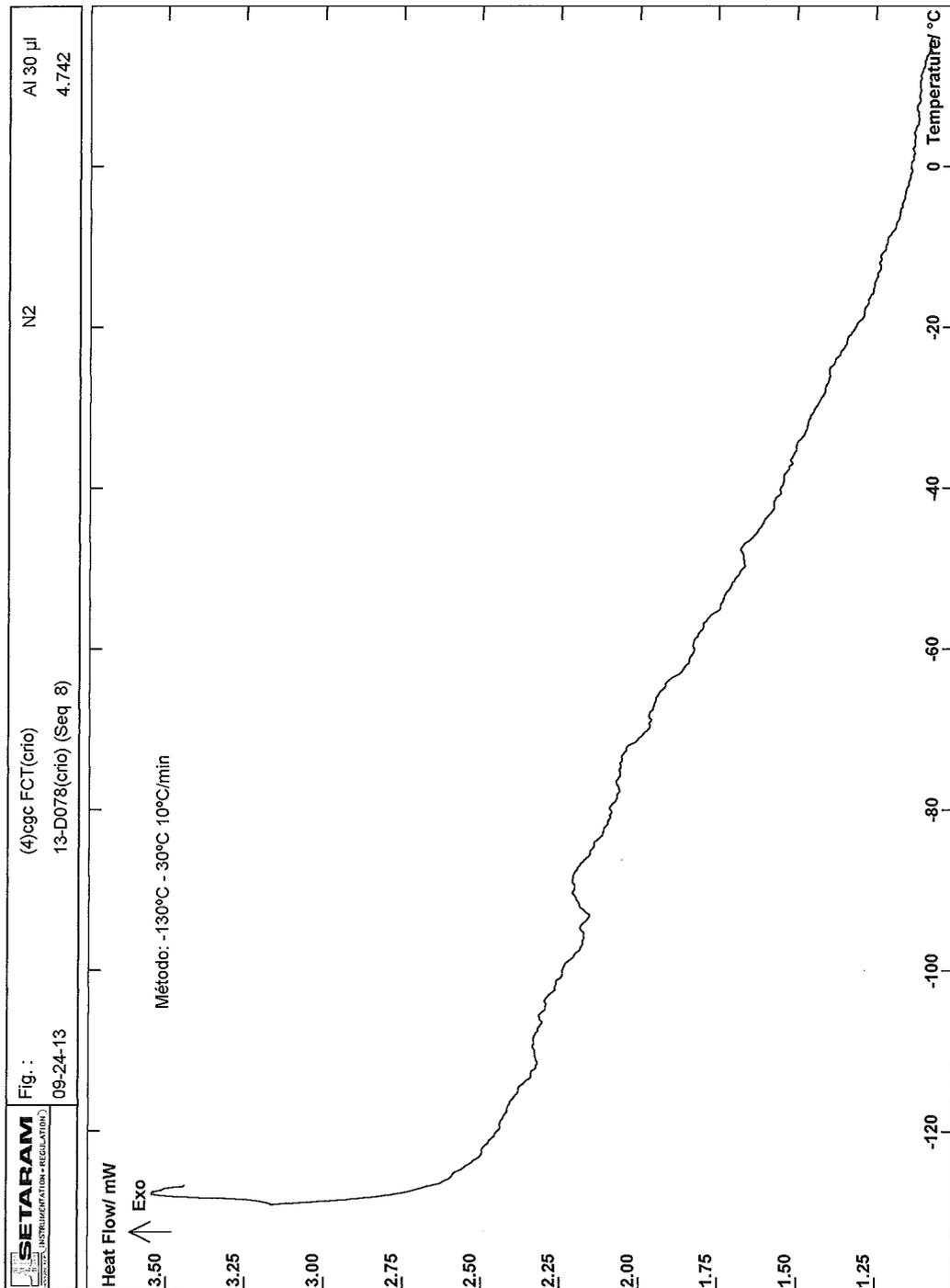


Figura 23. CQG-FCT.

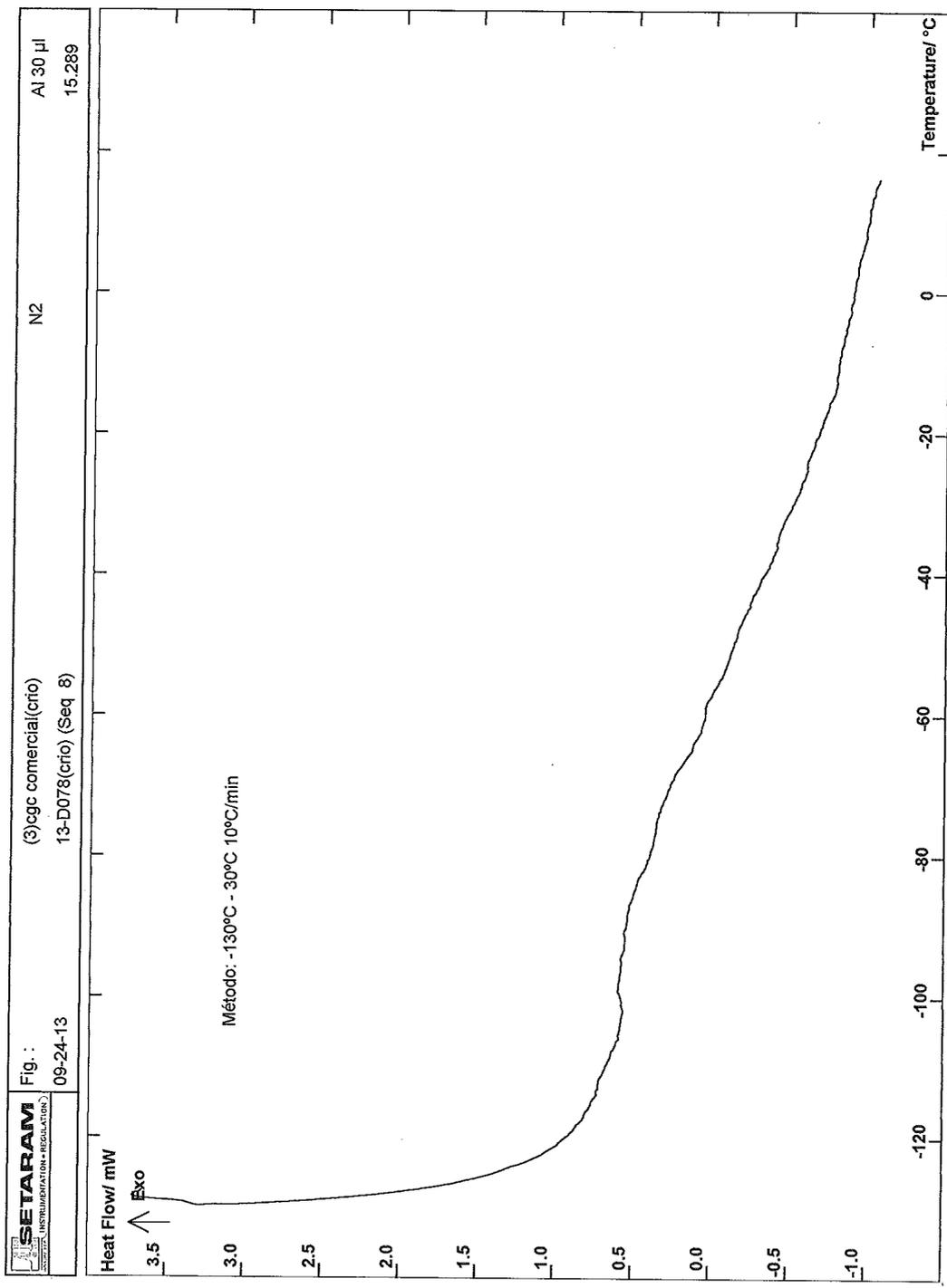


Figura 24. CQG-Comercial.

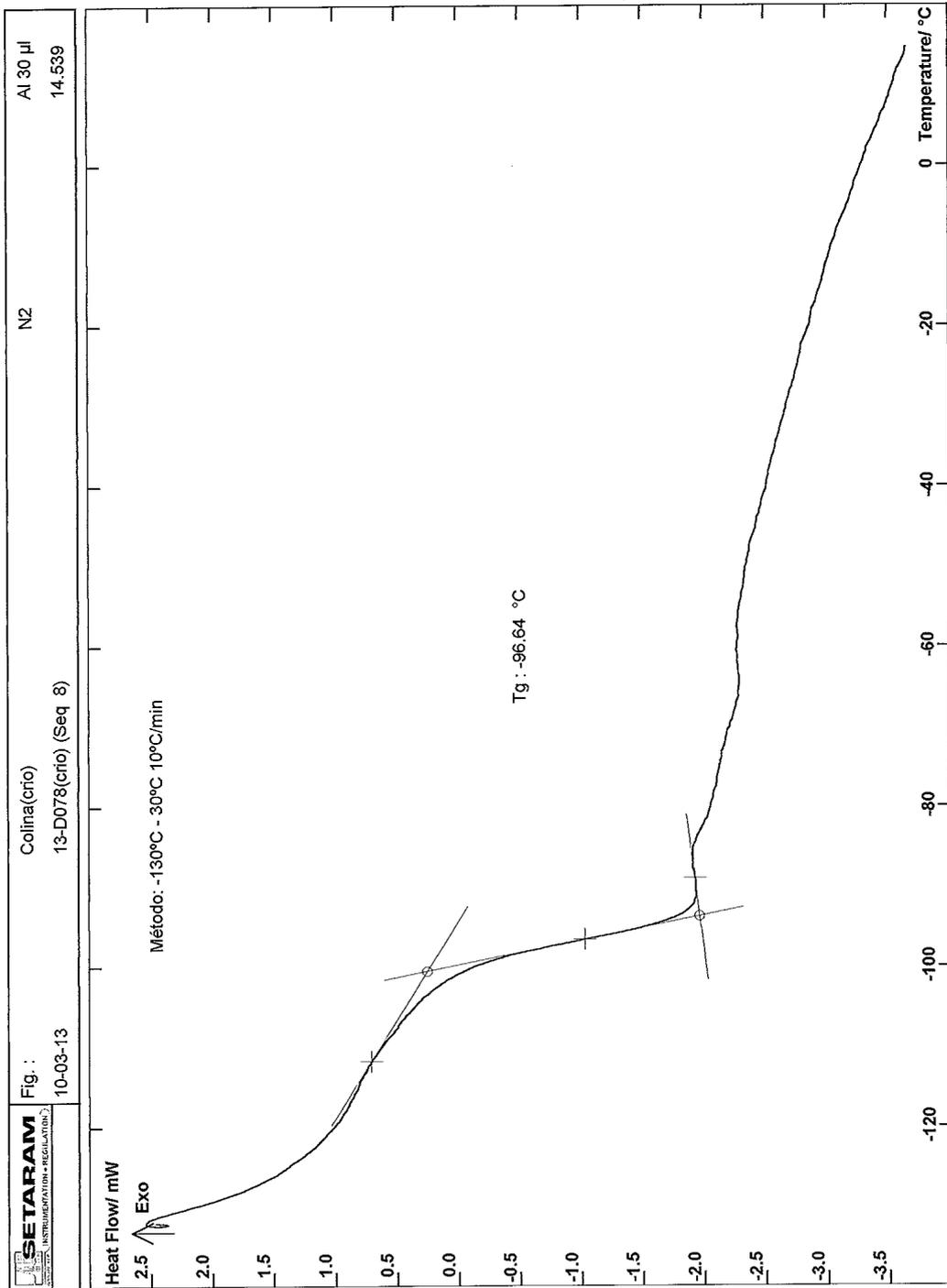


Figura 25. Colina Acetato.

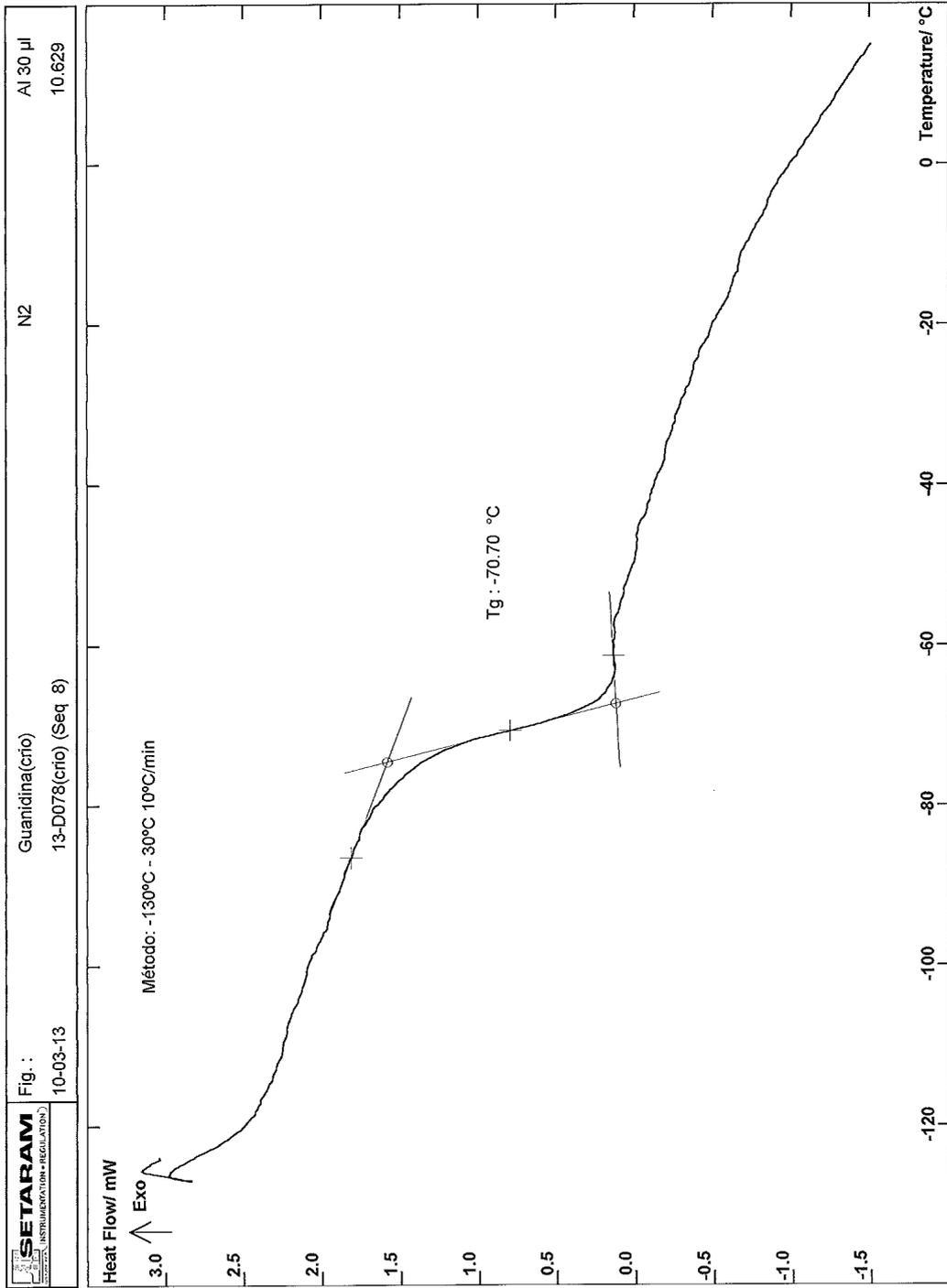


Figura 26. Guanidina Acetato.

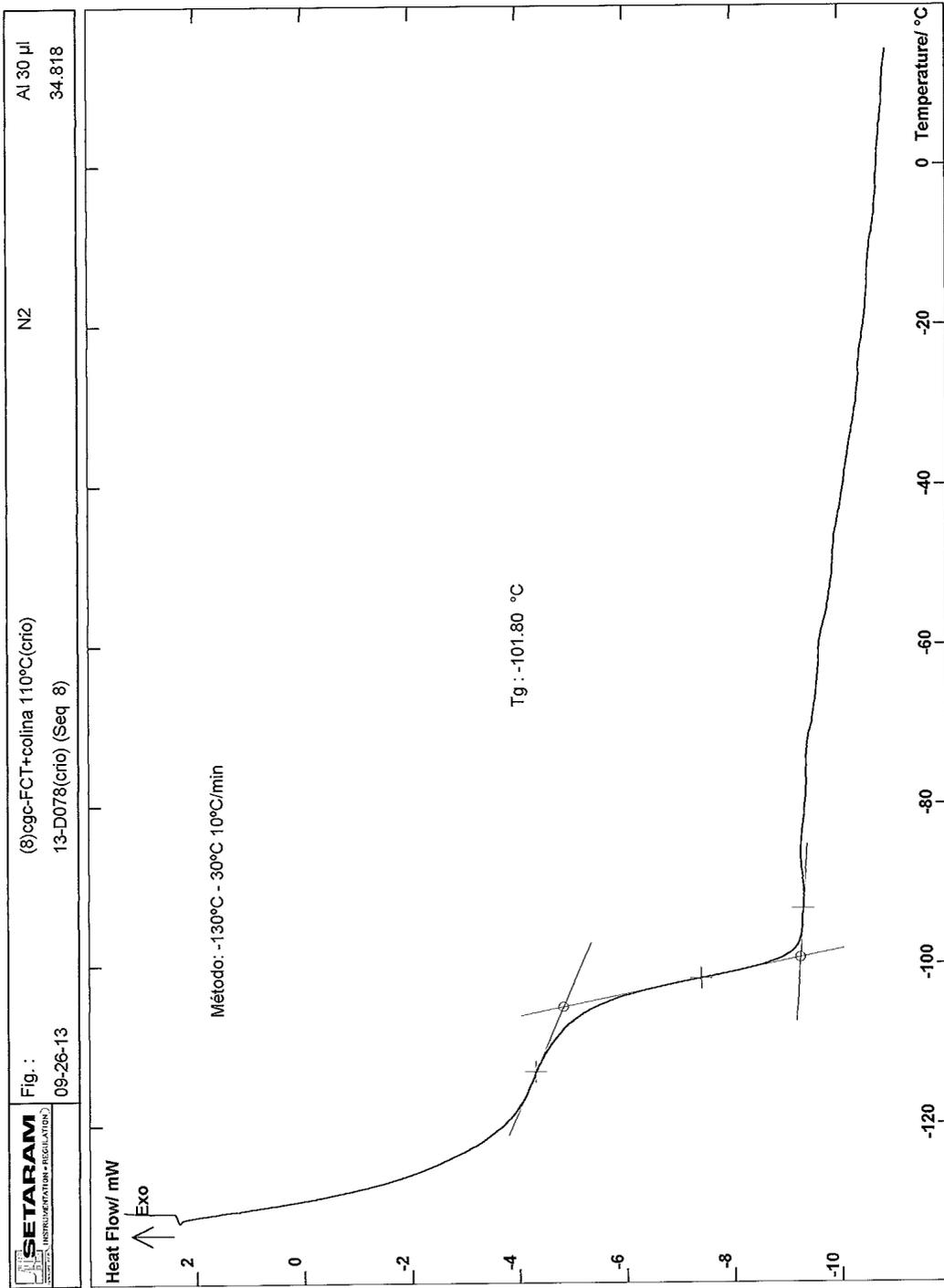


Figura 27. CQG-FCT+Colina 110 °C.

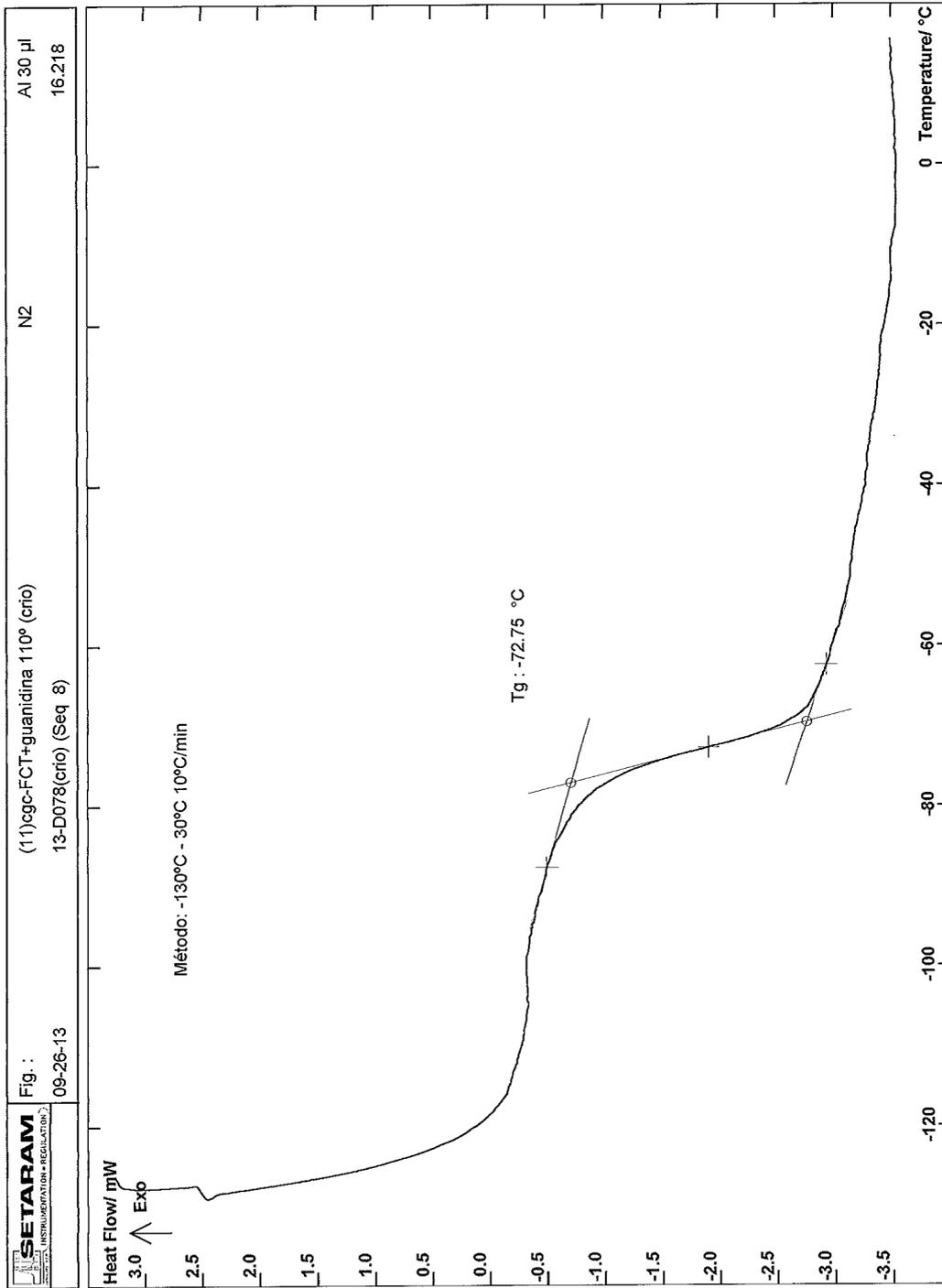


Figura 28. CQG-FCT+Guanidina 110 °C.

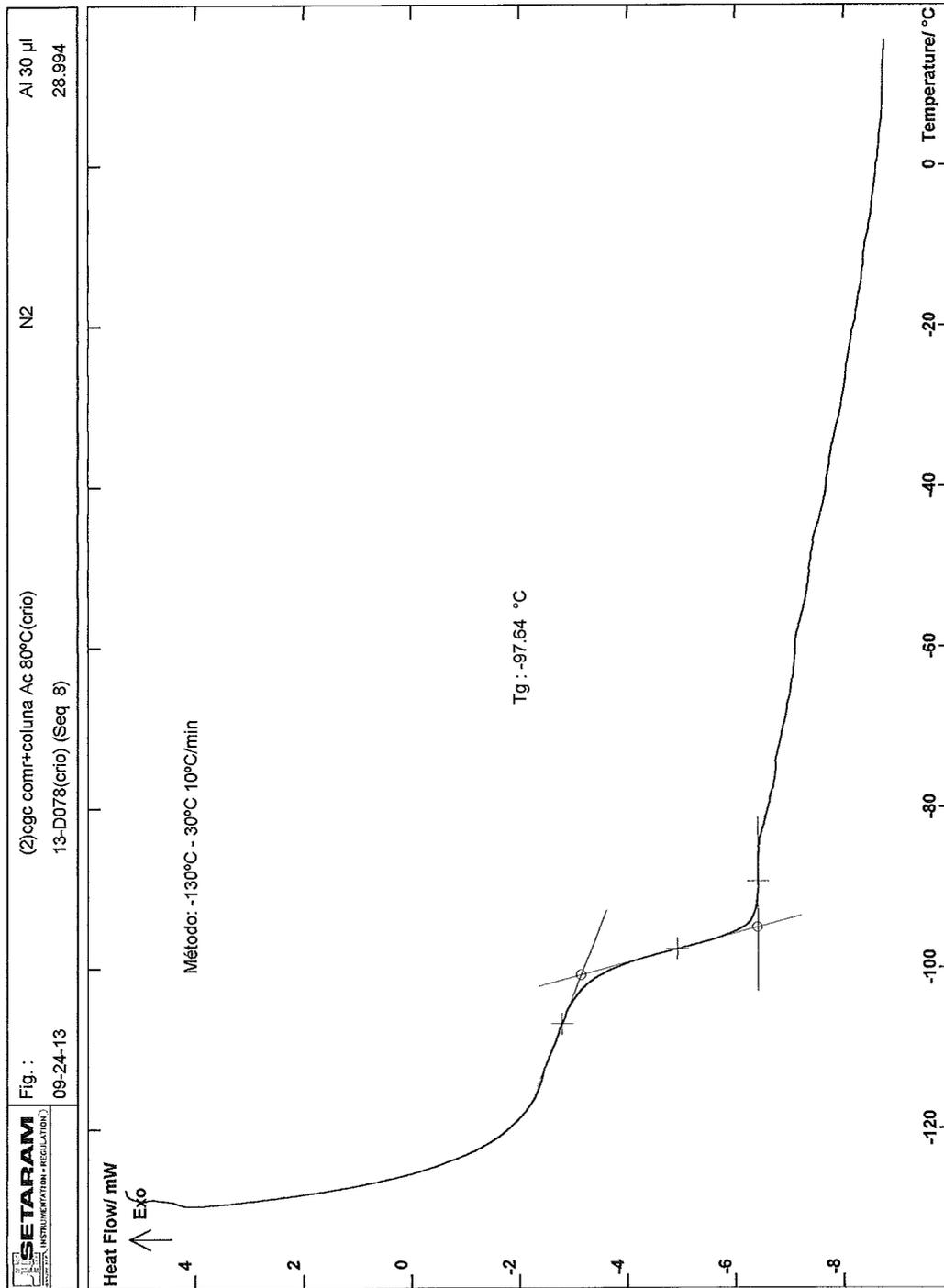


Figura 29. CQG-Comercial+Colina 80 °C.

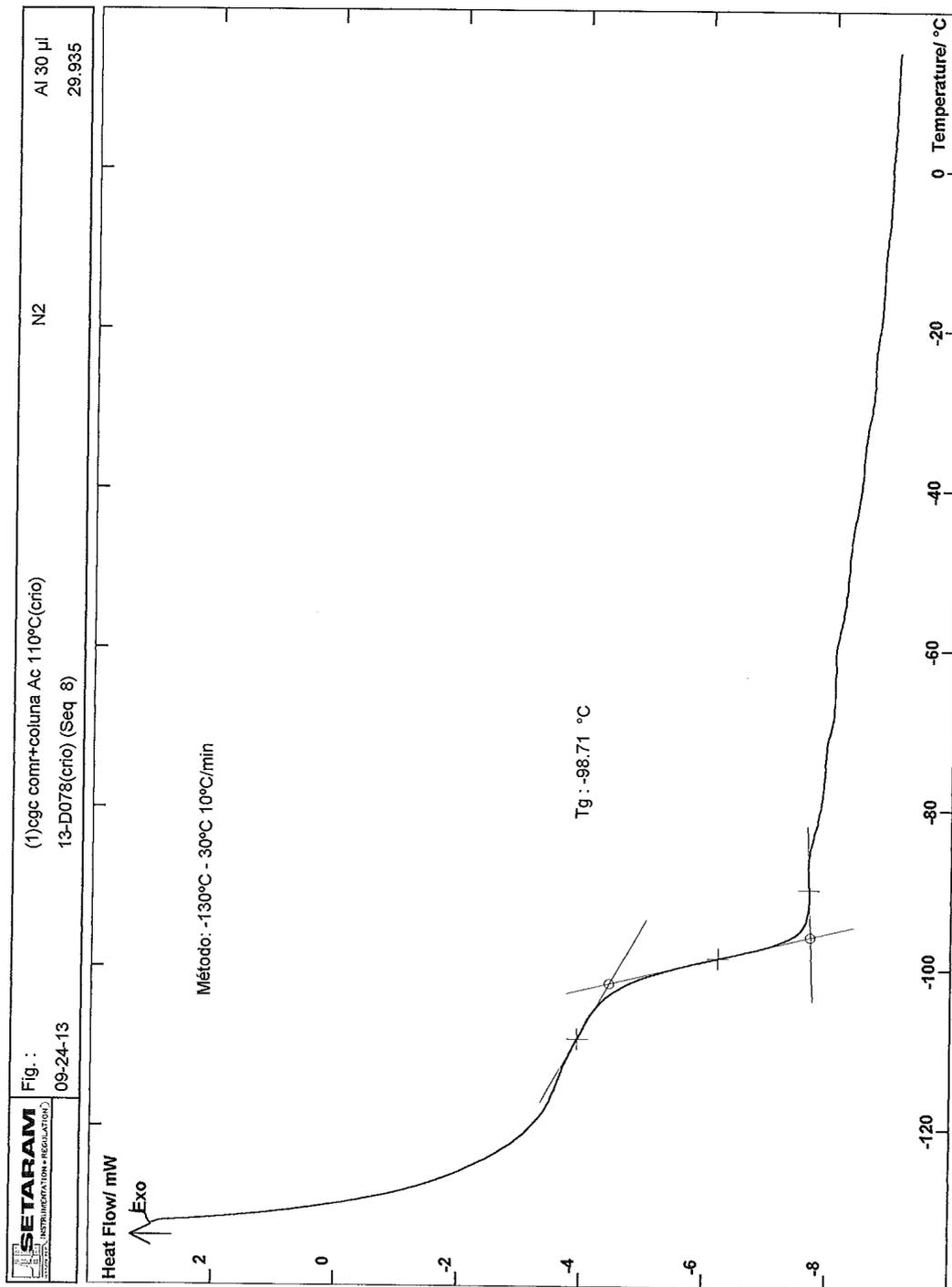


Figura 30. CQG-Comercial+Colina 110 °C.

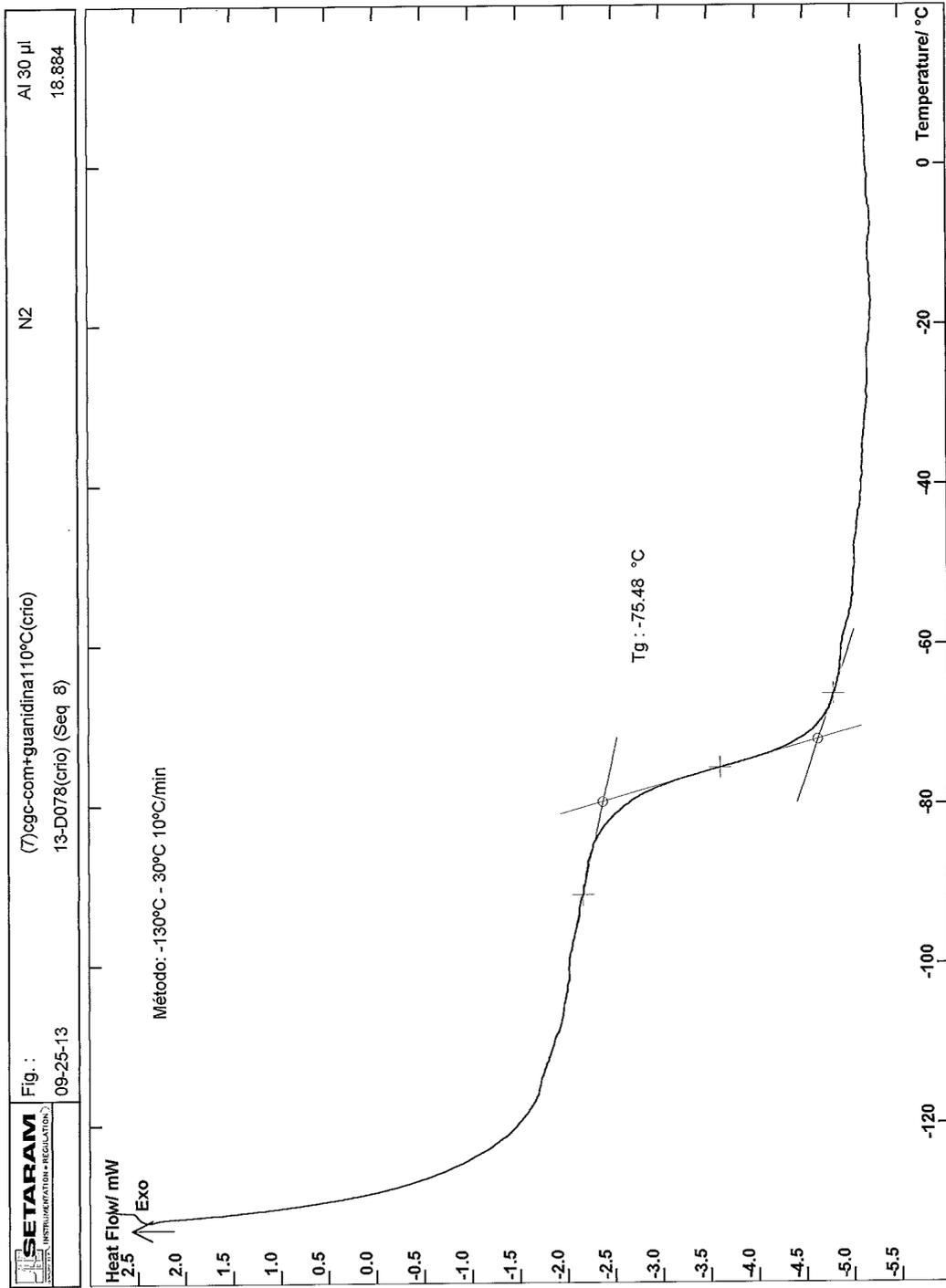


Figura 31. CQG-Comercial+Guanidina 110 °C.

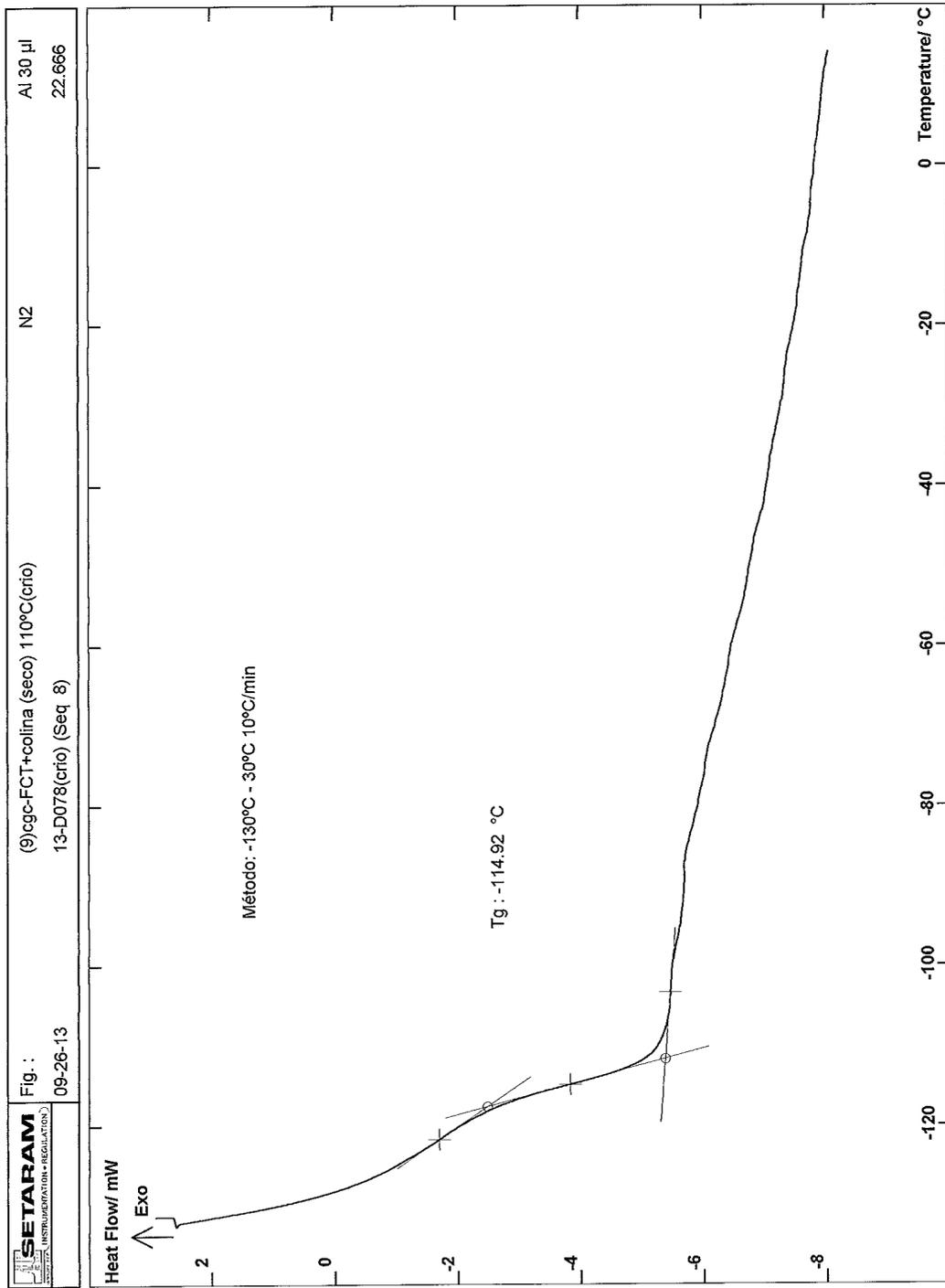


Figura 32. Filme CQG-FCT+Colina 110 °C.

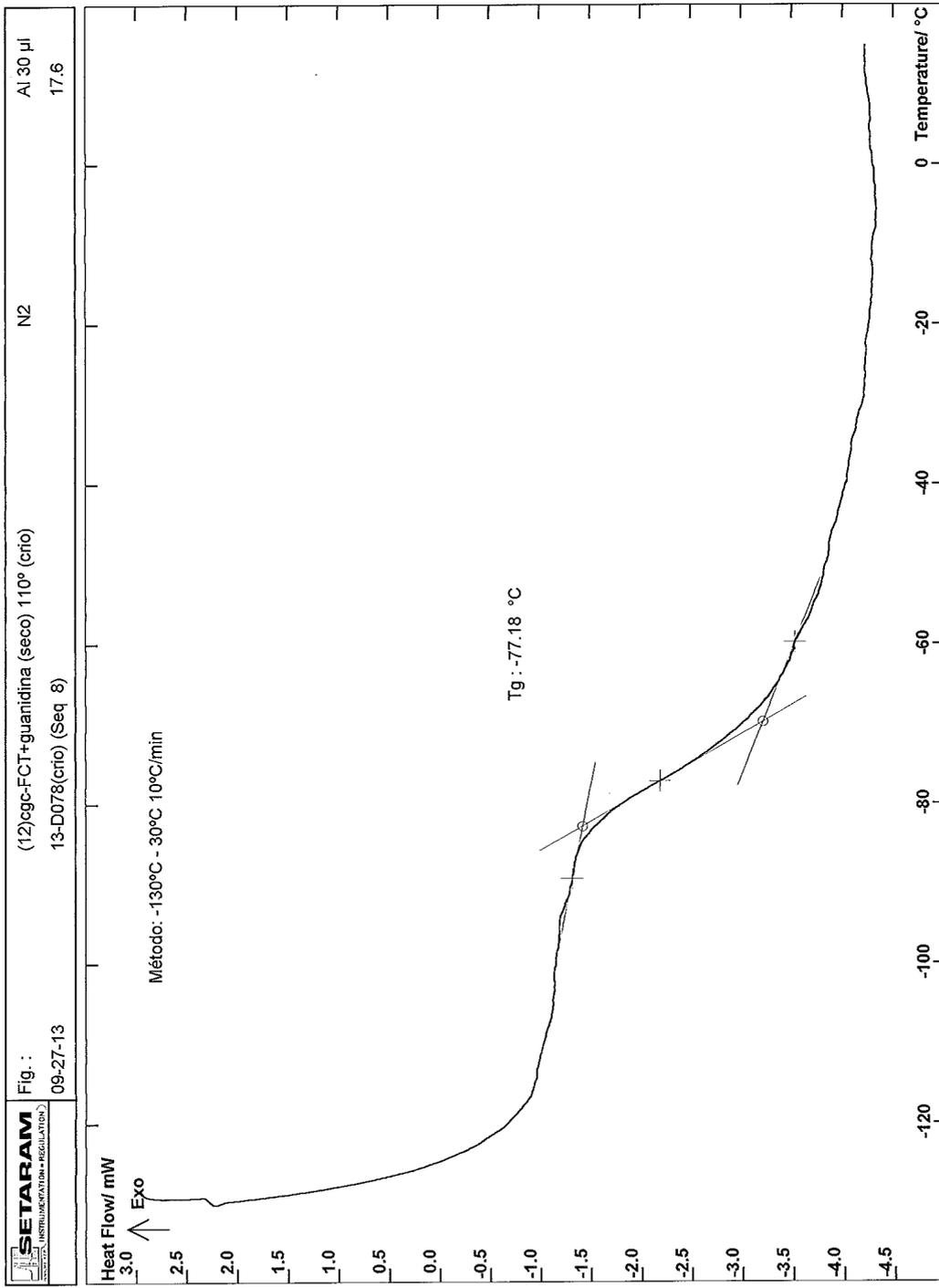


Figura 33. Filme CQG-FCT+Guanidina 110 °C.

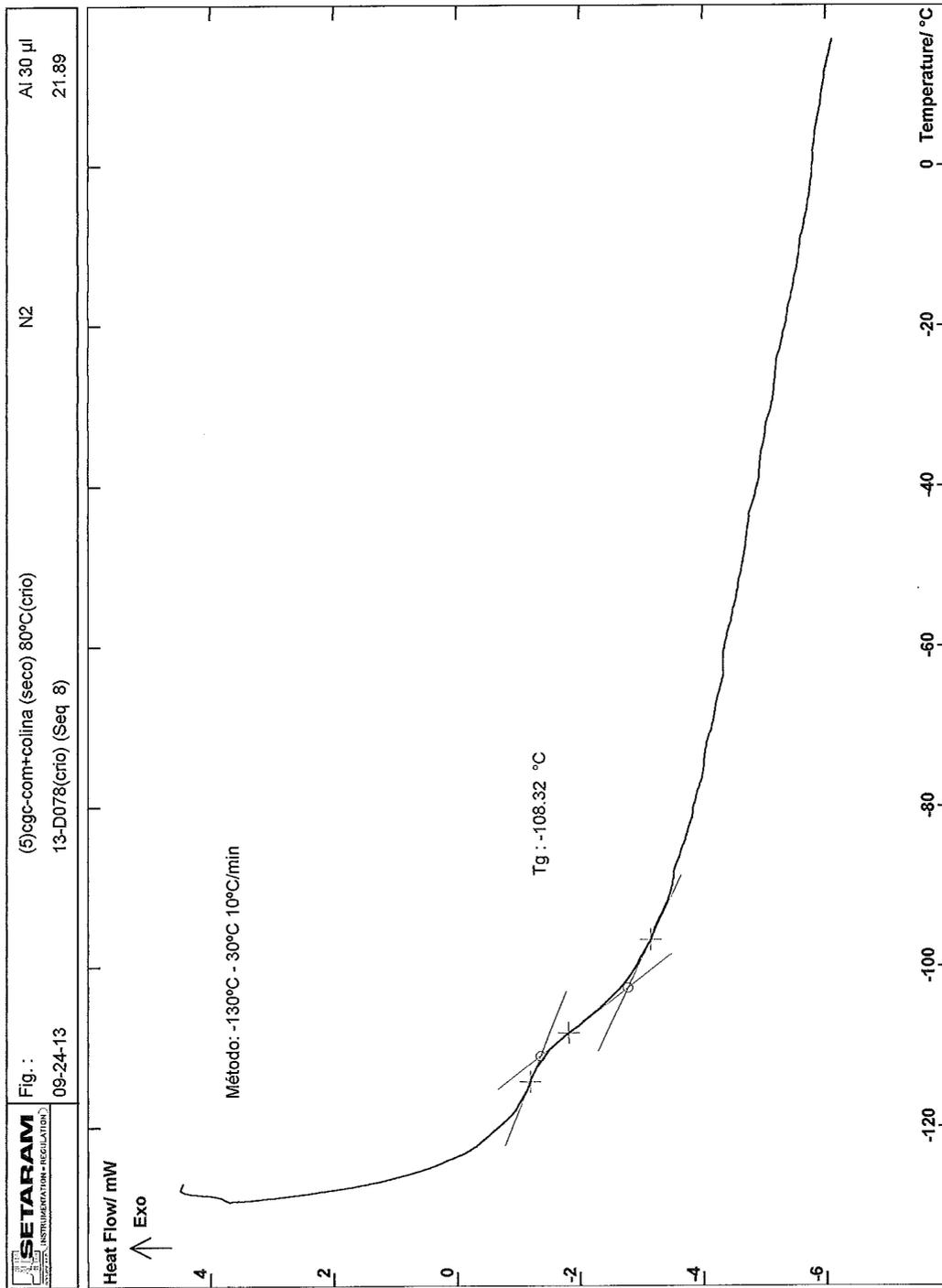


Figura 34. Filme CQG-Comercial+Colina 80 °C.

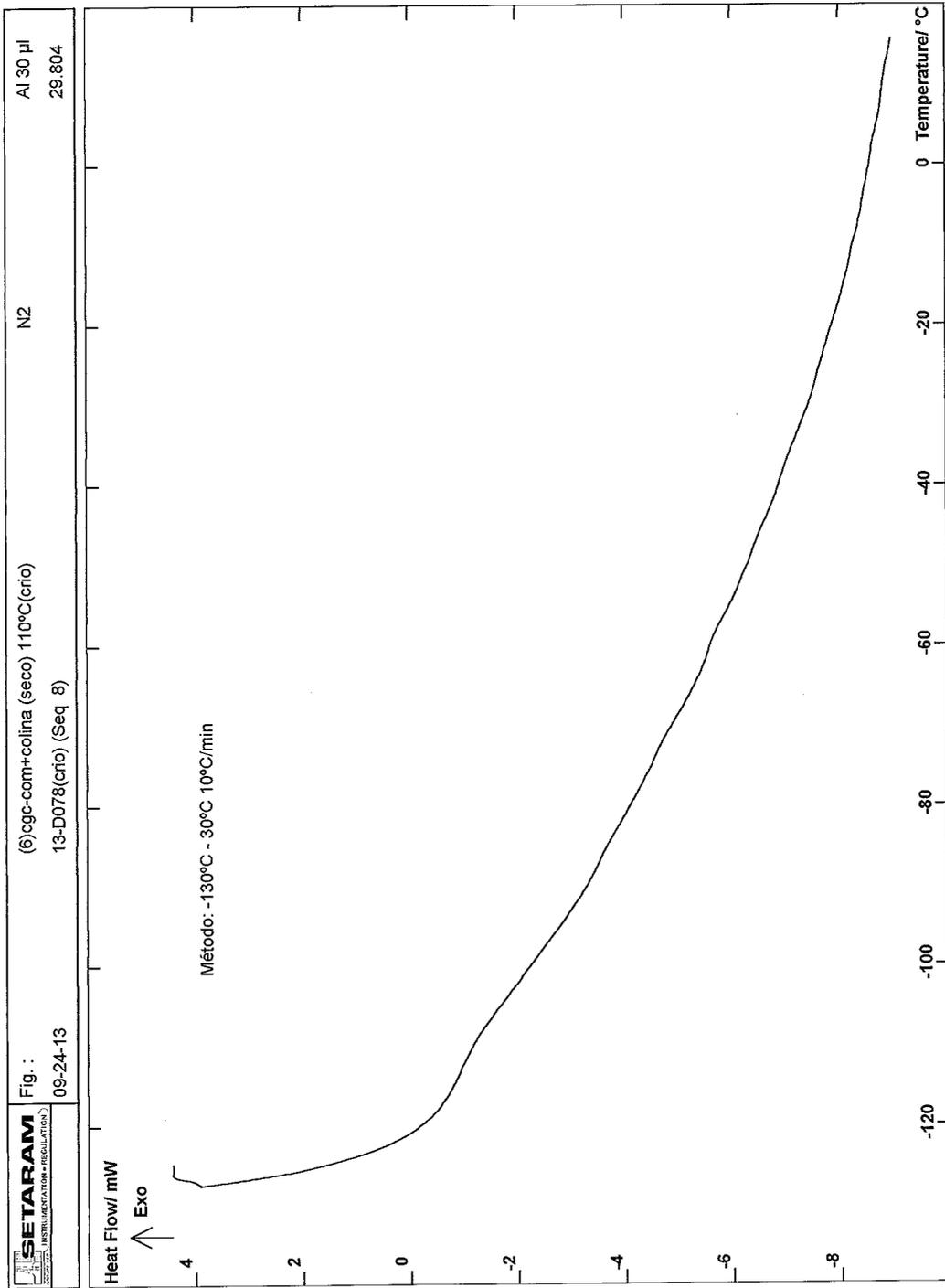


Figura 35. Filme CQG-Comercial+Colina 110 °C.

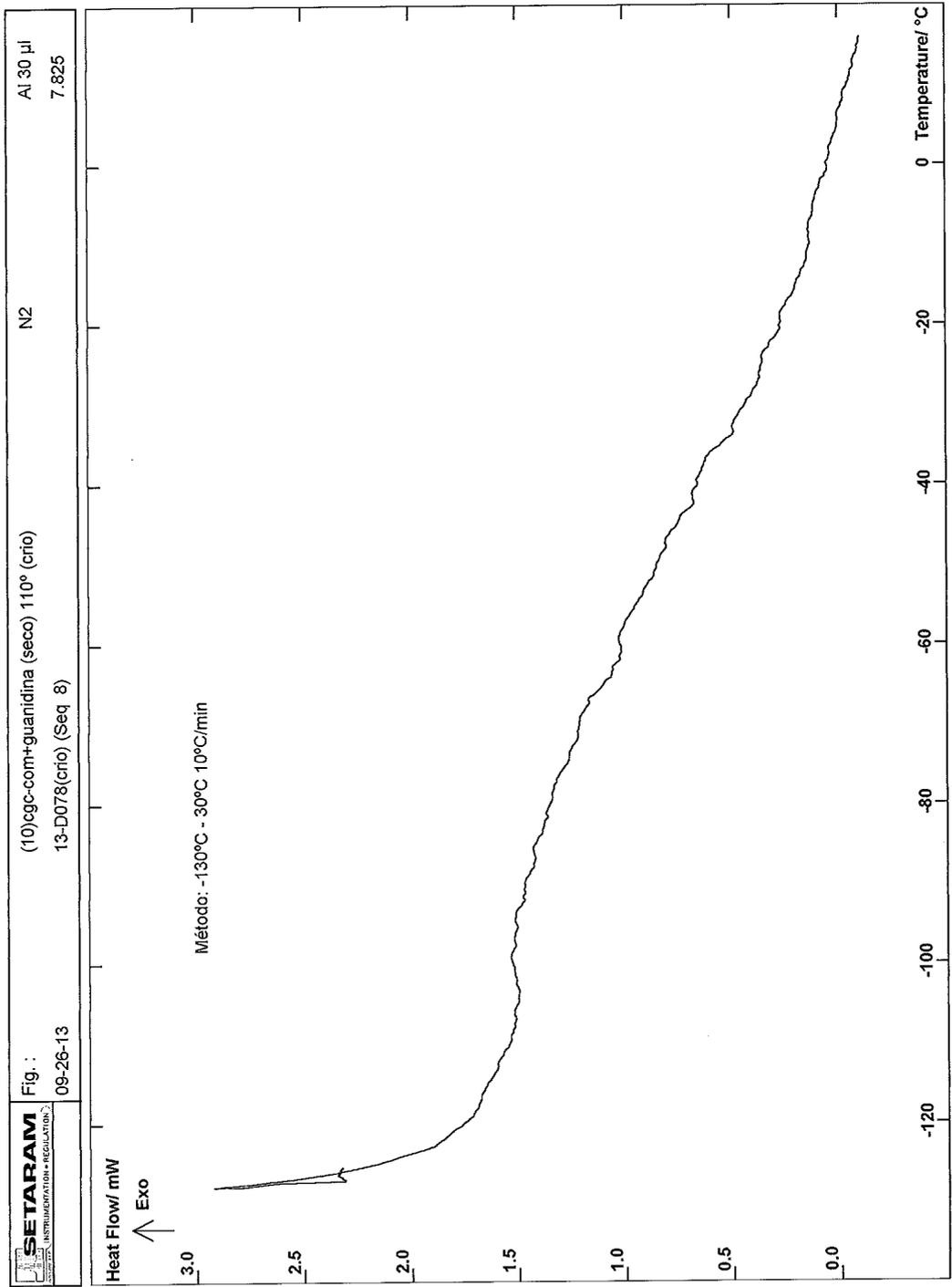


Figura 36. Filme CQG-Comercial+Guanidina 110 °C.