

Duarte Vairinhos Marinho

**Desenvolvimento e caracterização de
hidrogéis físicos e químicos a partir de
polissacarídeos naturais**



Universidade do Algarve
Faculdade de Ciências e Tecnologia

2016

Duarte Vairinhos Marinho

**Desenvolvimento e caracterização de
hidrogéis físicos e químicos a partir de
polissacarídeos naturais**

Dissertação de Mestrado Integrado em Engenharia Biológica

Trabalho efetuado sob a orientação de:

Professora Doutora Anabela Romano

Coorientação de:

Doutor Bruno Medronho



Universidade do Algarve

Faculdade de Ciências e Tecnologia

2016

Desenvolvimento e caracterização de hidrogéis físicos e químicos a partir de polissacarídeos naturais

Declaração de autoria de trabalho

“Declaro ser o autor deste trabalho, que é original e inédito. Autores e trabalhos consultados estão devidamente citados no texto e constam da listagem de referências incluída.”

(Duarte Vairinhos Marinho)

Copyright © Duarte Vairinhos Marinho

“A Universidade do Algarve reserva para si o direito, em conformidade com o disposto no Código do Direito de Autor e dos Direitos Conexos, de arquivar, reproduzir e publicar a obra, independentemente do meio utilizado, bem como de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição para fins meramente educacionais ou de investigação e não comerciais, conquanto seja dado o devido crédito ao autor e editor respetivos.”

À memória do meu avô.

Agradecimentos

Gostaria de começar por agradecer aos meus orientadores, Doutor Bruno Medronho e Professora Doutora Anabela Romano, muito obrigado pelo conhecimento transmitido, pela disponibilidade, pela compreensão e apoio.

Obrigado aos colaboradores do laboratório de Biotecnologia Vegetal da Universidade do Algarve, muito em especial ao Hugo Duarte, pela ótima experiência de trabalho em equipa.

Agradeço à minha namorada, aos meus amigos e familiares, principalmente pais e avós, que me incentivaram nos momentos mais difíceis e, de forma direta ou indireta, contribuíram para a minha formação e me apoiaram durante este percurso.

Por último, mas não menos importante, agradeço à Versus Tuna - Tuna Académica da Universidade do Algarve pelos momentos de amizade e companheirismo.

Abreviaturas e símbolos

AGU	β -D-glucopirranose
CC	Carbamato de celulose
CED	Cuproetilenodiamina
CN	Celulose nativa
D	Velocidade de corte
DP	Grau de polimerização
FTIR	Espectroscopia no infravermelho por transformadas de Fourier
IV	Infravermelho
m/z	Razão entre massa e carga
MS	Espectroscopia de massa
OH	Hidroxilo
Pa	Unidade de pressão Pascal
pK _a	$-\log(\text{Constante de acidez})$
SEM	Microscopia eletrónica de varrimento
TBAOH	Hidróxido de tetrabutílamónio
UV	Ultravioleta
v	Velocidade de fluxo
α -CD	α -Ciclodextrina
β -CD	β -Ciclodextrina
η	Viscosidade
$[\eta]$ ou $[\eta]\phi$	Viscosidade intrínseca
η ratio	Proporção de viscosidade
η_0	Viscosidade do meio na ausência de soluto
ρ	Concentração do polímero
τ	Tensão de corte

Resumo

A celulose e o quitosano, este último resultante da desacetilação da quitina, são biopolímeros vastamente disponíveis com propriedades únicas tais como biocompatibilidade e biodegradabilidade. Ambos os biopolímeros são polissacarídeos anfifílicos utilizados na síntese de hidrogéis e são capazes de reter ou libertar compostos na sua matriz, consoante as características do meio onde se encontram. Estes biopolímeros têm características gerais muito apelativas para serem usados como invólucros biológicos de células, moléculas e micro-organismos.

Neste trabalho desenvolveram-se estudos laboratoriais em duas etapas. A primeira é relativa à criação de um intermediário solúvel de celulose, o carbamato de celulose, capaz de substituir o método tradicional da viscose, através do processo “CarbaCell”. Este processo é potencialmente mais amigo do ambiente comparativamente à viscose, sem requerer a utilização de equipamentos muito especializados. Este intermediário solúvel da celulose foi obtido com sucesso, após adaptações e alterações ao protocolo, sendo analisado e caracterizado com recurso a técnicas de reologia e de FTIR. A segunda etapa teve como objetivo a obtenção de géis físicos e químicos através do uso de *cross-linkers* (agentes reticulantes) naturais tais como a genipina. Esta molécula é um agente natural reticulante menos citotóxico que os agentes reticulantes mais comuns. A formação de géis físicos e químicos com celulose e quitosano foram avaliados e caracterizados físico-quimicamente através de microscopia eletrónica, termo gravimetria, FTIR, testes de *swelling* (turgescência) e comportamento reológico. O efeito da temperatura, da concentração de genipina e quitosano na cinética de gelificação do hidrogel foi determinada, sendo também avaliado o efeito da adição de ciclodextrinas na cinética de formação dos hidrogéis químicos.

O aumento das concentrações de quitosano e genipina resultou num incremento da cinética de gelificação bem como da reticulação. A adição de β -ciclodextrina traduziu-se num aumento do tempo de gelificação. Quanto à turgescência, o aumento de volume foi mais rápido quando o pH do meio era mais ácido.

Palavras-chave: hidrogéis, biopolímeros, celulose, quitosano, agentes reticulantes naturais.

Abstract

Cellulose and chitosan (deacetylated product of chitin) are abundantly available biopolymers with unique properties such as biocompatibility and biodegradability. Both biopolymers are amphiphilic polysaccharides which form hydrogels and undergo swelling depending on the environment characteristics. Therefore, these biopolymers present global appealing characteristics to be used, for instance, as a bio-carrier of ions, molecules or microorganisms.

In this work, studies were developed in two stages. The first concerns the synthesis of a soluble cellulose intermediate, the cellulose carbamate, which is expected to replace the traditional method of viscose, through the the so called "CarbaCell" process. This process is potentially environmentally friendly without requiring the use of highly specialized equipment. The soluble cellulose intermediate formed was successfully obtained, after adaptations and modifications to the protocol, being analyzed and characterized using rheology techniques and FTIR. In the second stage physical and chemical gels (cross-linked) were proposed to be obtained through the use of natural cross-linkers such as genipin. This molecule is a natural cross-linking agent less cytotoxic than common cross-linking agents and thought to give a semi-interpenetrating polymeric network (semi-IPN) within the developed hydrogel system. The formation of physical and chemical gels with modified cellulose and chitosan were evaluated and characterized physicochemically by, electron microscopy, thermal gravimetry, FTIR and rheology. The effect of temperature and genipin and chitosan concentrations on the kinetics of gelation of the hydrogels was evaluated. Moreover, the effect of cyclodextrins on the kinetics of gelation of chemical hydrogels was studied.

Increasing concentrations of genipin and chitosan resulted in increased gelation kinetics and crosslink. The addition of β -cyclodextrin resulted into an increased gelation time. Regarding the swelling, the volume increase was faster when the pH of the medium was more acidic.

Keywords: hidrogels, biopolymers, cellulose, chitosan, natural cross-linkers.

Índice

1. Introdução	1
1.1. Polímeros	1
1.1.1. Polímeros naturais	4
1.2. Polissacarídeos	6
1.3. Celulose	8
1.3.1 Dissolução	16
1.4. Quitina e quitosano	20
1.5. Hidrogéis.....	23
1.6. Objetivos	25
2. Materiais e métodos.....	26
2.1. Reagentes	26
2.2. Procedimento experimental	27
2.2.1. Síntese de carbamato de celulose	27
2.2.2. Síntese de hidrogéis.....	29
2.3. Técnicas de caracterização	30
2.3.1. Reologia: conceitos	30
2.3.2. Reómetro	32
2.3.3. Viscosímetro capilar.....	33
2.3.4. Espectrometria UV/visível: conceitos.....	35
2.3.5. Taxa de turgescência: conceitos	36
2.3.6. Outros métodos de análise	37
2.3.6.1. Espectroscopia de infravermelhos por transformada de Fourier (FTIR) 37	
2.3.6.2. Microscopia eletrônica de varrimento (SEM)	38
3. Resultados e discussão	41
3.1. Carbamato de celulose	41
3.1.1. Fase inicial: protocolo “CarbaCell”	42
3.1.1.1. Grau de polimerização: fase inicial	42
3.1.1.2. Análise FTIR: fase inicial.....	43
3.1.2. Fase final: protocolo “CarbaCell” adaptado.....	44
3.1.2.1. Grau de polimerização: fase final.....	44
3.1.2.2. Análise FTIR: fase final	45

3.1.2.3. Análise reológica	48
3.1.2.4. Energia de ativação.....	50
3.2. Hidrogéis.....	53
3.2.1. Hidrogéis de carbamato de celulose.....	53
3.2.2. Hidrogéis de quitosano.....	54
3.2.2.1. Análise reológica dos hidrogéis de quitosano	55
3.2.2.2. Análise de espectrometria UV/visível	60
3.2.2.3. Adição de α ou β -ciclodextrina	65
3.2.2.4. Análise SEM.....	67
3.2.2.5. Análise da turgescência das amostras.....	69
4. Conclusões.....	76
Bibliografia.....	78

Índice de figuras

Figura 1 - Disposição espacial de monómeros em homopolímeros e copolímeros.....	2
Figura 2 - Estruturas poliméricas de conformação linear e tridimensional.	3
Figura 3 - Representação de um polímero semicristalino com regiões amorfas e cristalinas.....	3
Figura 4 - Representação da D-glucose (adaptado da referência [13]).	6
Figura 5 - Homopolissacarídeos e heteropolissacarídeos (adaptado da referência [12]).	7
Figura 6 - Estrutura da parede celular de uma fibra de madeira. L representa o lúmen, rodeado pela parede celular terciária (PT), PSI, PSM e PS dizem respeito à parede celular secundária interna, à sua camada média e externa, respetivamente, P1 representa a parede celular primária e LM refere-se à lamela média. (adaptada da referência [16]).	9
Figura 7 - Esquema de uma madeira latifoliada (A) e conífera (B). Micrografia de uma secção transversal de um tronco de uma madeira latifoliada (C) e conífera (D). Barras de escala com comprimento de 300 µm (adaptado da referência [15]).	9
Figura 8 - Representação esquemática simplificada de uma célula vegetal (adaptado da referência [20]).	10
Figura 9 - Representação das proteínas CESA (adaptado da referência [21]).	11
Figura 10 - Representação da estrutura molecular da celulose, subunidade de celobiose e AGU (adaptado da referência [17]).	12
Figura 11 - Arranjo da cadeia de celulose, vista de topo e lateral (adaptado da referência [18]).	12
Figura 12 - Esquema das pontes de hidrogénio inter e intramoleculares na celulose (adaptado da referência [22]).	13
Figura 13 - Interconversão dos diferentes polimorfos de celulose (adaptado da referência [25]).	14
Figura 14 - Modelos da estrutura supramolecular das microfibrilas de celulose (adaptado da referência [17]).	15
Figura 15 - Diferentes níveis hierárquicos da celulose, desde a cadeia polimérica até á árvore (adaptado da referência [28]).	16

Figura 16 - Esquema da reação de síntese do carbamato de celulose, pelo método “CarbaCell”.	19
Figura 17 - Representação esquemática das cadeias poliméricas das diferentes estruturas da quitina.	21
Figura 18 - Reação de desacetilação da quitina em quitosano (adaptado da referência [53]).	22
Figura 19 - Métodos de preparação de hidrogéis (adaptado da referência [58]).	24
Figura 20 – Diagrama de fluxo da síntese de carbamato de celulose.	28
Figura 21 - Carbamato de celulose (obtido com 5 minutos de irradiação a 250 W).	28
Figura 22 - Diagrama de fluxo da síntese de hidrogéis à base de quitosano (adição de ácido acético, de quitosano e de genipina).	29
Figura 23 - Representação do comportamento de um fluido entre 2 planos, quando aplicada uma tensão de corte (adaptado referencia [64]).	31
Figura 24 - Reómetro (sistema de cone-e-prato).	32
Figura 25 - Representação do viscosímetro capilar: tubo de ventilação (1), tubo com capilar (2), tubo de enchimento (3), esfera de entrada (4), marca temporal superior (5), esfera de medição (6), marca temporal inferior (7), capilar (8), esfera de nível (9) e reservatório (10).	33
Figura 26 - Componentes de um espectrómetro UV/Visível (adaptado da referencia [68]).	36
Figura 27 - Componentes de um sistema FTIR (adaptado da referencia [73]).	38
Figura 28 - Componentes de um microscópio SEM (adaptado da referencia [76]).	39
Figura 29 - Exemplo de uma micrografia de SEM (foto cedida pelo Dr. Luís Alves).	40
Figura 30 - Medição do DP para amostras sujeitas a solução de 30% de ureia, com potências de irradiação micro-ondas de 170 W, 285 W e 362 W. Amostras sujeitas a 1 minuto (círculo), a 3 minutos (triângulo) e a 5 minutos (quadrado), de irradiação. CN (losango).	42
Figura 31 - Imagem de FTIR, comparação entre CN (azul), celulose embebida em solução de ureia com agitação por 12 horas (cinzento), celulose embebida em solução de ureia durante a preparação das restantes amostras sendo a solução depois retirada (laranja), amostra sujeita a 3 minutos de irradiação micro-ondas a potência de 285 W (amarelo).	43

Figura 32 - Medição do DP para amostras sujeitas a solução de 20% de ureia, para potências de irradiação de 247, 285 e 362 W. Amostras sujeitas a 3 minutos (círculo), a 5 minutos (triângulo) e a 10 minutos (quadrado) de irradiação micro-ondas e CN (losango).	44
Figura 33 - Imagem de FTIR, comparação entre CN (cinzento), celulose embebida em solução de ureia de “20%” com agitação por 12 horas (azul) e amostra embebida em solução de ureia de “20%” com agitação por 12 horas sujeita a 5 minutos de irradiação micro-ondas a potência de 248 W (laranja).	45
Figura 34 - Imagem de FTIR, comparação entre CN (cinzento), celulose embebida em solução de ureia de “40%” com agitação por 12 horas (azul) e amostra embebida em solução de ureia de “40%” com agitação por 12 horas sujeita a 5 minutos de irradiação micro-ondas a potência de 248 W (laranja).	46
Figura 35 - Imagem de FTIR, comparação entre CN (cinzento), amostra embebida em solução de ureia de “20%” com agitação por 12 horas e sujeita a 5 minutos de irradiação micro-ondas a potência de 248 W (laranja) e amostra embebida em solução de ureia de “40%” com agitação por 12 horas e sujeita a 5 minutos de irradiação micro-ondas a potência de 248 W (vermelho).	47
Figura 36 - Teste rotacional com variação de temperatura para amostra com 0,5% de CC dissolvido em TBAOH, utilizando uma solução de 20% de ureia no processo de transformação de CN em CC. Amostra sem exposição a radiação micro-ondas (azul), amostra sujeita a 247 W (laranja), amostra sujeita a 285 W (cinzento), amostra sujeita a 360 W (amarelo).	48
Figura 37 - Teste rotacional com variação de temperatura para amostra com 0,5% de CC dissolvido em TBAOH, utilizando uma solução de 40% de ureia no processo de transformação de CN em CC. Amostra sem exposição a radiação micro-ondas (azul), amostra sujeita a 247 W (laranja), amostra sujeita a 285 W (cinzento), amostra sujeita a 360 W (amarelo).	49
Figura 38 - Logaritmo de base natural da viscosidade em função do inverso da temperatura. Teste rotacional com variação de temperatura para amostra com 0,5% de CC dissolvido em TBAOH, utilizando uma solução de 20% de ureia no processo de transformação de CN em CC. Amostra sem exposição a radiação micro-ondas (azul), amostra sujeita a 247 W (laranja), amostra sujeita a 285 W (cinzento), amostra sujeita a 360 W (amarelo).	51
Figura 39 - Logaritmo de base natural da viscosidade em função do inverso da temperatura. Teste rotacional com variação de temperatura para amostra com 0,5% de CC dissolvido em TBAOH, utilizando uma solução de 40% de ureia no processo de transformação de CN em CC. Amostra sem exposição a radiação micro-ondas (azul), amostra sujeita a 247 W (laranja), amostra sujeita a 285 W (cinzento), amostra sujeita a 360 W (amarelo).	52

Figura 40 - Variação da energia de ativação em função da potência de irradiação das amostras durante 5 minutos, para amostras dissolvidas em TBAOH com 0,5% de CC dissolvido. Amostra transformada com 40% de Ureia	52
Figura 41 - Análise por FTIR de amostras com 10% de CC, dissolvido em TBAOH, utilizando diferentes meios de gelificação: abordagem 1 (azul); abordagem 2 (cinzento); abordagem 3 (amarelo); abordagem 4 (laranja).	53
Figura 42 - Hidrogéis elaborados com quitosano (2, 1,8, 1,5 e 1%) e genipina (0,1, 0,2 e 0,5%).	54
Figura 43 - Teste oscilatório de uma amostra com 2% de quitosano e 0,2% de genipina. G' em Pa (azul) G'' em Pa (laranja), δ em graus (cinzento).	55
Figura 44 - Teste oscilatório de uma amostra com 2% de quitosano de baixo peso molecular e 0,2% de genipina. G' em Pa (azul) G'' em Pa (laranja), δ em graus (cinzento).	56
Figura 45 - Teste oscilatório de uma amostra com 2% de quitosano de peso molecular médio e 0,2% de genipina. G' em Pa (azul) G'' em Pa (laranja), δ em graus (cinzento).	57
Figura 46 - Teste oscilatório de uma amostra com 2% de quitosano “Coarse ground flakes and powder” e 0,2% de genipina. G' em Pa (azul) G'' em Pa (laranja), δ em graus (cinzento).	58
Figura 47 - Análise comparativa do tempo de gelificação em função da concentração de quitosano utilizado na preparação da amostra. Amostra com 0,2% de genipina (azul), amostra com 0,1% de genipina (cinzento), amostra com 0,05% de genipina (laranja).	59
Figura 48 - Análise comparativa do tempo de gelificação em função da concentração de genipina utilizado na preparação da amostra. Amostra com 2% de quitosano (azul), amostra com 1,8% de quitosano (laranja), amostra com 1,5% de quitosano (cinzento) e amostra com 1% de quitosano (amarelo).	60
Figura 49 - Variação do espectro de absorção de uma amostra 1,8% de quitosano e 0,1% de genipina, ao longo de 4 horas e 15 minutos, para um espectro compreendido ente 510 e 750 nm. Cada curva representa uma medição efetuada a cada 15 minutos, desde o início da reação.	61
Figura 50 - Variação do espectro de absorção de uma amostra 1,8% de quitosano e 0,1% de genipina, ao longo de 4 horas e 15 minutos, para um pico de 600 nm. Os pontos obtidos foram ajustados a uma equação polinomial de grau 4 ($y = -5 \cdot 10^{-10} x^4 - 2 \cdot 10^{-07} x^3 + 8 \cdot 10^{-07} x^2 - 0,0006x - 0,101$) e respetivo R^2 de 0,9998, tendendo para um máximo de absorção de 0,4.	62

Figura 51 - Variação do espectro de absorção de uma amostra 2,0% de quitosano e 0,1% de genipina, ao longo de 4 horas e 45 minutos, para um pico de 600 nm. Os pontos obtidos foram ajustados a uma equação polinomial de grau 4 ($y = 1 \cdot 10^{-11}x^5 - 9 \cdot 10^{-09}x^4 + 3 \cdot 10^{-06}x^3 - 0,0003x^2 + 0,011x - 0,2215$) e respetivo R^2 de 0,9981, tendendo para um máximo de absorção de 0,7.	63
Figura 52 - Variação do espectro de absorção de uma amostra 1,5% de quitosano e 0,1% de genipina, ao longo de 6 horas e 15 minutos, para um pico de 600 nm. Os pontos obtidos foram ajustados a uma equação polinomial de grau 4 ($y = 1 \cdot 10^{-10}x^4 - 9 \cdot 10^{-08}x^3 + 3 \cdot 10^{-05}x^2 - 0,0002x - 0,1513$) e respetivo R^2 de 0,9978, tendendo para um máximo de absorção de 0,6.	63
Figura 53 - Análise comparativa do tempo de gelificação em função da concentração de genipina utilizado na preparação da amostra. Amostra com 2% de quitosano (azul), amostra com 1,8% de quitosano (laranja), amostra com 1,5% de quitosano (cinzento) e amostra com 1% de quitosano (amarelo).	65
Figura 54 - Teste oscilatório de amostras com 2% de quitosano, 0,2% de Genipina e diferentes concentrações de β -CD, estando representada a variação de δ em graus em função do tempo de gelificação em segundos. Amostra sem β -CD (azul), amostra com 0,1% de β -CD (laranja), amostra com 0,2% de β -CD (verde), amostra com 0,4% de β -CD (cinzento), amostra com 1% de β -CD (amarelo).	66
Figura 55 - Teste oscilatório de amostras com 2% de quitosano, 0,2% de genipina e diferentes concentrações de α -CD, estando representada a variação de δ em graus em função do tempo de gelificação em segundos. Amostra sem α -CD (amarelo), amostra com 0,1% de α -CD (laranja), amostra com 0,2% de α -CD (azul), amostra com 0,4% de α -CD (cinzento).	67
Figura 56 - Imagem ampliada 500X da estrutura de um hidrogel com concentração de 1% de quitosano e 0,2% de genipina (foto cedida pelo Dr. Luís Alves).	68
Figura 57 - Imagem ampliada 500X da estrutura de um hidrogel com concentração de 2% de quitosano e 0,2% de genipina (foto cedida pelo Dr. Luís Alves).	68
Figura 58 - Imagem ampliada 500X da estrutura de um hidrogel com concentração de 2% de quitosano e 0,05% de genipina (foto cedida pelo Dr. Luís Alves).	69
Figura 59 - Suporte improvisado, constituído por goblé e filtro metálico de chá, para medição da turgescência dos hidrogéis.	70
Figura 60 - Análise da turgescência de uma amostra com 2% de quitosano, 0,2% de genipina e 0,1% de β -CD, passado 47 horas da adição de genipina, em meio com pH neutro.	71

Figura 61 - Análise da turgescência de uma amostra com 2% de quitosano, 0,2% de genipina e 0,1% de β -CD, passado 47 horas da adição de genipina, em meio com pH 5.	72
Figura 62 - Análise da turgescência de uma amostra com 2% de quitosano, 0,2% de genipina e 0,1% de β -CD, passado 65 horas da adição de genipina, em meio com pH neutro.	73
Figura 63 - Análise da turgescência de uma amostra com 2% de quitosano, 0,2% de genipina e 0,1% de β -CD, passado 65 horas da adição de genipina, em meio com pH 5.	74

Índice de tabelas

Tabela 1 - Comparação entre as amostras de quitosano e respectivos tempos de gelificação.....	58
Tabela 2 - Comparação entre a medição dos tempos de gelificação por técnicas de espectroscopia de UV/visível e Reologia.	64
Tabela 3 – Parâmetros obtidos dos modelos de ajuste dos pontos do swelling (turgescência) de hidrogéis.....	75

1. Introdução

1.1. Polímeros

Os polímeros são macromoléculas criadas pela aglomeração de pequenas subunidades. O nome advém das palavras gregas “*poli*”, que significa muitos e “*meros*”, que significa partes. Estas pequenas subunidades são conhecidas como monómeros, que derivam de estruturas com massa molecular relativa baixa. Para a formação de determinado polímero é necessário ocorrer uma reação de polimerização, que não é mais que a junção das várias subunidades estruturais (monómeros). Existem dois tipos de polímeros; os naturais e os sintéticos. A utilização de polímeros naturais já ocorre desde os tempos mais remotos, enquanto o uso de polímeros sintéticos é mais recente: o primeiro polímero a ser sintetizado foi a baquelite, em 1909 [1, 2].

Estes compostos têm características únicas que lhes conferem propriedades muito interessantes para o uso em indústria, tais como massa molecular relativamente elevada, resistência e viscoelasticidade, e uma tendência para formação de estruturas semicristalinas e cristalinas.

Na atualidade, o uso de polímeros naturais está mais associado a processos biológicos, enquanto que os polímeros sintetizados dominam a indústria química. Muitos dos compostos que nos rodeiam são constituídos por polímeros tais como fibras, plásticos, borrachas, vidros, material genético como o ácido desoxirribonucleico e ácido ribonucleico, compostos de revestimento como a celulose, no caso das plantas superiores e a quitina no caso do exosqueleto dos crustáceos [3, 4].

Quanto à estrutura, estes podem ser constituídos por um só tipo de monómero, sendo denominados por homopolímeros, ou por diferentes tipos de monómeros colocados de forma aleatória ou alternados, os chamados copolímeros (figura 1).

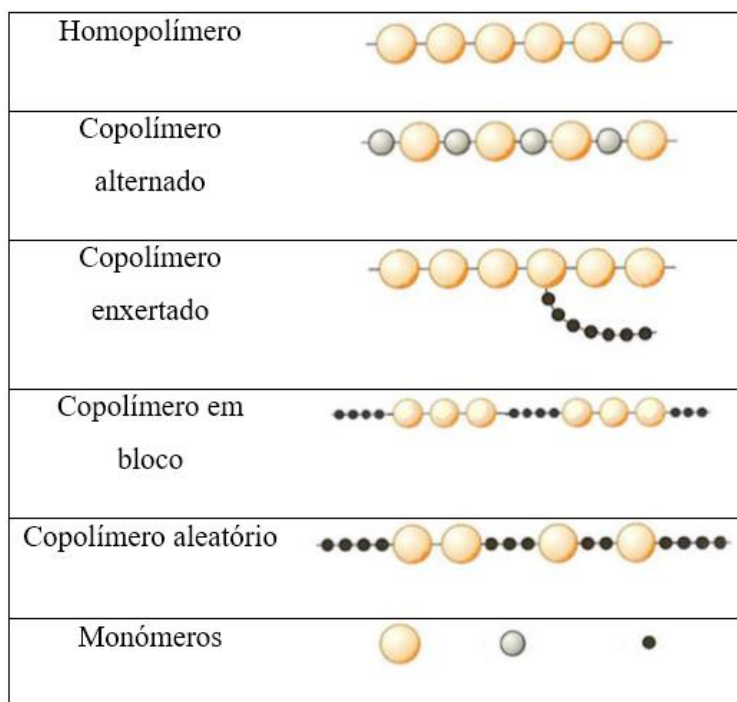


Figura 1 - Disposição espacial de monómeros em homopolímeros e copolímeros.

Os copolímeros podem ser divididos em várias classes consoante a distribuição dos diferentes monómeros na cadeia. Os copolímeros, que apresentam uma distribuição dos seus monómeros regulada pela reatividade e quantidade relativa de cada um usado na síntese do polímero, são designados de estatísticos. Por sua vez podem ser subdivididos em: aleatórios, ou seja, sem padrão definido dos monómeros ao longo da cadeia polimérica ou em bloco, formados por grandes aglomerados contínuos do mesmo monómero. Por último existem também os enxertados em que um tipo de monómero é usado na cadeia principal e outros em cadeias ramificadas. A introdução de diferentes unidades num polímero pode alterar as suas propriedades e o seu comportamento, no que toca à sensibilidade térmica, interação com solventes, etc.

A estrutura final do polímero pode adquirir uma conformação linear ou tridimensional (figura 2). No caso da estrutura linear, esta é simplesmente formada por monómeros bifuncionais. No caso da estrutura tridimensional, esta é organizada em rede por monómeros tri e tetrafuncionais, expandindo-se em todas as direções possibilitando ligações entre cadeias adjacentes. Este tipo de polímeros é conhecido por ter uma elevada estabilidade térmica e podem ser usados na produção de compostos termo-endurecíveis [2]. Devido às grandes dimensões dos polímeros, as interações intermoleculares que

proporcionam este tipo de estruturas são maioritariamente de Van der Waals e pontes de hidrogénio, com possibilidade de algumas ligações iónicas [3, 5].

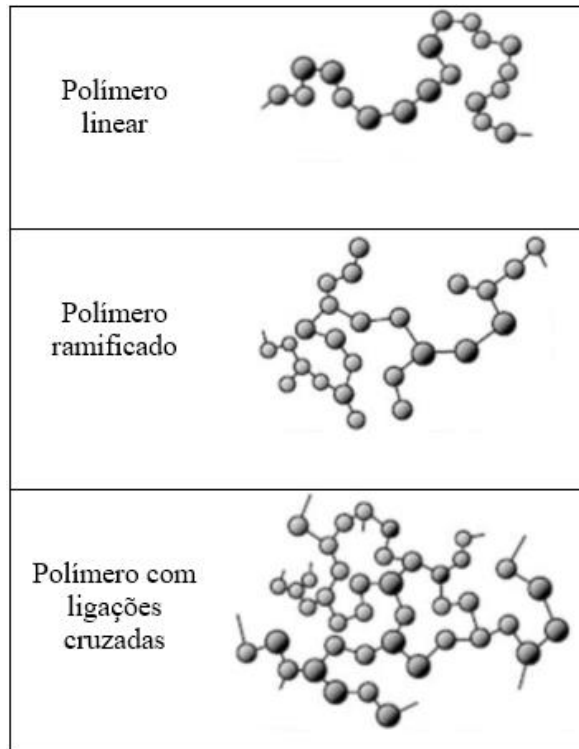


Figura 2 - Estruturas poliméricas de conformação linear e tridimensional.

Quanto à morfologia dos polímeros, dois tipos predominam: os polímeros amorfos e os semi-cristalinos. Os polímeros amorfos são molecularmente desordenados não havendo qualquer tipo de propriedade cristalina. No caso dos polímeros semi-cristalinos estes contêm partes cristalinas, com cadeias completamente ordenadas, dando origem a empacotamentos regulares, coexistindo com as regiões amorfas [2] (figura 3).

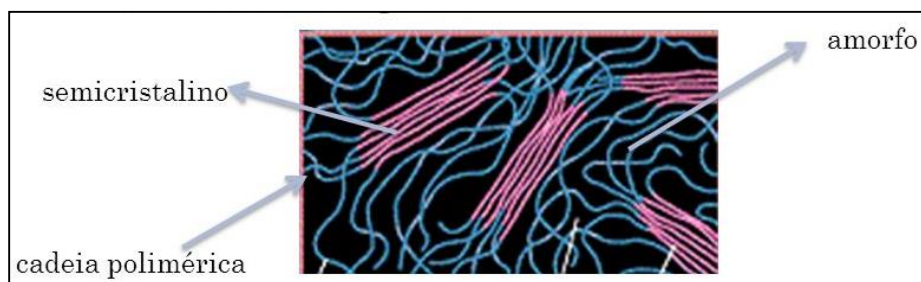


Figura 3 - Representação de um polímero semicristalino com regiões amorfas e cristalinas.

Os polímeros podem ser elastómeros, plásticos (rígidos ou flexíveis) ou fibrosos no que às suas propriedades mecânicas diz respeito:

- Os elastómeros contêm características semelhantes às borrachas, tais como as suas propriedades físico-químicas e mecânicas, destacando-se a capacidade destes materiais poderem sofrer deformações reversíveis sobre tensão. Contêm, no entanto, uma flexibilidade similar aos polímeros termo rígidos devido a sua estrutura molecular. Existem ainda alguns elastómeros termoplásticos que são extremamente flexíveis permitindo moldarem-se e serem reciclados [2]. São extremamente frágeis a temperaturas elevadas, ocorrendo degradação da sua estrutura molecular, mas quando sujeitos a baixas temperaturas tornam-se rígidos;

- A componente principal dos plásticos é constituída por polímeros orgânicos sintéticos em que, estando sólidos à temperatura ambiente no seu estado final, passam por fases durante o seu processo de fabrico em que se tornam fluidos devido a variações de pressão e temperatura, permitindo que sejam moldados, contrariamente aos elastómeros que sofrem muita deformação antes de se romperem. Por outro lado, os plásticos flexíveis são menos resistentes a deformações, mas mais resistentes à rutura;

- Os corpos fibrosos, ou fibras, têm um comprimento muito maior em relação às suas cadeias laterais, fazendo parte maioritariamente da sua constituição macromoléculas lineares orientadas de forma longitudinal. Elas são pouco resistentes quando são amassadas ou comprimidas [3, 5].

1.1.1. Polímeros naturais

A polimerização utilizando moléculas simples é o processo mais comum para a obtenção de polímeros sintéticos, podendo estes ser agrupados em polímeros de condensação ou polímeros de adição. Os polímeros de adição são resultado da junção de vários monómeros iguais, contendo em cada um deles pelo menos uma ligação dupla, que é perdida quando se ligam covalentemente. No caso dos polímeros de condensação, estes são formados através da adição de monómeros, podendo estes ser iguais ou diferentes, havendo libertação de pequenas moléculas no decorrer da reação, como a água. Produtos como os plásticos, colas e tintas, são exemplos das numerosas aplicações dos polímeros sintéticos [2, 3].

O presente trabalho enquadra-se no âmbito dos polímeros naturais ou biopolímeros. Na natureza existe uma quantidade enorme de polímeros, que supera vastamente os polímeros criados pelo homem, como os ácidos nucleicos, o amido, proteínas, celulose, entre outros.

Os biopolímeros são polímeros produzidos por organismos vivos. Existem três classes principais de biopolímeros, classificadas de acordo com as unidades monoméricas usadas e com a estrutura do biopolímero formado:

- Polinucleótidos; ácido desoxirribonucleico e ácido ribonucleico, que são compostos por polímeros longos com treze ou mais monómeros de nucleótidos;
- Polipéptidos; que são polímeros de aminoácidos;
- Polissacáridos; que são estruturas poliméricas de hidratos de carbono ligados [6-9].

Em relação ao impacto ambiental, os polissacarídeos são sustentáveis, não reativos e renováveis, visto que são extraídos principalmente de materiais vegetais que podem crescer indefinidamente. Contrariamente, o processo que ocorre nas indústrias de polímeros sintéticos, que usam derivados de produtos petroquímicos que eventualmente acabarão por se esgotar com o fim das reservas petrolíferas, apresenta características que poderão ser nefastas ao meio ambiente. O uso de biopolímeros em detrimento de polímeros sintéticos reduz substancialmente as emissões de dióxido de carbono (CO₂), pois quando este é libertado para a atmosfera pode ser reabsorvido por outras culturas, o que não acontece com as indústrias de polímeros sintéticos. Alguns destes biopolímeros são biodegradáveis por microrganismos, transformando-os em água e dióxido de carbono, sendo que grande parte dos não biodegradáveis podem ser sujeitos a compostagem, restando somente uma ínfima quantidade de biopolímeros que têm que ser destruídos com recurso a incineração e outros processos utilizados para a degradação de polímeros sintéticos [10, 11]. A consciencialização dos problemas ambientais, a preservação e preocupação pela sustentabilidade do planeta, faz com que os biopolímeros atraiam bastante atenção como materiais verdes e biocompatíveis que eventualmente irão substituir gradualmente os polímeros sintéticos em muitas aplicações.

1.2. Polissacarídeos

Os hidratos de carbono são as biomoléculas em maior quantidade no nosso planeta. Por ano é convertido, por meio de fotossíntese, mais de cem mil milhões de toneladas métricas de dióxido de carbono e água em celulose e outros produtos vegetais [12]. Os hidratos de carbono são, quimicamente, polihidroxiáldeídos, cetonas ou substâncias que produzem estes compostos por hidrólise. A maioria dos hidratos de carbono apresentam a sua forma empírica sob $(CH_2O)_n$, sendo que alguns podem conter grupos azotados, fosforosos ou sulfúricos. Os hidratos de carbono podem ser divididos em três grandes grupos: os monossacarídeos, os oligossacáridos e os polissacarídeos. Os monossacarídeos, ou açúcares simples, consistem simplesmente numa única unidade de hidrato de carbono, sendo que o mais abundante na natureza é a D-glucose, também referida por dextrose ou glucose (figura 4) [13]. Os monossacarídeos com mais de quatro carbonos tendem a formar estruturas cíclicas. Os oligossacáridos são pequenas cadeias de resíduos de monossacarídeos, unidos por ligações glicosídicas. Dentro dos oligossacáridos os mais abundantes são os que contêm dois ou mais resíduos de monossacarídeos [12].

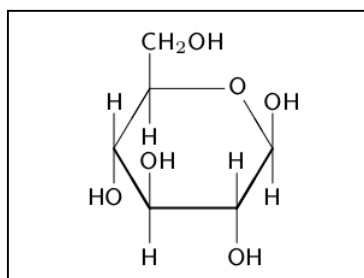


Figura 4 - Representação da D-glucose (adaptado da referência [13]).

Os polissacarídeos são polímeros de média ou elevada massa molecular. Podem também ser designados por glicanos, e diferem entre si nos tipos monómeros constituintes, no comprimento das cadeias, no tipo de ligações entre as unidades e no grau de ramificação [12].

Os homopolissacarídeos contêm apenas um tipo de monómeros enquanto os heteropolissacarídeos contêm dois ou mais tipos diferentes de polissacarídeos (figura 5). Alguns homopolissacarídeos servem como reservas de monossacarídeos que são

utilizados como energia, caso do amido e do glicogênio, sendo que outros servem de elementos de estrutura em células vegetais e exosqueletos em animais, caso da celulose e da quitina [12].

Os heteropolissacarídeos servem de suporte extracelular para organismos em todos os reinos. Por exemplo, a camada rígida do envelope das células bacterianas (o peptidoglicano) é composto em parte por um heteropolissacarídeo, construído por duas unidades monossacarídicas alternadas. Nos tecidos dos animais, o espaço extracelular é ocupado por vários tipos de heteropolissacarídeos que formam uma matriz que suporta o conjunto das células e confere proteção, forma e suporte às células, tecidos e órgãos. Ao contrário das proteínas, a maior parte dos polissacarídeos não têm peso molecular definido, sendo que esta diferença é uma consequência da junção dos dois tipos de polímeros. As proteínas são sintetizadas com base num modelo de mRNA de seqüências de comprimento definido, por enzimas que seguem exatamente este modelo [12]. No caso dos polissacarídeos não existe nenhum modelo, a não ser o programa de síntese intrínseco à enzima que catalisa a polimerização das unidades monoméricas, programa este que não inclui um ponto específico de término do processo de síntese.

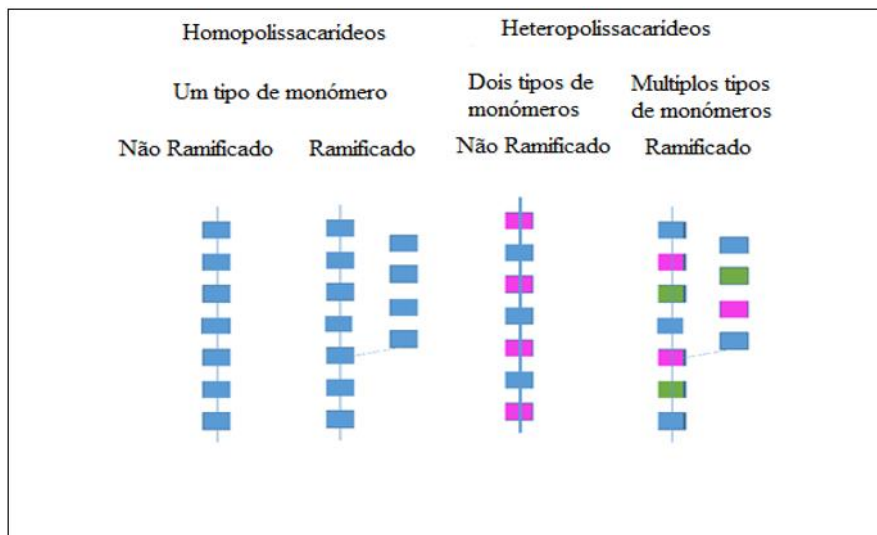


Figura 5 - Homopolissacarídeos e heteropolissacarídeos (adaptado da referência [12]).

1.3. Celulose

A celulose é um recurso natural quase inesgotável, estando presente em plantas superiores, algas, fungos, tunicados e como produto extracelular de algumas bactérias. Esta foi identificada em 1838 por Anselme Payen, um químico-físico francês, que a isolou a partir de matéria vegetal determinando por este meio a sua fórmula química $(C_6H_{10}O_5)_n$. Todavia já há muito tempo que este biopolímero era utilizado sob a forma de madeira, algodão e outras fibras naturais. Tem aplicações nas mais variadas áreas, quer na sua forma nativa, quer nos seus derivados, quer num âmbito mais tradicional na indústria farmacêutica e de materiais. Mais recentemente, no sector energético e de combustíveis, começou-se a utilizar produtos agroflorestais como a celulose, a hemicelulose e a lenhina, como fontes alternativas na produção de biocombustíveis e bioetanol, graças às suas propriedades de biomaterial renovável, biodegradável e de baixo impacto ambiental [14].

Os compostos presentes na parede celular das plantas são celulose, hemicelulose e lenhina variando a sua quantidade de acordo com a espécie entre 40-50%, 15-30% e 20-30%, respetivamente [15]. A sua estrutura apresenta ainda diversas camadas, estando estas organizadas do exterior para o interior em lamela média que permite a coesão entre as várias fibras, parede primária, parede secundária externa, parede secundária média, parede secundária interna, parede terciária e a cavidade central, o lúmen (Figura 6) [10]. A lamela média é constituída por lenhina e pectina, a parede primária contém hemicelulose e celulose, enquanto o conjunto da parede secundária engloba grande parte da celulose. As propriedades mecânicas são consequência da densidade da madeira e da forma das suas fibras e variam consoante a espécie. As madeiras das latifoliadas, caso do carvalho, são designadas de “madeiras duras” (A) e apresentam fibras curtas e empacotadas (C), enquanto as madeiras de coníferas, caso dos pinheiros e abetos, são designadas de “madeiras macias” (B) apresentando fibras longas (D), (figura 7) [15].

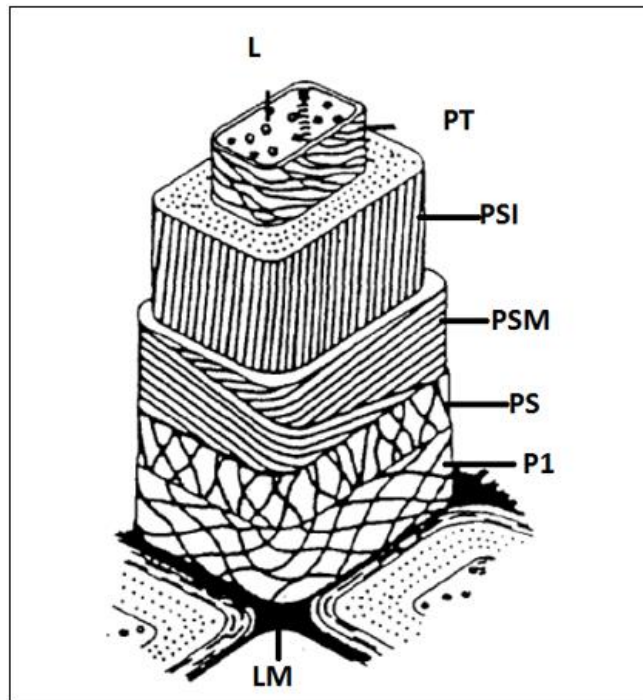


Figura 6 - Estrutura da parede celular de uma fibra de madeira. L representa o lúmen, rodeado pela parede celular terciária (PT), PSI, PSM e PS dizem respeito à parede celular secundária interna, à sua camada média e externa, respetivamente, P1 representa a parede celular primária e LM refere-se à lamela média. (adaptada da referência [16]).

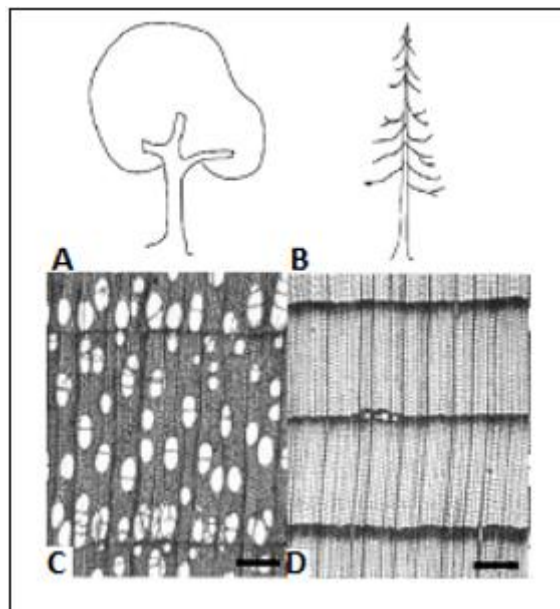


Figura 7 - Esquema de uma madeira latifoliada (A) e conífera (B). Micrografia de uma secção transversal de um tronco de uma madeira latifoliada (C) e conífera (D). Barras de escala com comprimento de 300 µm (adaptado da referência [15]).

No processo de fotossíntese, as moléculas de clorofila convertem a energia luminosa, a água e o dióxido de carbono em glicose. Uma parte da glicose produzida é processada nas mitocôndrias para produção de energia, enquanto outra é armazenada na parede celular em macromoléculas, hemicelulose, pectinas e celulose [17, 18]. As células vegetais (figura 8) sofrem um processo de diferenciação à medida que estas envelhecem segregando novos materiais, formando a parede celular secundária. A natureza desta parede depende somente do tipo de célula e do tecido a que esta pertence. As células completamente diferenciadas acabam, na maioria dos casos, por não se expandirem mais. [19].

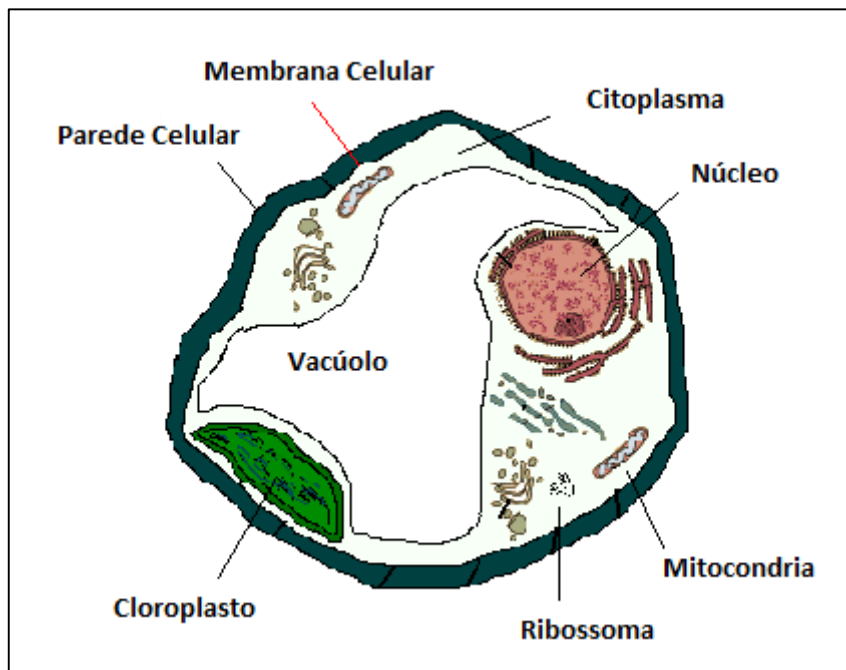


Figura 8 - Representação esquemática simplificada de uma célula vegetal (adaptado da referência [20]).

As células jovens têm uma estrutura rígida, necessária para contrariar a pressão da entrada de água na membrana plasmática (efeito turgescência) e ao mesmo tempo uma estrutura dinâmica o que permite que esta se deforme e expanda. Durante as fases finais de diferenciação das células são integrados outros tipos de polímeros como as já referenciadas lenhinas, contribuindo para o aumento da resistência mecânica e patogênica da parede celular[19].

Os genes *CESA*, responsáveis pela síntese da celulose foram identificados graças a investigações no campo da genética e biologia molecular, constituindo um grupo genómico com diferentes funções. No caso dos *CESA* 1, 3 e 6 estes são responsáveis pela síntese da parede celular primária, enquanto os *CESA* 4, 7 e 8 são responsáveis pela criação da parede celular secundária. As proteínas que estes genes codificam aglomeram-se em hexâmeros, denominando-se partículas *Rosette*, que se encontram na membrana plasmática, sendo cada uma das proteínas que são codificadas pelos genes *CESA* capaz de sintetizar uma única cadeia glicosídica [21] (figura 9).

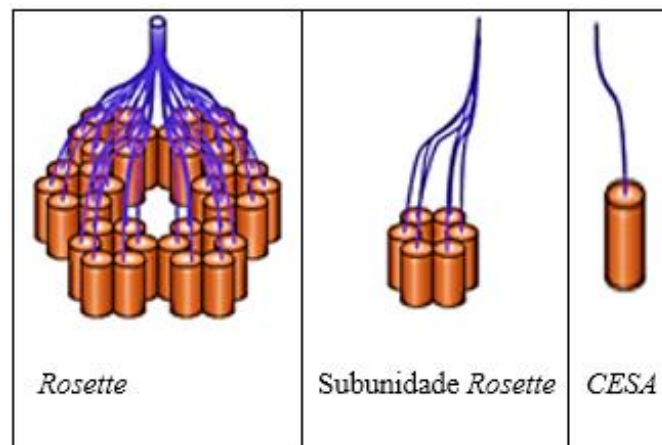


Figura 9 - Representação das proteínas CESA (adaptado da referência [21]).

Um polímero de celulose é constituído por moléculas de β -D-glucopiranosose (AGU) ligadas covalentemente entre si através dos carbonos C1 e C4 da AGU que o antecede, sendo que a este tipo de ligações se dá o nome de β -1,4-glicosídicas. As AGU's estão alternadas com uma rotação glicosídica de 180° em relação à anterior, sendo que a duas destas unidades AGU interligadas se dá o nome de celobiose (figura10).

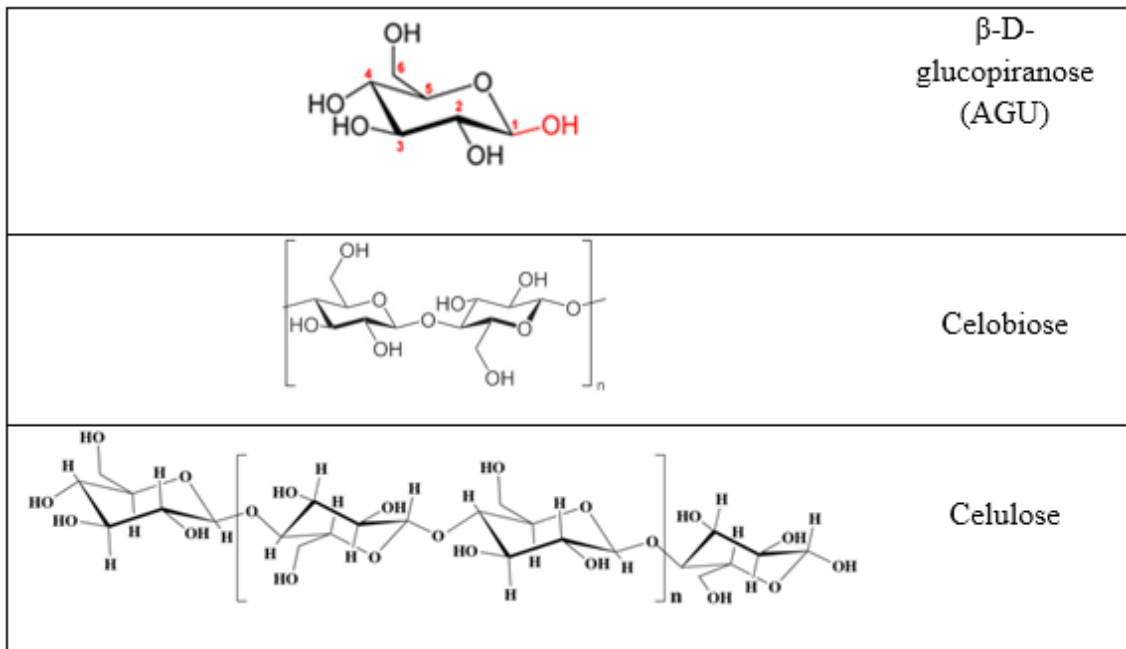


Figura 10 - Representação da estrutura molecular da celulose, subunidade de celobiose e AGU (adaptado da referência [17]).

As AGU presentes na cadeia de celulose obtêm uma conformação em cadeira 4C_1 no qual os grupos hidroxilo (OH) se encontram no plano equatorial enquanto os hidrogénios se encontram no plano axial, como mostra a figura 11 (com os átomos de oxigénio a vermelho, os átomos de carbono a cinzento escuro e os hidrogénios a cinzento claro) [22].

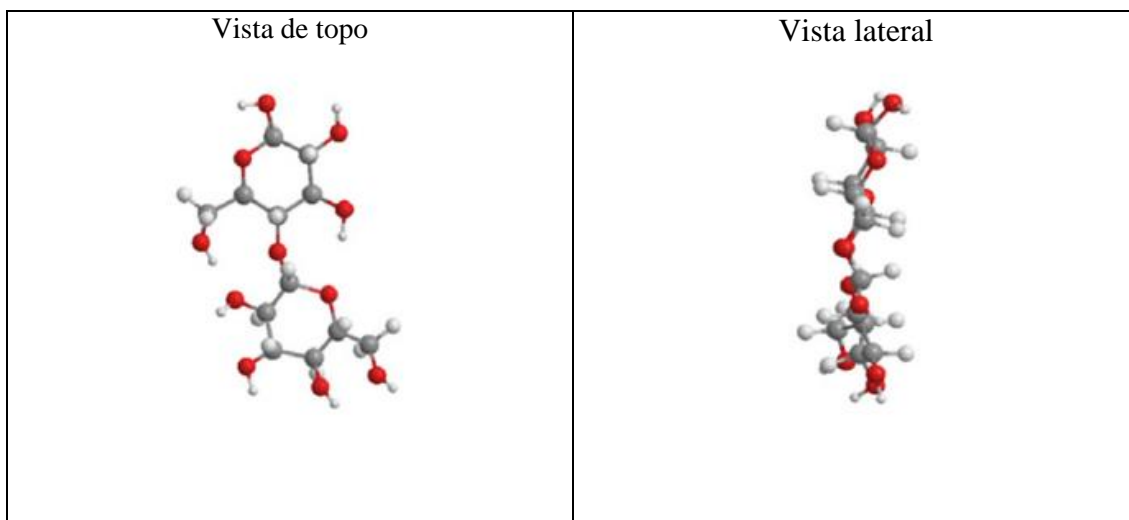


Figura 11 - Arranjo da cadeia de celulose, vista de topo e lateral (adaptado da referência [18]).

A celulose é, portanto, uma molécula anfifílica sendo que a sua estabilidade advém tanto das suas propriedades hidrofóbicas como hidrofílicas [23, 24]. Os grupos OH que se encontram nos extremos de uma molécula de celulose ostentam comportamentos inversos, sendo que na extremidade C1 o comportamento é redutor, fornecendo elétrons, na extremidade C4 o seu comportamento é oxidante tendendo a captar elétrons (figuras 10 e 11) [22]. Os grupos OH nos carbonos C2, C3 e C6, de cada AGU permitem que se estabeleça uma vasta teia de pontes de hidrogénio quer intramoleculares, que conferem rigidez a cadeia, quer intermoleculares facilitando a organização por camadas da celulose (figura 12). Estes grupos OH são também responsáveis por permitir modificar a celulose de várias maneiras, através de reações vulgarmente utilizadas em álcoois primários e secundários como as reações de esterificação [22].

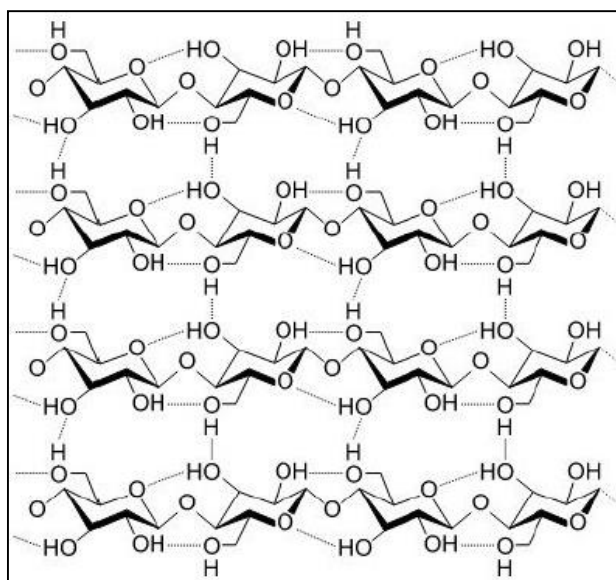


Figura 12 - Esquema das pontes de hidrogénio inter e intramoleculares na celulose (adaptado da referência [22]).

Quanto à estrutura supramolecular, as cadeias de celulose, devido ao balanço das interações moleculares, têm naturalmente uma grande tendência para formar agregados com diferentes níveis de organização e complexidade. Os agregados de maior ordem são as regiões cristalinas podendo estes arranjamem-se particularmente em diferentes formas: os cristais tipo I ($I\alpha$ e $I\beta$), II, III (III_I e III_{II}) e IV (IV_I e IV_{II}) [25, 26]. A organização cristalina tipo I é constituída pelas duas variantes $I\alpha$ e $I\beta$, em que a sua quantidade varia

consoante a fonte de onde é extraída a matéria-prima, estando a primeira presente maioritariamente em organismos primitivos como bactérias e a segunda em organismos mais desenvolvidos como plantas superiores, sendo que a segunda apresenta maior estabilidade termodinâmica. A organização cristalina tipo II, apresenta uma estrutura antiparalela, e é obtida a partir da primeira por regeneração ou por mercerização, um processo normalmente usado em fibras de algodão para conferir maior resistência e um aspeto mais lustroso. Comparativamente com a primeira é mais densa e estável devido a um maior número de pontes de hidrogénio quer inter como intramoleculares. O cristal tipo III resulta de um tratamento com amónia das estruturas I e II, sendo que a organização tipo IV é obtida por aquecimento da estrutura III (figura 13) [25].

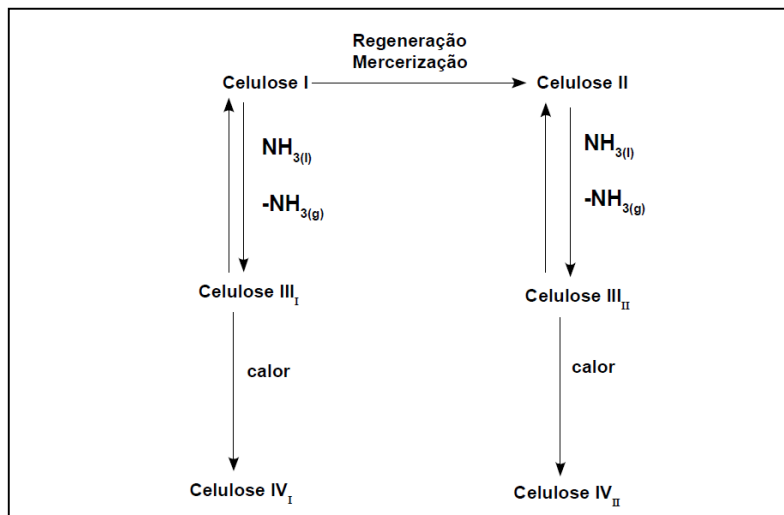


Figura 13 - Interconversão dos diferentes polimorfos de celulose (adaptado da referência [25]).

Como referido, o arranjo macromolecular nas fibras celulósicas não é uniforme apresentando zonas cristalinas e zonas amorfas. O modelo que é tipicamente aceite para descrever os arranjos supramoleculares da celulose é o chamado *fringed fibril model* [27]. A figura 14 ilustra este modelo em que os quadrados representam as regiões cristalinas e as linhas curvas, as zonas amorfas, de menor ordem estrutural [22].

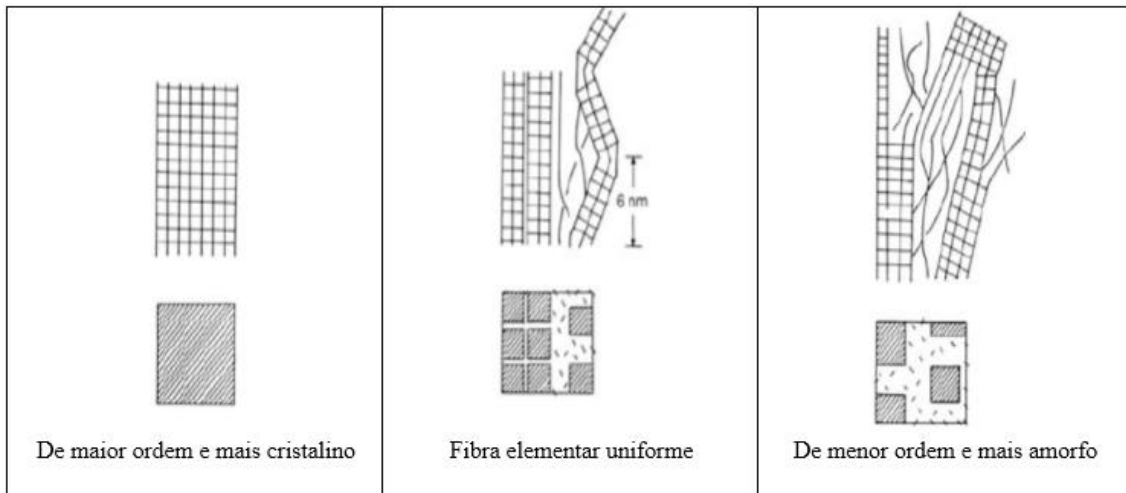


Figura 14 - Modelos da estrutura supramolecular das microfibrilas de celulose (adaptado da referência [17]).

A celulose molecular pode agrupar-se em microfibrilas com um diâmetro que varia entre 3 e 20 nm. As microfibrilas podem organizar-se em aglomerados, as macrofibrilas, através das interações anteriormente referidas formando fibrilas de maior dimensão, nunca ultrapassando um diâmetro com alguns micrómetros [22]. O conjunto das micro e macrofibrilas são as unidades estruturais da celulose utilizadas para a construção da parede celular, formando fibras de grandes dimensões através do sucessivo empacotamento das fibrilas. A celulose tem, portanto, uma estrutura altamente complexa e bem definida (figura 15) organizando-se hierarquicamente desde a unidade mais simples, a AGU, até à parede celular. Adicionalmente ainda temos outras moléculas como a lenhina e hemicelulose que tornam tal organização ainda mais complexa. Tal organização dificulta necessariamente a sua manipulação, nomeadamente o seu processo de dissolução, especialmente devido ao difícil acesso do solvente [28].

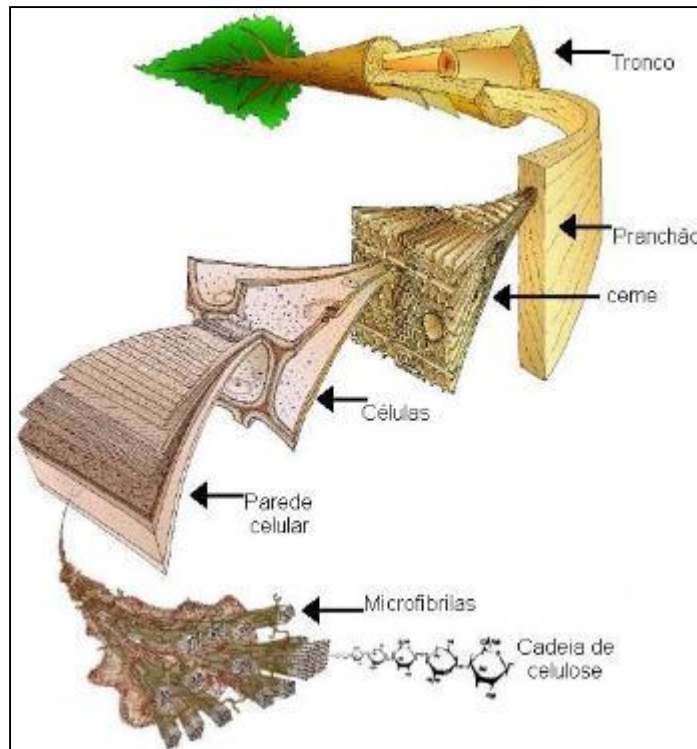


Figura 15 - Diferentes níveis hierárquicos da celulose, desde a cadeia polimérica até à árvore (adaptado da referência [28]).

1.3.1. Dissolução

A polpa ou pasta de celulose tem um elevado grau de pureza, entre 90 e 98%, complementada com vestígios de outros polímeros como lenhina e hemicelulose. É constituída maioritariamente por α -celulose, tendo uma reduzida distribuição molecular [29]. Esta matéria-prima é extremamente versátil, sendo usada também na produção de fibras têxteis (utilizando a tecnologia viscose, *rayon*), fibras para filtros, celulose microcristalina, utilizada nas indústrias farmacêuticas e de aditivos alimentares e nitrocelulose para tintas e explosivos [29].

Existem dois processos para a obtenção da polpa de celulose, o de *kraft* e o de sulfito ácido, sendo o primeiro o mais comum. Este divide-se em duas etapas distintas; uma pré-hidrólise para diminuir a hemicelulose e a cozedura de *kraft* para reduzir a lenhina [29]. Existem alternativas a estes processos, como é o caso do uso de diferentes tipos de solventes orgânicos, embora não sejam ainda utilizados à escala industrial.

A água é um líquido em que existem fortes ligações por pontes de hidrogénio. Quando estas ligações são quebradas a energia do sistema aumenta. Este é o caso dos

solutos incapazes de formar este tipo de ligações e que naturalmente também diminuem este tipo de interações na água, o que tem como consequência uma solubilidade baixa. De um modo geral, devido a constatação anterior, os solutos capazes de criar pontes de hidrogénio são solúveis em água. Como exemplo disso temos o caso da glicose, com uma solubilidade elevada de aproximadamente 2kg/L [30]. Quando a glicose é polimerizada as interações (entalpia) não é particularmente afetada, mas sim a entropia.

A causa da insolubilidade da celulose é atribuída pela maior parte da literatura às fortes pontes de hidrogénio, intra e intermoleculares, sendo negligenciadas, de forma geral, todas as outras interações. As características estruturais claramente anfífilas da celulose sugerem claramente que as interações hidrofóbicas são determinantes para racionalizar a (in)solubilidade da celulose. Estas interações hidrofóbicas contribuem para a estrutura cristalina da celulose e para a sua estabilidade. Com base em simulações moleculares, a energia livre de pequenos oligómeros no estado cristalino foi estimada e verificou-se que existe uma contribuição de cerca de 2 kcal/mol/resíduo para o emparelhamento hidrofóbico. Por outro lado, a estimativa da contribuição das pontes de hidrogénio para um hipotético estado cristalino foi aproximadamente oito vezes menor. Acresce ainda que a solubilidade também poderá ser afetada significativamente, mesmo em função de um ligeiro carácter anfílico, nos polímeros com grande peso molecular [24].

O balanço entre as diferentes interações moleculares tem que ser considerado na solubilidade da celulose, tendo em conta não apenas as interações água-hidrato de carbono, mas também as interações água-água e hidrato de carbono-hidrato de carbono. Para analisar as interações interatómicas recorre-se à mecânica quântica, pois os seus cálculos apresentam uma forma fidedigna de estimar a magnitude das interações. Considerando apenas um mecanismo assente em pontes de hidrogénio verifica-se que todas as interações têm aproximadamente 5 kcal/mol. O esperado seria que as interações celulose-celulose fossem maiores que as demais caso as pontes de hidrogénio fosse a única causa para explicar o padrão de solubilidade, o que não se verifica [31].

As ciclodextrinas são um exemplo de um homopolímero de glicose (como a celulose) cujo carácter anfílico está bem patente. As ciclodextrinas têm uma elevada solubilidade em água podendo ao mesmo tempo incorporar no seu interior moléculas menos polares. Isto demonstra que uma cadeia de anéis de glicose pode conter regiões com polaridade distinta. As características anfífilas da celulose são evidenciadas também por estudos de cristalografia e simulações computacionais [23]. Como já

referido, as glucopiranoses contêm três grupos hidroxilo localizados nas posições equatoriais do anel conferindo características hidrofílicas, sendo opostas pelo caráter hidrofóbico conferido pelas ligações carbono-hidrogênio no plano axial (ver figura 11) [32-34].

A celulose pode ser convertida em formas derivadas (acetais, éteres e esteres), em materiais regenerados (fibras, filmes, membranas e esponjas, entre outros). Contudo, a celulose ainda não atingiu o seu potencial total em aplicações, porque esta não pode ser fundida para obter uma forma desejada nem pode ser dissolvida num solvente comum como a água. Para ser possível dissolver a celulose é necessário um solvente capaz de quebrar as pontes de hidrogênio bem como enfraquecer as interações hidrofóbicas intermoleculares e destruir a estrutura supramolecular. De modo a que a dissolução seja total a celulose tem de estar dispersa ao nível molecular, no entanto, na maioria dos casos, isto não ocorre podendo encontrar-se vários agregados de moléculas estáveis em solução. De um modo geral o passo inicial da dissolução da celulose envolve a penetração do solvente na estrutura da celulose, resultando em alterações substanciais do volume e das propriedades físicas, permanecendo no entanto no estado sólido ou semi-sólido [35]. O processo de dissolução da celulose pode ser considerado uma reação ácido-base, para processos que não envolvam modificações químicas, sendo que a celulose pode adotar o papel de ácido ou de base. No caso da dissolução ocorrer em meio ácido, a celulose assume o papel de base e fica protonada, conferindo-lhe maior caráter hidrofílico. Quando a dissolução é em meio básico, a celulose assume o papel de ácido e ocorre a desprotonação, resultando no acréscimo do caráter hidrofóbico [35]. Os solventes podem ser agrupados em derivatizantes e não derivatizantes. No caso dos solventes derivatizantes a dissolução da celulose é feita através da formação de um intermediário solúvel, originado por modificações covalentes, sendo depois possível tratar o produto, após dissolução, e regenerar a celulose. Neste tipo de solventes podem, por vezes, ocorrer reações paralelas durante o processo de dissolução e formação de compostos desconhecidos e indesejados. Típicos exemplos de sistemas derivatizantes são o caso dos formatos de celulose, sintetizados a partir da reação de ácido fórmico com celulose, recorrendo também ao uso do ácido sulfúrico para catalisar a reação. Consoante o destino final os formatos (solúveis) podem, *à posteriori*, ser transformados noutros derivados de celulose. Dada a elevada solubilidade dos formatos em inúmeros solventes e reduzida ocorrência de reações paralelas com outros solventes, estes sistemas são atrativos como ponto de partida de produção de outros derivados de celulose. [36-38]. Contudo, a

abordagem que envolve solventes não derivatizantes é vantajosa não só pelo seu menor número de passos intermédios, mas também porque normalmente são processos mais rápido, simples e económicos, o que é desejável na maioria das aplicações. De um modo geral, o desafio na dissolução da celulose encontra-se na procura de um solvente que seja não derivatizante, não altere o grau de polimerização (DP) da celulose e que ao mesmo tempo não reaja com a celulose. [17, 37, 39].

Nas indústrias de celulose regenerada e de celofane, o processo de viscose tem desde há muito tempo ocupado a posição de liderança, embora este processo gere vários subprodutos perigosos para o meio ambiente. Ao longo dos anos, novos solventes para celulose e métodos inovadores foram desenvolvidos para reduzir os passos do processo, assim como para minimizar os subprodutos perigosos. O processo “CarbaCell” (figura 16), que mais adiante se detalha neste trabalho aquando da síntese e caracterização do intermediário carbamato de celulose (CC), é um método alternativo e mais amigo do ambiente sendo por isso um promissor para a substituição da viscose. Por outro lado, a maioria dos equipamentos convencionais utilizados numa fábrica de viscose podem ser adaptados para a síntese de carbamato [40].

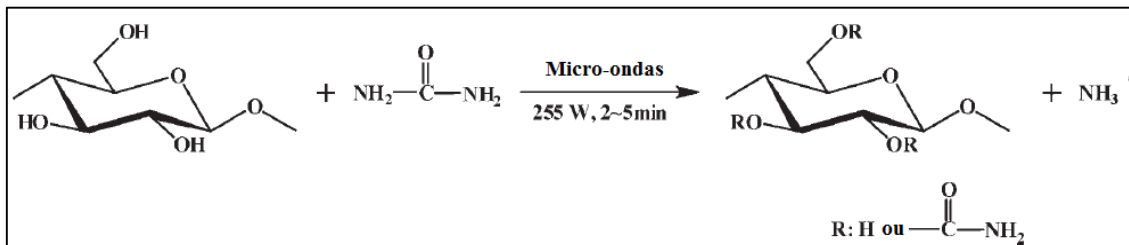


Figura 16 - Esquema da reação de síntese do carbamato de celulose, pelo método “CarbaCell”.

1.4. Quitina e quitosano

A quitina é o segundo polissacarídeo mais abundante na natureza, após a celulose, constituindo também o principal material dos exoesqueletos dos crustáceos e insetos, encontrando-se também na parede celular de certos fungos e microrganismos. Foi isolada pela primeira vez por Henri Braconnot em 1811 quando estudava as substâncias derivadas de fungos. Em 1823 Odier encontrou, em trabalhos com insetos, um tipo de substância semelhante a um componente estrutural das plantas (celulose). A essa nova substância identificada nos insetos, Odier deu o nome de quitina que significa, do grego, cobertura ou túnica [41-43].

A taxa de regeneração natural da quitina, é de cerca de $2,3 \times 10^9$ toneladas/ano, considerando apenas crustáceos [42]. Em todo o mundo são produzidos todos os anos milhares de toneladas de resíduos ricos em quitina, provenientes da indústria da pesca, aquicultura e indústria alimentar de processamento de crustáceos e moluscos. Estes resíduos contêm ainda proteínas, sais de cálcio e pigmentos. Em consequência disso, a extração da quitina envolve operações de desproteínização, desmineralização e de despigmentação. Para a desproteínização geralmente usam-se soluções alcalinas com temperaturas entre 65 a 100 °C. Para a desmineralização, faz-se a remoção do carbonato de cálcio e do fosfato de cálcio por tratamento com vários ácidos a diferentes concentrações. Para a despigmentação o tratamento faz-se normalmente com etanol ou acetona. Depois de isolada a quitina, definem-se parâmetros importantes como o grau de acetilação (GA) ou de desacetilação ($GD = 1 - GA$) [41, 44, 45].

A quitina é constituída por várias subunidades de 2-acetamido-2-desoxi-D-glucopiranosose, também referida por N-acetil-D-glucosamina (GlcNHAc), interligadas por ligações ($\beta(1 \rightarrow 4)$) glicosídicas. Esta estrutura é muito parecida com a da celulose, diferindo apenas no grupo hidroxilo do carbono 2 do anel de glucopiranosose, estando substituído por um grupo acetamida. A quitina não tem uma composição uniforme, atendendo a que é um produto natural, apresentando nas cadeias polissacarídicas diferenças no que respeita ao tamanho, percentagem de grupos acetamida e respetiva posição destes grupos ao longo das cadeias poliméricas. A única exceção conhecida é a quitina obtida a partir de algas diatomáceas, na qual todos os monómeros contêm o grupo acetil [41, 46].

Atendendo à sua origem e, de acordo com a disposição das cadeias que constituem o polímero, a quitina pode existir sob três formas diferentes (α , β e γ). Na α -quitina, a

disposição das cadeias poliméricas é antiparalela, na β -quitina a disposição é paralela e na γ -quitina a disposição é mista. A figura 17 esquematiza as estruturas da quitina (α , β e γ) representando as setas as cadeias poliméricas, no sentido do terminal não-redutor para o terminal redutor. A α -quitina é a mais estável e abundante, existente nos exosqueletos dos artrópodes com maior rigidez, enquanto que a β -quitina e a γ -quitina apresentam maior flexibilidade (encontradas, por exemplo, nas lulas). Consegue-se converter, de forma irreversível, as formas β ou γ na forma α , recorrendo a tratamento químico [41, 47].

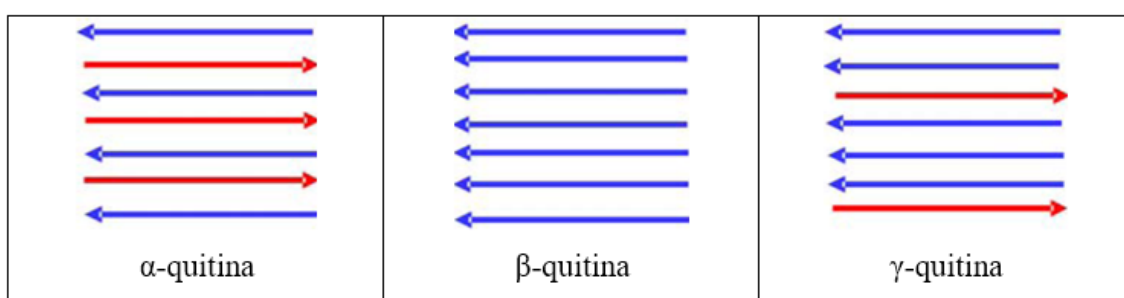


Figura 17 - Representação esquemática das cadeias poliméricas das diferentes estruturas da quitina.

A quitina é usada na agricultura, medicina, em áreas ligadas a sistemas biológicos, sendo que as suas aplicações passam por indutores de mecanismos defensivos de plantas, fertilizantes, espessantes e estabilizantes de alimentos [48, 49]. Mesmo assim, a sua gama de aplicações é reduzida, contribuindo para isso o complexo tratamento de purificação e a sua baixa solubilidade, devido às fortes ligações de hidrogénio entre as suas cadeias poliméricas. Este problema é parcialmente contornado recorrendo ao processo de desacetilação, obtendo-se o quitosano. Na figura 18 apresentam-se as estruturas da quitina e do quitosano e respetiva reação de desacetilação que ocorre em meio alcalino forte e a temperaturas superiores a 60 °C [50-52].

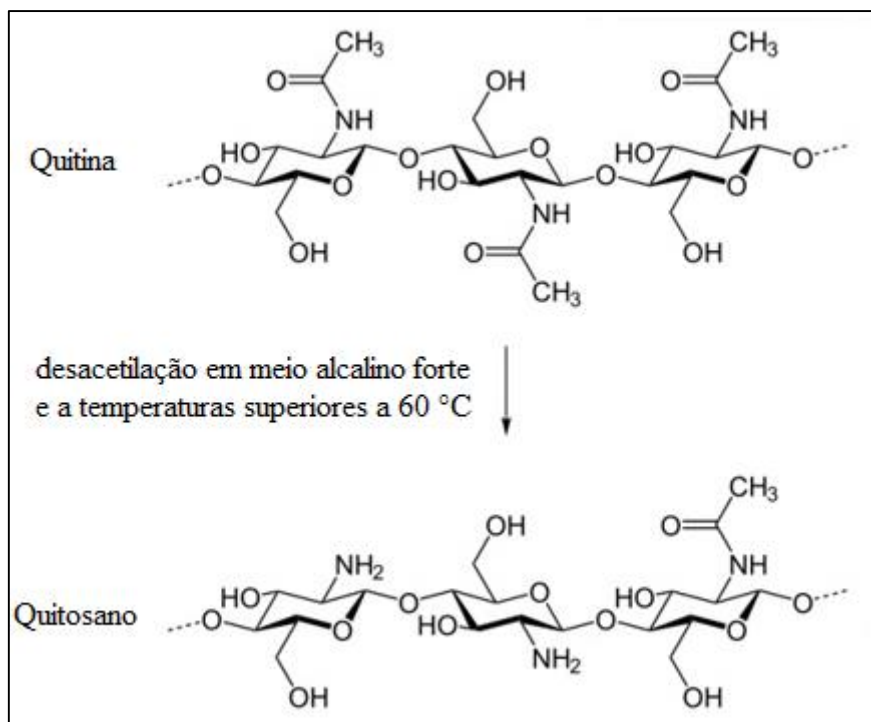


Figura 18 - Reação de desacetilação da quitina em quitosano (adaptado da referência [53]).

O quitosano foi descoberto por C. Rouget após um tratamento onde mergulhou quitina numa solução quente e concentrada de hidróxido de potássio (KOH), denominando este novo produto por "quitina modificada" que, ao contrário da quitina inicial, era solúvel em ácidos orgânicos. Posteriormente, em 1894, Hoppe-Seyler, ignorando o trabalho de Rouget, apresentou-o também com o nome "quitosano". Para transformação da quitina em quitosano, podem ser usados dois tipos de tratamento distintos, um recorrendo ao uso de ácidos e outro utilizando substâncias alcalinas. Apesar de ser possível o tratamento com ácidos este não é muito utilizado pois as ligações glicosídicas sofrem hidrólise ácida, resultando em fragmentos de quitosano com diferentes tamanhos. Mesmo recorrendo ao tratamento alcalino, a desacetilação não é completa, não constituindo um problema na maioria dos casos, pois é possível dissolver quitosano em soluções ácidas diluídas com um grau de desacetilação de 60%. Recorre-se então ao parâmetro de solubilidade para fazer a distinção entre quitina e quitosano [54, 55].

Apesar do quitosano ser insolúvel em água, pode-se dissolver em soluções aquosas de ácidos orgânicos (como por exemplo o ácido acético, fórmico e cítrico), podendo também usar-se ácidos inorgânicos diluídos (tais como o ácido clorídrico, nítrico e perclórico).

O valor de pK_a situa-se normalmente entre 6.3 e 7, dependendo do grau de acetilação. A quantidade de grupos amino protonados ($-NH_3^+$) afetam a solubilidade do quitosano, na medida em que quanto maior for a sua quantidade, maior será o número de interações eletrostáticas repulsivas nas cadeias e, por consequência, maior será a solvatação em água [41, 56]. Esta é também a razão porque os polieletrólitos são mais solúveis em meio aquoso que os polímeros neutros. Há também, para além da repulsão eletrostática, uma contribuição entrópica resultante da libertação dos contraíões para o meio.

1.5. Hidrogéis

Os hidrogéis são extremamente hidrofílicos, absorvendo elevadas quantidades de água ou fluídos biológicos. São estruturas poliméricas tridimensionais, podendo ter alguma estabilidade química ou degradarem-se ao longo do tempo [57, 58]. Podemos agrupar os hidrogéis em duas classes (físicos ou químicos), consoante o seu método de formação e de manutenção da sua estrutura polimérica tridimensional. Assim, temos a classe dos hidrogéis físicos ou reversíveis, composta por estruturas que se mantêm como resultado de interações (intra ou intermoleculares) tais como ligações iónicas ou ligações de hidrogénio. Quanto aos hidrogéis químicos ou permanentes, estes resultam de ligações covalentes, podendo ser obtidos por reticulação de polímeros solúveis em água com outros materiais ou por conversão de polímeros hidrofóbicos em polímeros hidrofílicos (reação de reticulação para originar uma rede polimérica) [59, 60]. Na figura 19 esquematizam-se os métodos de preparação de hidrogéis de origem física ou química.

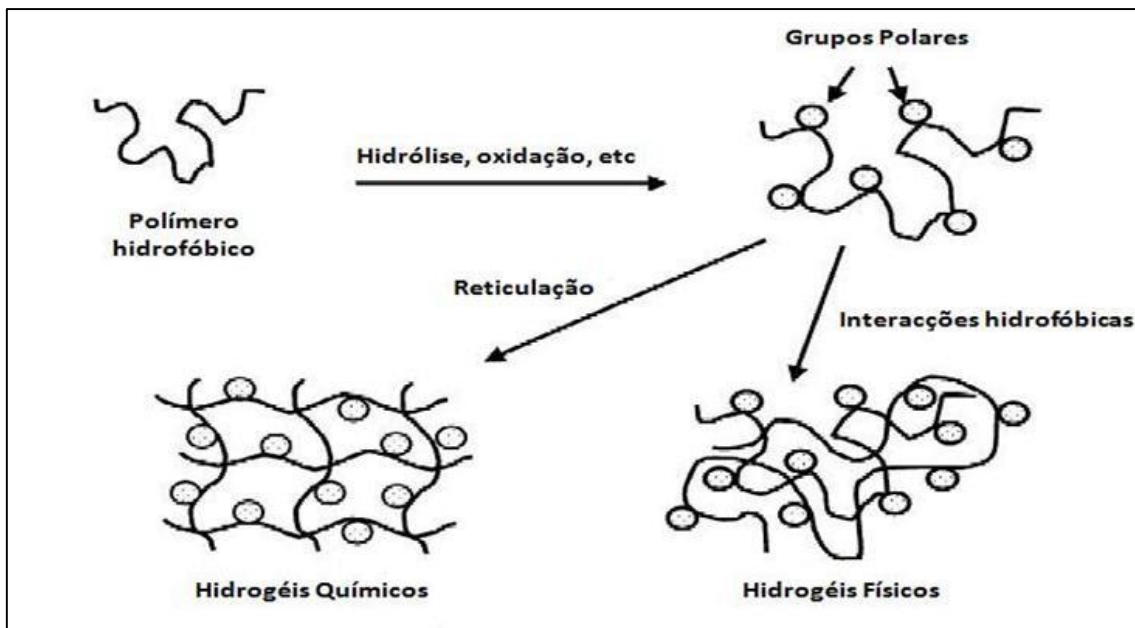


Figura 19 - Métodos de preparação de hidrogéis (adaptado da referência [58]).

A absorção de água num hidrogel seco, após liofilização, inicia-se por um processo em que as primeiras moléculas absorvidas vão hidratar as moléculas mais polares da estrutura polimérica, criando um conjunto inicial de ligações entre a água e o hidrogel. Com o decorrer da hidratação, verifica-se uma expansão física da estrutura polimérica e conseqüente exposição das regiões hidrofóbicas, que anteriormente se localizavam na região mais interior do polímero. Da sua interação com as moléculas de água resulta um segundo tipo de ligações entre a água e as moléculas mais hidrofóbicas. Para além disso ocorre, em terceiro lugar, a difusão osmótica entre as cadeias do polímero, em que se opõem as forças covalentes e as reticulações físicas, permitindo manter a sua estrutura e conferindo elasticidade. Devido ao balanço entre essas três interações é possível o equilíbrio relativamente à quantidade máxima de água absorvida pelo hidrogel [59, 61].

As capacidades de absorção dos hidrogéis proporcionam a possibilidade de serem aplicados em múltiplas áreas. Como biomateriais podem ser usados na libertação controlada de fármacos, na regeneração e reparação de órgãos e em tecidos. Na área agrícola podem contribuir na libertação controlada de água e integrarem a estrutura de solos. Existem ainda muitas outras aplicações como materiais absorventes, membranas, microcápsulas, suporte para catalisadores, lentes de contacto, implantes mamários, etc. [61].

Atualmente, de entre os vários polímeros de origem natural existentes, verifica-se um interesse crescente em hidrogéis preparados a partir de polissacarídeos devido à sua elevada hidrofiliabilidade, ao seu baixo custo que reduz os gastos na produção final do hidrogel e à biocompatibilidade. Estes materiais têm sido um objeto de estudo muito utilizado na preparação de hidrogéis biomédicos [59]. O presente trabalho incidiu no estudo de polissacarídeos que podem ser utilizados na preparação destes biomateriais, tais como o quitosano e a celulose.

1.6. Objetivos

O objetivo principal deste trabalho é o desenvolvimento e caracterização de hidrogéis físicos e químicos, a partir de polissacarídeos naturais, usando diferentes protocolos. Podemos dividi-lo em três objetivos específicos:

- Sintetizar carbamato de celulose e respetiva caracterização reológica;
- Avaliar a concentração de quitosano e genipina nas cinéticas de formação de géis e caracterização;
- Avaliar o efeito da ciclodextrina na cinética de gelificação. Análises de turgescência em hidrogéis.

2. Materiais e métodos

No decorrer deste trabalho foi sintetizado carbamato de celulose e foram preparados hidrogéis. Neste capítulo apresentam-se os reagentes usados, os procedimentos experimentais e as técnicas de caracterização utilizadas.

2.1. Reagentes

Foram usados vários materiais, adquiridos a diferentes fornecedores, que se mencionam de seguida.

A celulose microcristalina avicell, foi adquirida à empresa Sigma Aldrich, apresentando um grau de polimerização (DP) entre 200 e 300.

Foram usados três tipos de quitosano de diferentes pesos moleculares (o *heavy molecular weight*, o *medium molecular weight* e o *cross ground flakes and powder*) adquiridos à empresa Sigma Aldrich.

Como sistemas de dissolução usou-se o hidróxido de tetrabutilamónio (TBAOH) obtido também na empresa Sigma Aldrich, como solução aquosa de 40% e qualidade cromatográfica.

Para a síntese de carbamato de celulose foi necessário dissolver celulose, utilizando-se várias concentrações de ureia obtida da Fluka Analytical.

Para medição da viscosidade intrínseca do carbamato de celulose foi utilizada uma solução comercial de hidróxido de cuproetilenodiamina (CED) (1,0 M em H₂O) obtida através da Sigma Aldrich.

Utilizou-se ainda etanol absoluto (99,99%) da Fischer, acetona (99,6%) da JMGS e água destilada.

Durante o processo de síntese de hidrogéis fez-se a dissolução do quitosano, recorrendo-se a ácido acético da empresa Merck, sendo este também usado na medição da turgescência dos hidrogéis em pH ácido.

2.2. Procedimento experimental

Seguidamente encontram-se descritos os procedimentos experimentais para as preparações de carbamato de celulose e dos hidrogéis.

2.2.1. Síntese de carbamato de celulose

O trabalho, para transformação de celulose em carbamato de celulose, iniciou-se com a adaptação de uma metodologia baseada nos processos descritos por Guo et al. [40].

Começou-se por moer a polpa de celulose até se obter um material menos compacto em quantidade suficiente para a realização da experiência, com recurso a um moinho de café convencional. Depois de obtida a polpa de celulose, esta foi depositada (1,5 g) em diferentes frascos de vidro (de 20 ml). O conjunto dos frascos foi dividido em três lotes, para se aplicar a cada um uma solução aquosa, com diferentes percentagens de ureia (20, 30 e 40%) sendo imersa a polpa de celulose de cada frasco em 15 g de solução de ureia. Esta mistura ficou sobre agitação durante 12 h à temperatura ambiente. De seguida, as amostras foram retiradas dos tubos, lavadas e filtradas com recurso a uma bomba de vácuo. As amostras foram moídas novamente, para melhor dispersão do material, e colocadas em placas de Petri. Cada lote de amostras foi dividido noutros três para, a cada um, ser aplicada radiação micro-ondas. As potências de irradiação, aplicadas às amostras, foram diferentes (247, 285 e 362 W), bem como os tempos de exposição (3, 5 e 10 minutos). Por último, estes materiais foram colocados numa estufa de secagem a uma temperatura de 40 °C, durante pelo menos 12 horas.

Na figura 20 apresenta-se, num diagrama de fluxo, uma visão generalizada dos diferentes passos envolvidos na síntese do carbamato de celulose. A figura 21 mostra, a título de exemplo, o aspeto do carbamato de celulose, sujeito a 5 minutos de irradiação a 250 W.

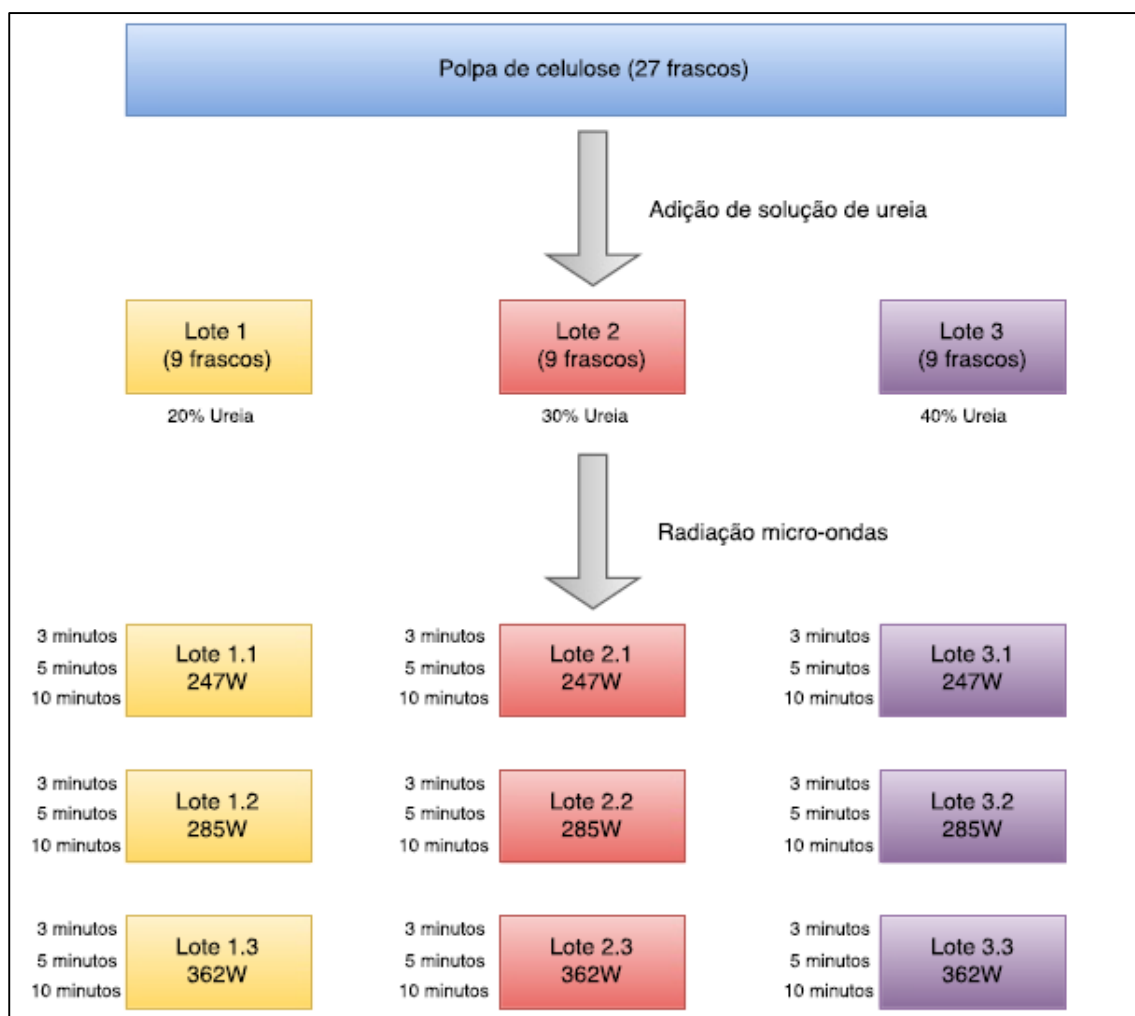


Figura 20 – Diagrama de fluxo da síntese de carbamato de celulose.



Figura 21 - Carbamato de celulose (obtido com 5 minutos de irradiação a 250 W).

2.2.2. Síntese de hidrogéis

Para a síntese e caracterização de hidrogéis, o trabalho iniciou-se com a adaptação de um método baseado nos processos descritos por Moura et al. [62].

Foram preparadas oito soluções, cada uma com 4 g, com água destilada (99,5%) e ácido acético (0,5%). Seguidamente foi adicionado, a cada uma delas, quitosano em diferentes quantidades (1, 1,5, 1,8 e 2%). As soluções resultantes foram agitadas até se dissolverem completamente. Depois disso foram centrifugadas e, de seguida, foi adicionado a cada par duplicado de soluções, duas quantidades diferentes de genipina (0,05 e 0,2%), sendo registado o momento dessa adição como o início da reação de gelificação. Entretanto as amostras foram sendo agitadas, até o material adicionado se dissolver, e foram centrifugadas de seguida. Na figura 22 apresenta-se, num diagrama de fluxo, uma visão generalizada dos passos dados na síntese dos hidrogéis à base de quitosano.

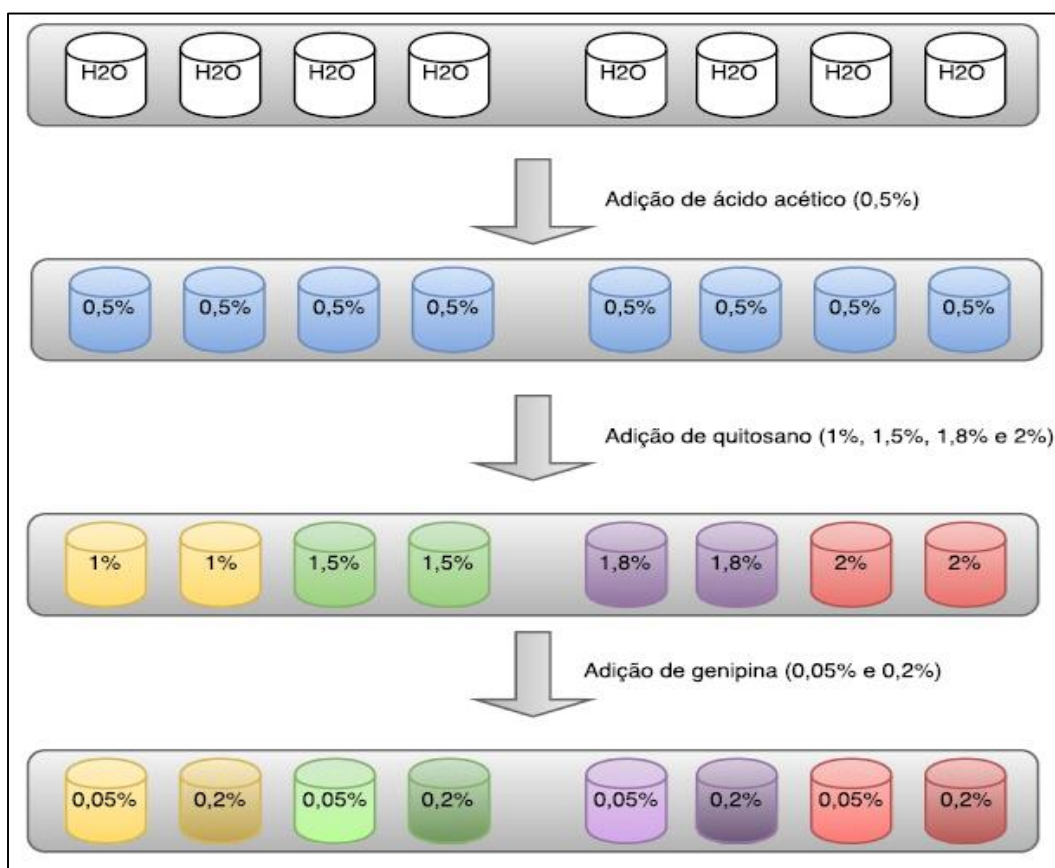


Figura 22 - Diagrama de fluxo da síntese de hidrogéis à base de quitosano (adição de ácido acético, de quitosano e de genipina).

Do resultado final da figura 21 metade do conteúdo de cada amostra foi utilizado na análise reológica, sendo a outra metade utilizada na análise espectroscópica, conforme descrição posterior.

Para avaliar a influência das ciclodextrinas, todo este processo foi repetido em mais seis ensaios, diferentes na parte final. Em três ensaios adicionou-se α -ciclodextrina à genipina, nas proporções de 1:1, 2:1 e 1:2. Nos outros três ensaios adicionou-se β -ciclodextrina, nas mesmas proporções.

Além destes processos, foram testadas outras alternativas que não foram totalmente bem sucedidas. Estas envolveram a dissolução simultânea de celulose e quitosano, assim como a dissolução de carbamato de celulose e quitosano. Fizeram-se ainda outras tentativas com solventes alternativos à mistura de ácido acético com água destilada, como é o caso do cloreto de zinco e do ácido fosfórico, com posterior adição de genipina. Em todos estes casos, a formação de hidrogéis foi mínima e, portanto, estes processos não tiveram seguimento.

2.3. Técnicas de caracterização

2.3.1. Reologia: conceitos

Apresentam-se, introdutoriamente, alguns conceitos base de reologia, ramo da mecânica dos fluidos que estuda as propriedades físicas que influenciam o transporte e quantidade de movimento num fluido. A viscosidade é a propriedade reológica que melhor caracteriza os fluidos, relativamente à sua fricção inerente [63]. Tomemos como exemplo a figura 23, em que um fluido sob "tensão de corte" se encontra confinado entre duas placas paralelas, de área A. Consideramos que a placa superior se move relativamente à inferior, com uma viscosidade U, sendo que as setas apresentadas entre as placas, são proporcionais em comprimento à velocidade que o fluido toma e à força F que é aplicada. No decorrer deste processo o fluido toma a velocidade da placa superior, fazendo com que esta se distancie da inferior [64].

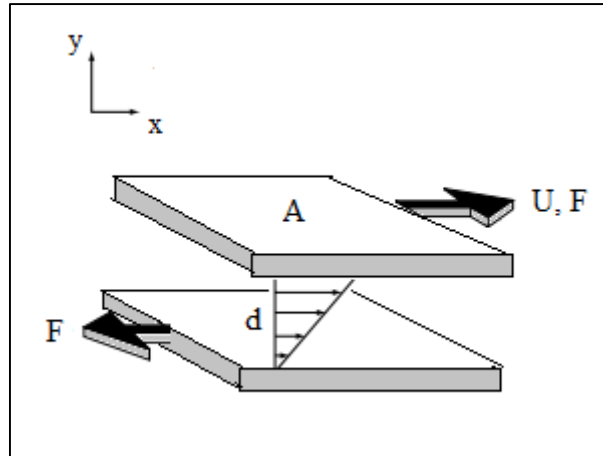


Figura 23 - Representação do comportamento de um fluido entre 2 planos, quando aplicada uma tensão de corte (adaptado referencia [64]).

As seguintes equações [64] definem a tensão de corte τ (equação 1), a velocidade de fluxo v (equação 2) e a velocidade de corte D (equação 3):

$$\tau = \frac{F}{A} \quad (1)$$

$$v = \frac{dx}{dt} \quad (2)$$

$$D = \frac{dv}{dy} \quad (3)$$

No caso de duas placas paralelas, em que a distância entre ambas não se altera, a variação da velocidade de fluxo no eixo dos y é linear, o que implica que D é constante em todo o fluido.

Para um fluido Newtoniano, no caso mais simplificado, a tensão de corte é proporcional à velocidade de corte, com uma constante de proporcionalidade η , como apresentado na seguinte equação:

$$\frac{F}{A} = \eta \frac{dv}{dy} \quad \text{ou} \quad \tau = \eta D \quad (4)$$

Para um sistema coloidal Newtoniano, o aumento de viscosidade devido à presença de partículas aumenta com a concentração destas.

Para soluções constituídas por polímeros, a viscosidade intrínseca, $[\eta]$, está relacionada com a massa molecular, M , do mesmo, através da equação 5, de Staudinger-Mark-Houwink:

$$[\eta]=kM^{\alpha} \quad (5)$$

nos polímeros, os valores de k e α são determinados experimentalmente [64].

A viscosidade pode aumentar ou diminuir ao longo do tempo, de forma reversível ou irreversível. Designa-se por reoplexia quando aumenta e por tixotropia no caso em que diminui.

2.3.2. Reómetro

Os testes reológicos foram realizados num Reómetro MARS da Thermo Scientific (figura 24), usando preferencialmente uma geometria de medida de cone-e-prato (2°, 35 mm de diâmetro).



Figura 24 - Reómetro (sistema de cone-e-prato).

A temperatura à qual o aparelho opera é controlada por um sistema Peltier garantindo que a temperatura não varia 0.01 °C do valor estipulado.

A viscosidade das amostras foi determinada por medidas de reometria não linear em que uma rampa de velocidades de corte foi aplicada de forma crescente (0.5-100 s⁻¹).

Uma medição reológica normalmente consiste numa deformação ou análise de tensão a uma frequência constante (normalmente 1 Hz) combinada com uma análise de frequência, por exemplo entre 0.1 e 100 Hz. A varredura de tensão fornece informações acerca do módulo elástico G' , do módulo viscoso G'' e do ângulo de fase δ . Um valor elevado de G' em comparação com G'' indica propriedades elásticas (sólidas) pronunciadas (gel) relativamente ao produto que está a ser analisado. Um ângulo de fase de 0° significa um material perfeitamente elástico e um ângulo de fase de 90° , significa um material perfeitamente viscoso. O varrimento de frequência fornece informações sobre a força do gel, onde um grande declive da curva do G' indica baixa resistência e um pequeno declive indica alta resistência.

A análise reológica foi realizada com o próprio *software* do reómetro utilizado e com recurso a ferramentas do Microsoft Office - Excel.

2.3.3. Viscosímetro capilar

Para o cálculo da viscosidade intrínseca, da celulose e do carbamato de celulose, foi utilizado o viscosímetro capilar Ubbelohde (figura 25).

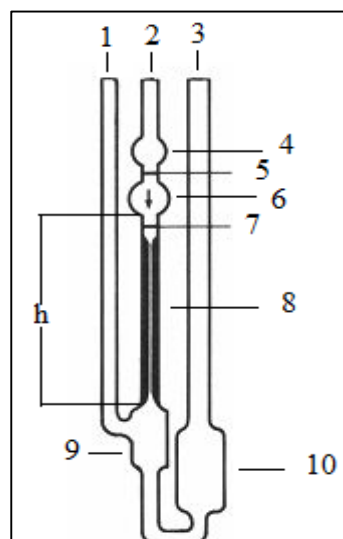


Figura 25 - Representação do viscosímetro capilar: tubo de ventilação (1), tubo com capilar (2), tubo de enchimento (3), esfera de entrada (4), marca temporal superior (5), esfera de medição (6), marca temporal inferior (7), capilar (8), esfera de nível (9) e reservatório (10).

Para estimar o DP de uma amostra, procedeu-se inicialmente à sua dissolução, seguida de uma etapa de medição do tempo de escorrimento.

Para preparar a solução, segundo a norma ISO5351 denominada “Pulps - Determination of limiting viscosity number in cupri-ethylenediamine (CED) solution,” [65], dissolve-se uma certa quantidade de amostra (aproximada 0,003 g/mL de carbamato de celulose ou de celulose nativa), num tubo Falcon, com 7,5 mL de água destilada e 7,5 mL de solução de hidróxido de CED ($1,00 \pm 0,02$ mol/L), e adicionam-se algumas peças de cobre. A amostra é vigorosamente agitada de modo a que não restem vestígios de material por dissolver, não devendo este processo demorar mais de 30 minutos, pois poderá haver degradação da amostra. Não deverá haver contato direto da solução com o ar (oxidação).

Na etapa seguinte, de medição do tempo de escorrimento, a amostra é vertida pelo tubo 3 (figura 24) até atingir sensivelmente metade da cavidade 9. De seguida, a amostra é sugada até ao reservatório 4, até este estar completamente cheio. Posteriormente liberta-se o vácuo e regista-se o tempo que a solução demora a percorrer do ponto 5 até ao ponto 7. Cada medição foi realizada em triplicado.

No que diz respeito aos cálculos, o valor da viscosidade (η_{ratio}) é obtido através da equação 6, em que t é o tempo do fluxo da solução em segundos e h é a constante do viscosímetro em s^{-1} .

$$\eta_{ratio} = h.t \quad (6)$$

A partir do valor de η_{ratio} , obtém-se o valor de $[\eta].\rho$ com o auxílio da tabela constante no anexo B da norma ISO5351 [65], o que permite calcular o número limitante de viscosidade a partir da equação de Martin (equação 7), onde η é a viscosidade da solução, η_0 é a viscosidade do solvente e ρ é a concentração do polímero, expressa em g/mL.

$$\log[\eta] = \frac{\eta - \eta_0}{\eta_0 \times \rho} \quad (7)$$

Como uma forma de aplicação mais direta a equação 8, resultante do rearranjo da equação 9, foi aplicada neste trabalho.

$$[\eta] = \frac{\eta - \eta^0}{\eta^0 \times \rho} \quad (8)$$

Por último, o grau de polimerização foi estimado, com a equação 9, através da sua relação com a viscosidade intrínseca $[\eta]$ [66].

$$DP_{\eta}^{0,905} = 0,75 \times [\eta] \quad (9)$$

2.3.4. Espectrometria UV/visível: conceitos

A análise espectrométrica permite quantificar, de uma maneira simplificada, as propriedades de absorção, reflexão ou transmitância de uma dada amostra, que pode ser uma solução, um sólido transparente ou um sólido opaco. Para se obter informação sobre a absorção da amostra, ela é inserida no caminho ótico de um espectrómetro, onde a luz ultravioleta (UV) e/ou visível, numa certa gama de comprimentos de ondas, passa pela amostra. O espectrómetro mede a quantidade de luz que foi absorvida pela amostra. A transmitância da amostra é definida pela razão I/I_0 , expressa em percentagem (T%), onde I_0 é a intensidade da luz antes de passar pela amostra e I depois de passar pela amostra. A absorvência é determinada para esse certo comprimento de onda ou como uma função de uma faixa de comprimentos de onda [67].

De modo geral existem espectrómetros de feixe duplo e de feixe simples, tendo sido utilizado o último. A constituição do espectrómetro assenta em cinco componentes principais [68]: as fontes de radiação, o monocromador, o porta-amostras, os detetores e o indicador de sinal, como ilustrado no esquema da figura 26.

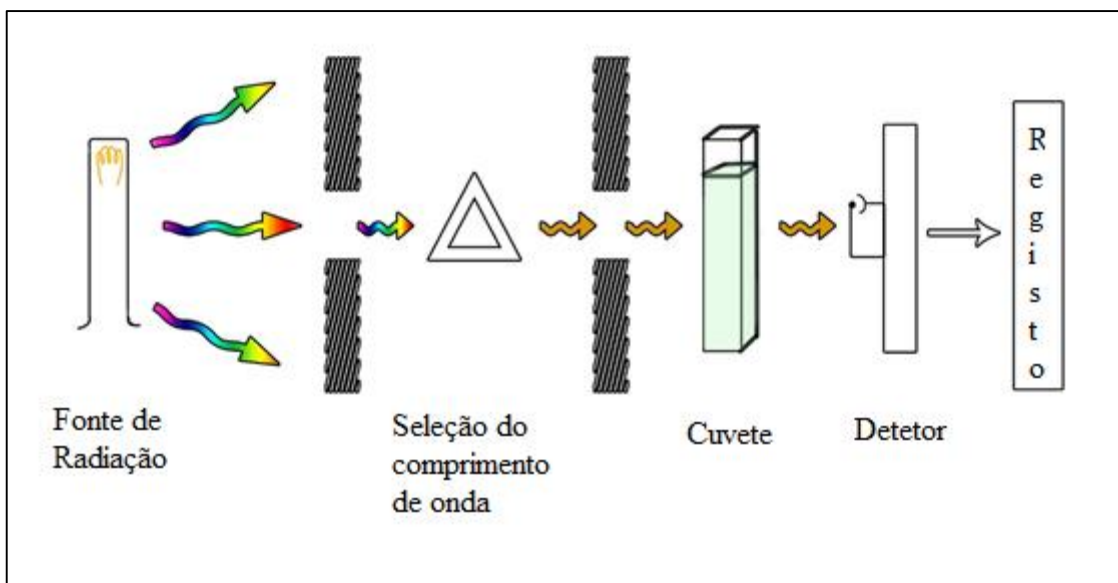


Figura 26 - Componentes de um espectrômetro UV/Visível (adaptado da referencia [68]).

Usou-se um intervalo de comprimentos de onda entre 350 e 750nm, correspondendo aproximadamente à gama do espectro da radiação visível, tendo-se optado por esta faixa devido à ocorrência de alterações de cor nos hidrogéis após a adição da genipina (componente responsável pela gelificação). A calibração do aparelho foi feita com água destilada. O espectrômetro, PG Instruments, foi operado à temperatura ambiente. As medições foram efetuadas em intervalos de quinze minutos, durante várias horas.

2.3.5. Taxa de turgescência: conceitos

Para melhor entendimento das propriedades dos hidrogéis sintetizados, estes foram sujeitos a testes de turgescência. Os hidrogéis de porosidade elevada são capazes de absorver uma grande quantidade de água tornando-se mais volumosos. Os hidrogéis de polímeros reticulados não se dissolvem, por outro lado, incham quando entram em contacto com a água ou outro solvente. As propriedades de turgescência, que geralmente são usadas para a caracterização dos hidrogéis, dependem de fatores tais como a densidade da rede polimérica, a natureza dos solventes e a interação entre o polímero e o solvente [69].

Na determinação da capacidade de absorção de água, foram escolhidas amostras dos hidrogéis sintetizados com adição de β -CD, tendo sido registada a sua massa inicial (W_0). Seguidamente, cada amostra foi colocada num recipiente fechado, contendo no seu interior água destilada (H_2O). Foi avaliada a evolução das amostras, com determinações das massas, em intervalos regulares, até o atingir de um equilíbrio.

A caracterização da capacidade de absorção de água dos hidrogéis de quitosano, foi calculada com o índice de turgescência (S), o qual relaciona a massa do hidrogel inchado (W_i) e a massa do hidrogel inicial (W_0). Para calcular o grau de inchamento, recorreu-se à seguinte equação [70]:

$$S = \frac{w_i - w_0}{w_0} \times 100 \quad (10)$$

2.3.6. Outros métodos de análise

Foram utilizados métodos de análise adicionais, que envolveram a colaboração de outros investigadores. As análises de espectroscopia de infravermelhos por transformadas de Fourier (FTIR) e de microscopia eletrónica de varrimento (SEM) foram realizadas e cedidas pelo Departamento de Química da Universidade de Coimbra, descrevendo-se de seguida um resumo dessas metodologias.

2.3.6.1. Espectroscopia de infravermelhos por transformada de Fourier (FTIR)

A espectroscopia de infravermelho (IV) é uma técnica analítica que mede a intensidade IV *versus* o número de onda da radiação, correspondendo a radiação IV à parte do espectro eletromagnético situada entre as regiões do visível e das micro-ondas [71]. O facto de cada grupo funcional absorver uma dada frequência característica permite que, por meio da transformada de Fourier, seja possível traçar um gráfico de intensidade de radiação *versus* frequência, tornando-se assim possível caracterizar os grupos funcionais de um padrão ou de um material desconhecido [72].

A figura 27 apresenta as componentes envolvidas num sistema de FTIR, envolvendo inicialmente o interferómetro, posterior aquisição e digitalização de dados, aplicação da função FT e apresentação do espectro [73].

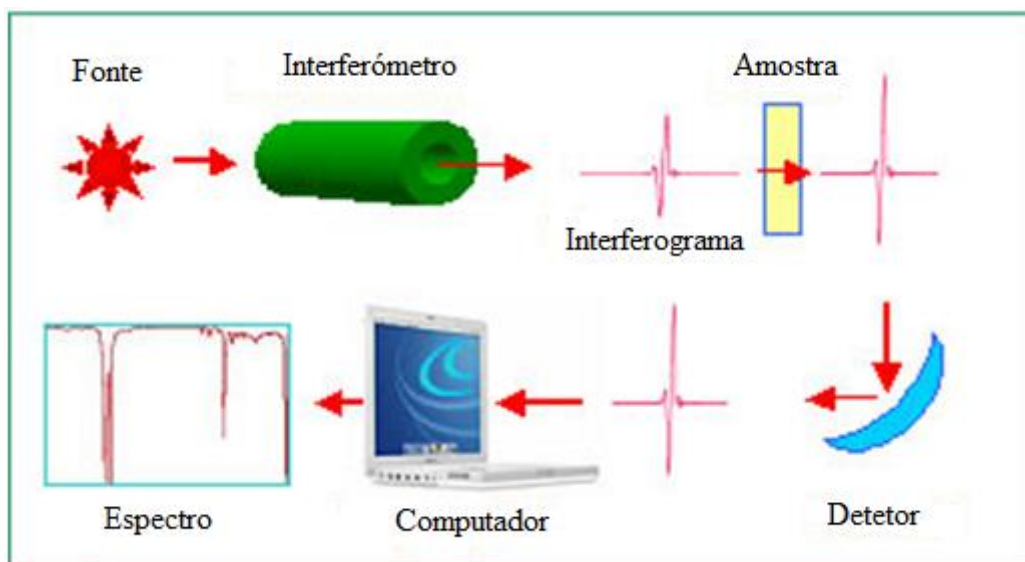


Figura 27 - Componentes de um sistema FTIR (adaptado da referencia [73]).

A espectroscopia no infravermelho permitiu identificar algumas substituições ou alterações importantes na composição do carbamato de celulose e dos hidrogéis, particularmente nos grupos amina e hidroxilo.

A técnica de FTIR foi utilizada recorrendo a um espectrómetro *FTIR Nicolet 6700* - *Thermo Electron Corporation* (CENIMAT/I3N).

Os espectros de FTIR foram adquiridos na região entre 3500 e 500 cm^{-1} após secagem dos hidrogéis.

2.3.6.2. Microscopia eletrónica de varrimento (SEM)

A microscopia eletrónica de varrimento (SEM) permite a avaliação da microestrutura de vários tipos de amostras [74]. Os testes efetuados com esta técnica baseiam-se na irradiação de um feixe de eletrões por um capilar de tungsténio (ânodo). O eléctrodo positivo atrai as cargas negativas intensamente, deslocando-se na direção deste. O percurso dos feixes é corrigido com recurso ao uso de lentes condensadoras, alinhando-os em direção à abertura da objetiva que, por sua vez, ajustam o feixe de eletrões antes de atingirem a amostra [75].

A figura 28 apresenta, de forma simplificada, as componentes chave de um microscópio SEM [76].

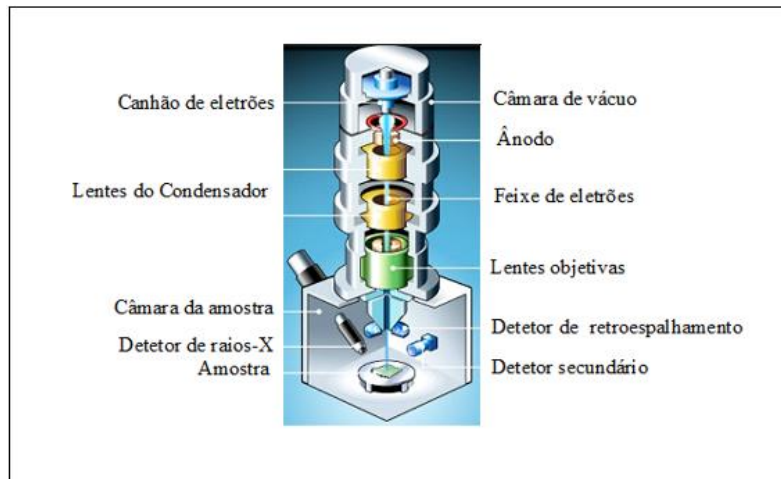


Figura 28 - Componentes de um microscópio SEM (adaptado da referencia [76]).

A interação do feixe de cargas negativas com a superfície da amostra resulta na produção de elétrões secundários, elétrões retro espalhados, raios-X, fótons, entre outros [76]. Estas emissões são depois captadas permitindo recolher informações várias sobre a amostra, como é o caso da topografia da superfície, da composição, da cristalografia, entre outros. As imagens obtidas com elevada resolução da topografia da superfície são obtidas graças aos elétrões secundários, sendo que as imagens características da variação de composição do material são fornecidas graças aos elétrões retro espalhados [77].

As amostras sólidas não condutivas, como as do caso em estudo, têm de ser cobertas com uma camada fina de um material eletricamente condutor (por exemplo ouro, platina ou tungsténio) depositada para prevenir a criação de campos elétricos estáticos na amostra, que se formariam devido a irradiação elétrica durante a produção da imagem [75].

Esta técnica requer liofilização prévia dos hidrogéis para ser observada a sua morfologia. Para observar a microestrutura e porosidade é necessário visualizar o interior da amostra, como tal os hidrogéis liofilizados foram congelados em azoto líquido e quebrados longitudinalmente, como forma de visualizar o seu interior de diferentes perspetivas. Os testes de SEM foram realizados em Coimbra e analisados por um microscópio eletrónico da marca *ZEISS DSM 962*, operando a 5kV (a figura 29 mostra um exemplo de uma micrografia de SEM).

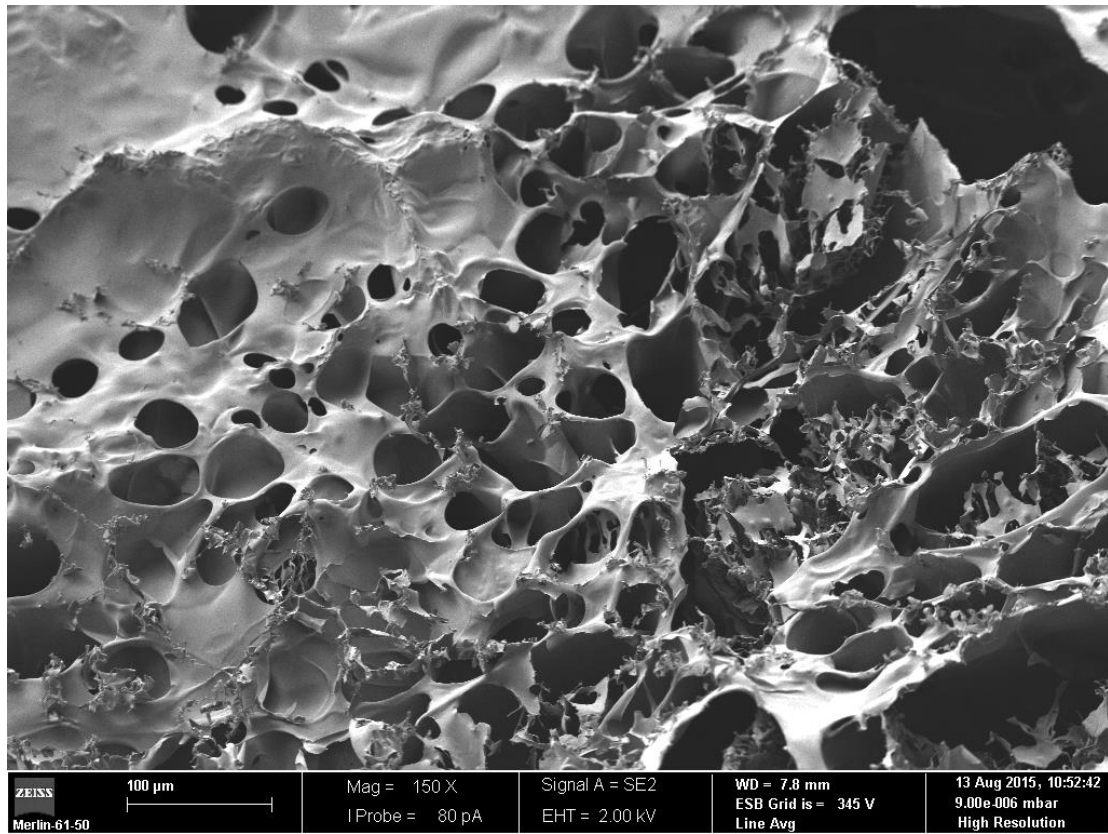


Figura 29 - Exemplo de uma micrografia de SEM (foto cedida pelo Dr. Luís Alves).

3. Resultados e discussão

Neste capítulo apresentam-se os resultados e discussão do trabalho. O tema da síntese de CC tem duas adaptações (protocolo inicial e final). A segunda parte do trabalho inicia-se pela síntese de hidrogéis de CC, centrando-se depois nos hidrogéis de quitosano.

3.1. Carbamato de celulose

A partir da análise da literatura sabemos que existem pelo menos três métodos para a produção de CC: um mais “tradicional”, outro que utiliza dióxido de carbono supercrítico e, por último, o método supostamente mais amigável ao ambiente que utiliza radiação micro-ondas para a transformação [40]. Este terceiro método foi aplicado devido à maior facilidade de ser replicado em laboratório, sem requerer o uso de instrumentação e etapas mais complexas.

Foram inicialmente feitas duas etapas, uma anterior à fase de micro-ondas e uma posterior. Mais tarde, com o refinar do processo, foram usados diferentes tipos de potências e diferentes tempos de irradiação das amostras, com o intuito de confirmar quais seriam as condições que poderiam causar uma maior transformação da celulose nativa (CN) em CC. Foi usada também uma etapa de filtração a vácuo, de modo a retirar a maior quantidade de solvente possível das amostras.

Todas as amostras produzidas foram posteriormente dissolvidas em CED com o intuito de analisar o DP. As amostras foram também analisadas por FTIR, para verificar a formação do CC.

Para clarificar melhor as diferentes abordagens ao processo de transformação de CN em CC, apresentam-se de seguida análises aos resultados do DP, da viscosidade, bem como do FTIR.

3.1.1. Fase inicial: protocolo “CarbaCell”

Na abordagem inicial utilizamos o protocolo base (secção 2.2.1), mas com alterações no tipo de secagem e nas potências de micro-ondas usadas.

3.1.1.1. Grau de polimerização: fase inicial

Após executarmos o protocolo, procedemos à medição do grau de polimerização de modo a verificar como se comportava o material que transformamos, segundo o tempo de exposição e a potência de irradiação usada (170, 285 e 362 W), como está abaixo apresentado, na figura 30.

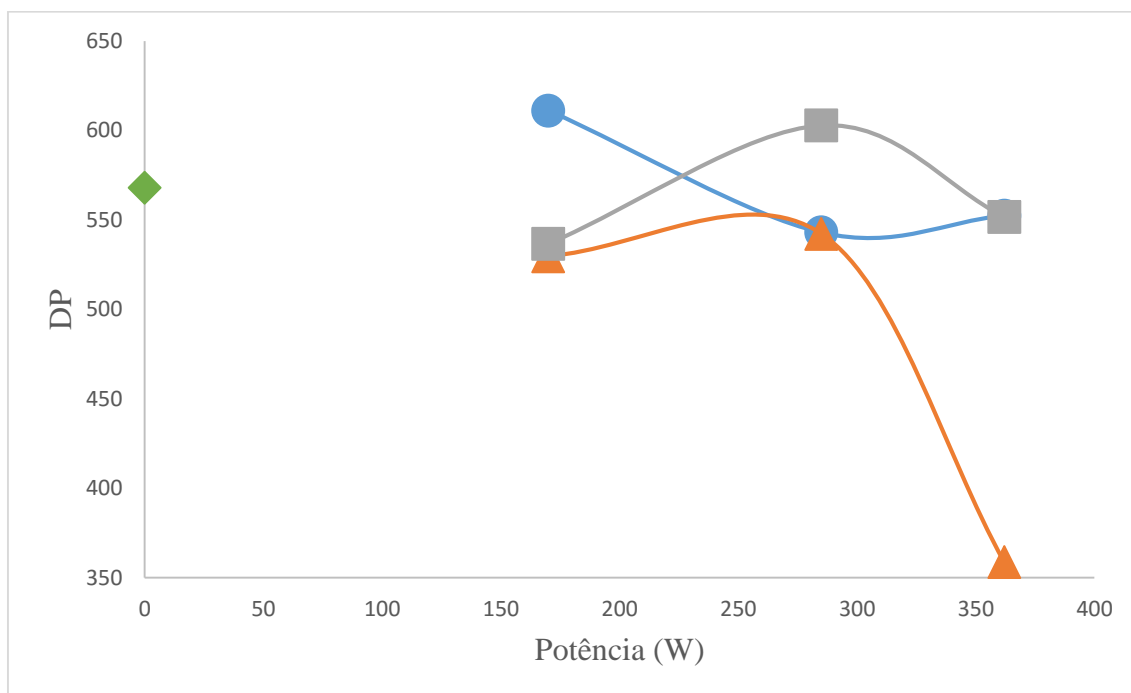


Figura 30 - Medição do DP para amostras sujeitas a solução de 30% de ureia, com potências de irradiação micro-ondas de 170 W, 285 W e 362 W. Amostras sujeitas a 1 minuto (círculo), a 3 minutos (triângulo) e a 5 minutos (quadrado), de irradiação. CN (losango).

Como podemos verificar a variação no DP é mínima. O grau de polimerização parece não sofrer alteração significativa com o tempo de exposição e concentração de ureia. A exceção será a amostra sujeita à radiação mais intensa durante 3 minutos, mas não é possível concluir a razão desta exceção.

3.1.1.2. Análise FTIR: fase inicial

Efetuiu-se também uma análise comparativa das amostras por FTIR, para verificar se teria havido alguma transformação significativa relativamente à amostra inicial de celulose nativa. A figura seguinte mostra uma comparação entre os vários controlos e também uma amostra que foi irradiada durante 3 minutos à potência de 285W.

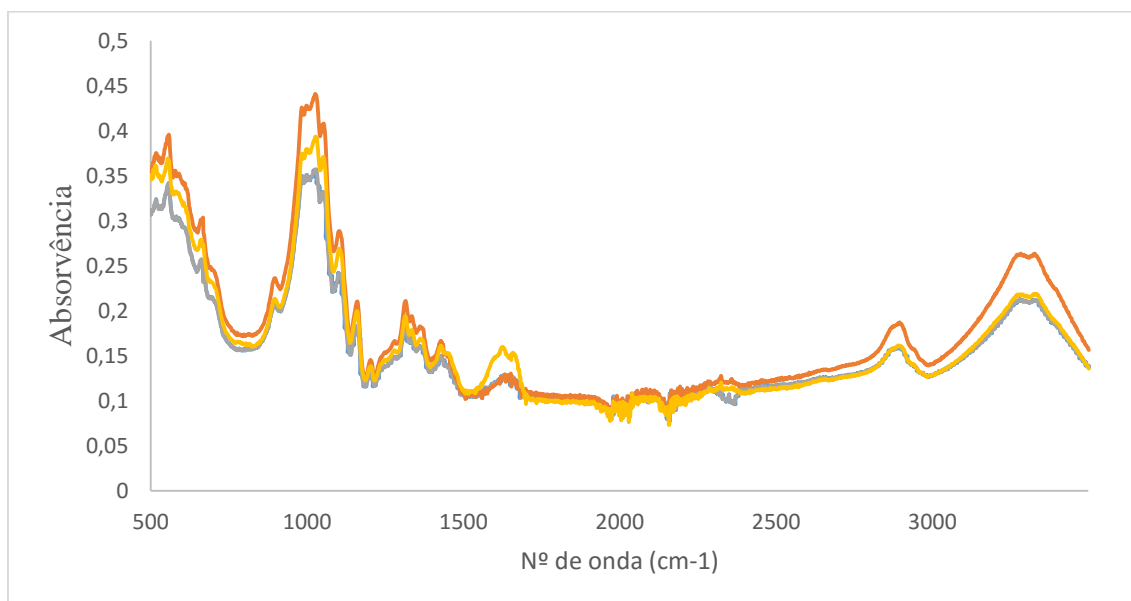


Figura 31 - Imagem de FTIR, comparação entre CN (azul), celulose embebida em solução de ureia com agitação por 12 horas (cinzento), celulose embebida em solução de ureia durante a preparação das restantes amostras sendo a solução depois retirada (laranja), amostra sujeita a 3 minutos de irradiação micro-ondas a potência de 285 W (amarelo).

Como a figura 31 ilustra, não são observadas alterações significativas nos espectros de FTIR. Isto é, todas as amostras apresentaram um comportamento qualitativamente semelhante, o que sugere a não formação do CC.

Tendo em conta que a variação do DP não é significativa e que os espectros de FTIR do material tratado por micro-ondas são qualitativamente iguais ao material não tratado, concluímos que o protocolo usado não era adequado para a síntese do CC.

3.1.2. Fase final: protocolo “CarbaCell” adaptado

3.1.2.1. Grau de polimerização: fase final

Noutro protocolo foram utilizadas potências de 247, 285 e 362 W, sendo as amostras expostas durante 3, 5 e 10 minutos (figura 32). Foi utilizado um tratamento mecânico de moagem, com o intuito de desagregar os aglomerados de celulose após estes terem estados embebidos em solução de ureia e sujeitos a agitação por 12 horas. Foi também reduzida uma etapa de secagem, em vez das duas adotadas anteriormente, sendo esta efetuada após o processo de irradiação da amostra por micro-ondas.

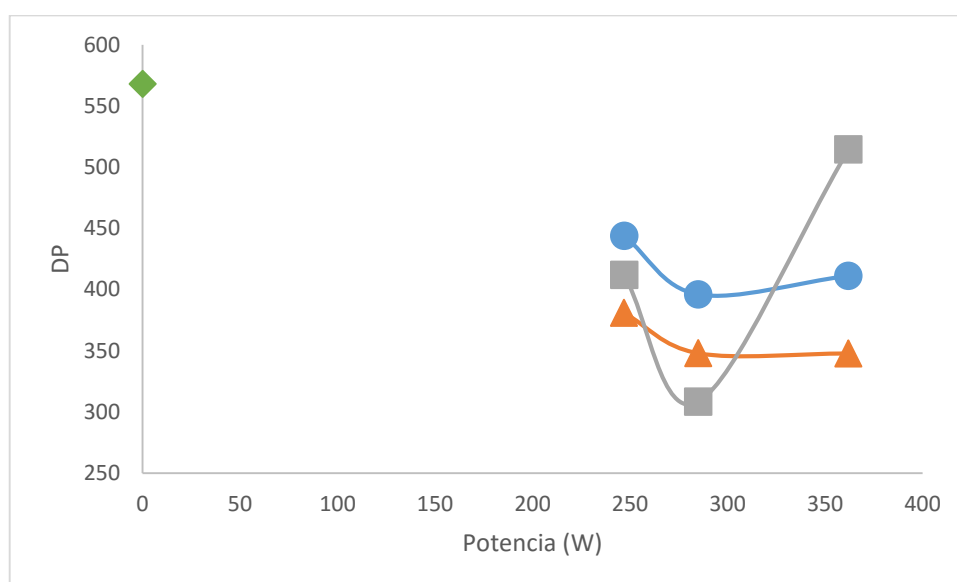


Figura 32 - Medição do DP para amostras sujeitas a solução de 20% de ureia, para potências de irradiação de 247, 285 e 362 W. Amostras sujeitas a 3 minutos (círculo), a 5 minutos (triângulo) e a 10 minutos (quadrado) de irradiação micro-ondas e CN (losango).

Como podemos verificar o comportamento das amostras, de 3 e 5 minutos, revela uma diminuição do DP significativa com o aumento da potência e uma alteração mínima da segunda para a terceira potência. Neste caso, o DP diminui com o aumento do tempo de exposição das amostras à radiação.

No caso da amostra sujeita a 10 minutos de tratamento à potência menor o seu DP não decresce tanto como na amostra sujeita a 5 minutos de irradiação. Existe depois um decréscimo acentuado da primeira potência para a segunda. No caso da potência maior, existe um aumento muito significativo do DP, possivelmente devido à formação da

ligação química entre os agregados de celulose, o que se manifesta por um aumento do DP.

3.1.2.2. Análise FTIR: fase final

Apresentam-se agora dois gráficos onde é feita a comparação entre uma amostra de CN, uma amostra que ficou embebida em solução de ureia com agitação por 12 horas, e uma amostra que, além do tratamento com ureia, sofreu irradiação micro-ondas durante 5 minutos a uma potência de 248 W. O gráfico da figura 33 refere-se a uma solução com 20% de ureia, enquanto o da figura 34 representa a mesma situação, mas com uma solução de ureia de 40%. Foi somente ilustrado o exemplo de 5 minutos, mas os resultados para os restantes tempos são qualitativamente semelhantes.

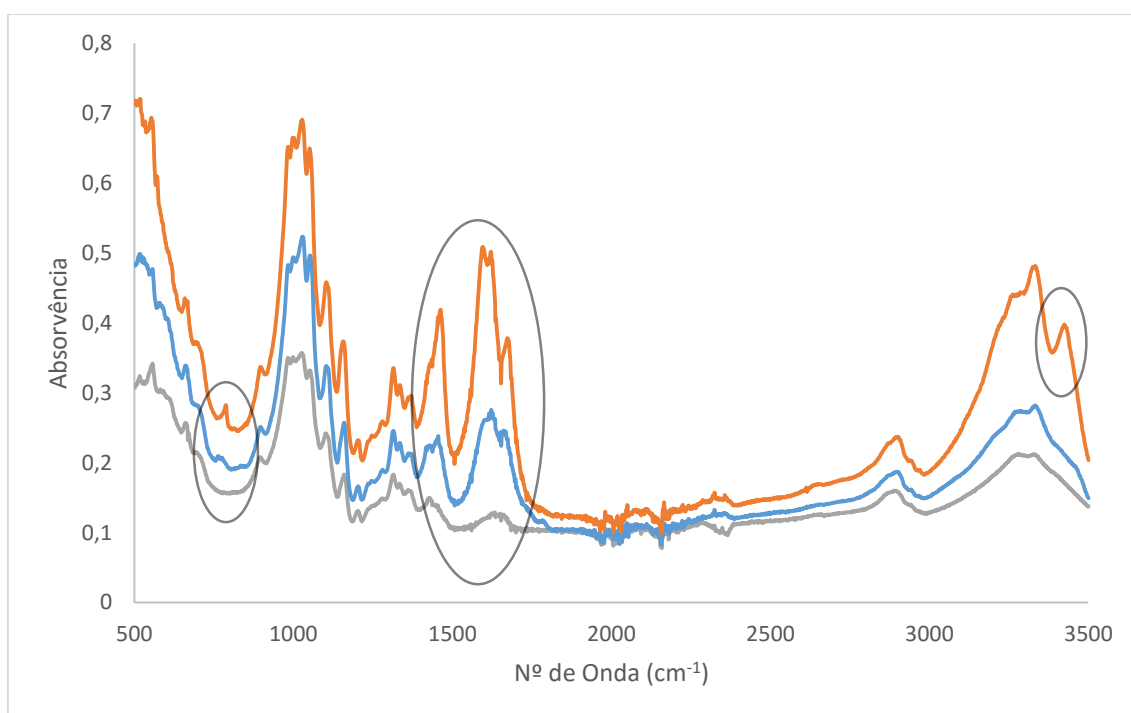


Figura 33 - Imagem de FTIR, comparação entre CN (cinzento), celulose embebida em solução de ureia de “20%” com agitação por 12 horas (azul) e amostra embebida em solução de ureia de “20%” com agitação por 12 horas sujeita a 5 minutos de irradiação micro-ondas a potência de 248 W (laranja).

Da análise do gráfico da figura 33 verifica-se o aparecimento dos seguintes picos:

- a 790 cm^{-1} ;

- a 1490 cm^{-1} correspondente a uma ligação simples entre carbono e oxigénio (C-O) ($1250\text{-}1300\text{ cm}^{-1}$);
- a 1678 cm^{-1} correspondente a ligação dupla carbono oxigénio (C=O) 1650 cm^{-1} (amidas associadas);
- a 3340 cm^{-1} ;
- a 3436 cm^{-1} pode ser atribuído ao modo vibracional resultante da elongação da ligação N-H [78, 79].

Como podemos verificar pela comparação das amostras na figura 33, a adição de ureia neste novo protocolo provoca o aparecimento dos picos referidos anteriormente, sendo que a sua intensificação ocorre quando a amostra é sujeita a radiação micro-ondas, com a exceção do pico registado a 3436 cm^{-1} que somente aparece na amostra irradiada.

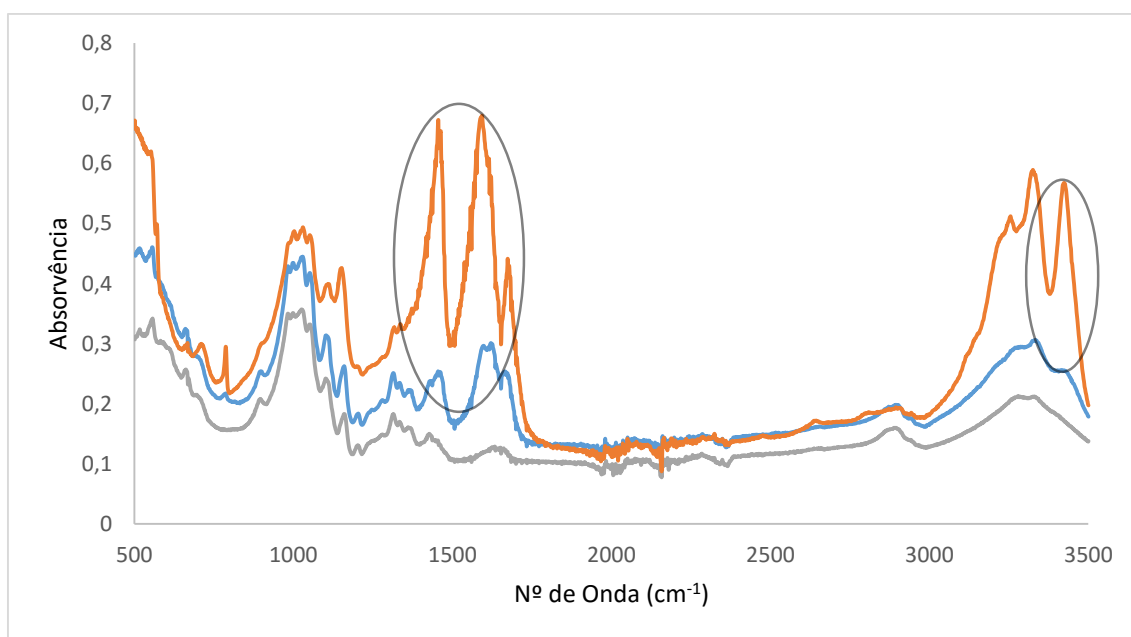


Figura 34 - Imagem de FTIR, comparação entre CN (cinzento), celulose embebida em solução de ureia de “40%” com agitação por 12 horas (azul) e amostra embebida em solução de ureia de “40%” com agitação por 12 horas sujeita a 5 minutos de irradiação micro-ondas a potência de 248 W (laranja).

Como podemos verificar, pela análise da figura 34, os picos assinalados na figura 33 estão igualmente presentes para uma concentração de ureia superior.

Para melhor se compreender qual o efeito da concentração de ureia, quando a amostra é irradiada por micro-ondas, fez-se uma comparação entre uma amostra de celulose nativa e as duas amostras irradiadas (figura 35).

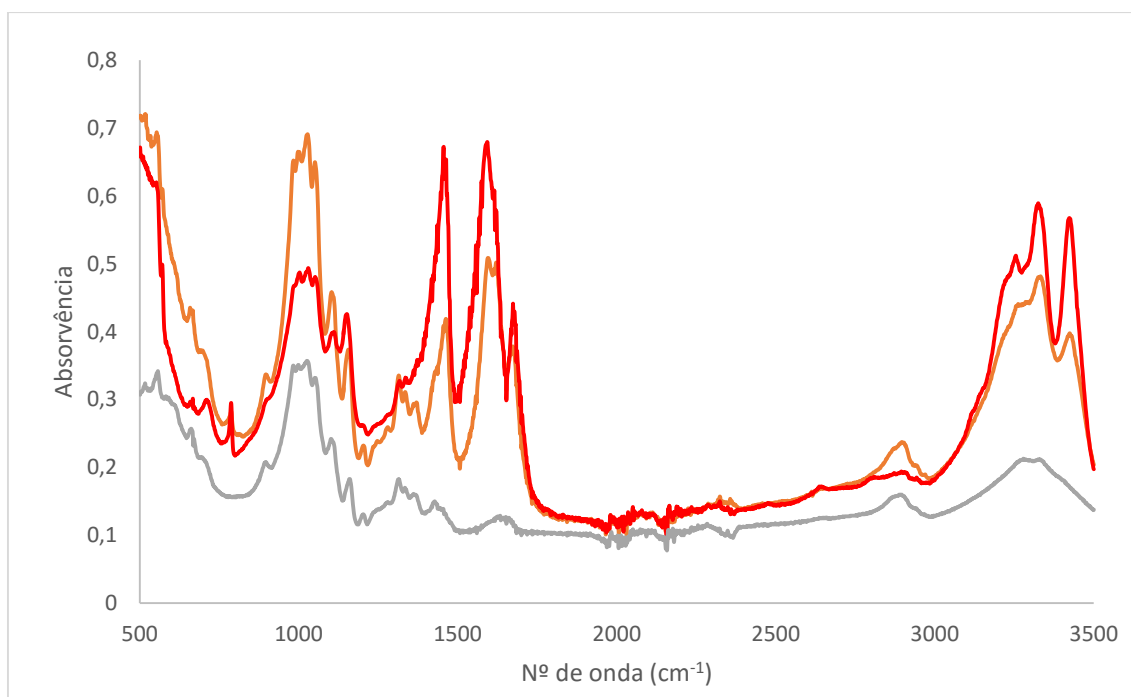


Figura 35 - Imagem de FTIR, comparação entre CN (cinzento), amostra embebida em solução de ureia de “20%” com agitação por 12 horas e sujeita a 5 minutos de irradiação micro-ondas a potência de 248 W (laranja) e amostra embebida em solução de ureia de “40%” com agitação por 12 horas e sujeita a 5 minutos de irradiação micro-ondas a potência de 248 W (vermelho).

De uma forma global, verifica-se que os picos, atrás referidos, são mais intensos no caso da amostra de 40% de ureia do que na amostra de 20%. Assim, a transformação das amostras de celulose em carbamato de celulose será mais eficiente com uma maior quantidade de ureia disponível no meio.

A diminuição do DP e o surgir de novos modos vibracionais são fortes indicadores que sugerem que a formação do CC foi atingida.

3.1.2.3. Análise reológica

Estudos anteriores [31] revelam a viabilidade da dissolução de CN em TBAOH em concentrações de até 10%. Tentamos também dissolver CC em TBAOH, nas concentrações de 0,5, 2 e 4%, tendo cada amostra uma massa total de 1 g.

Na maioria dos casos a dissolução foi total, procedendo-se de seguida a alguns testes reológicos com vista à caracterização das amostras.

Seguindo a mesma abordagem da análise de FTIR, onde as amostras com maior transformação foram as de 5 minutos, apresentam-se apenas as análises destas.

Nos testes rotacionais, a temperatura foi variada entre 20 até 50 °C (com 13 intervalos). A viscosidade foi determinada a cada temperatura após 30 s de equilíbrio.

Como é possível verificar na figura 36, a viscosidade diminui com o aumento da temperatura. De um modo geral, à temperatura inicial a viscosidade é maior para as amostras que foram irradiadas com menor potência, observando-se o inverso para a temperatura final.

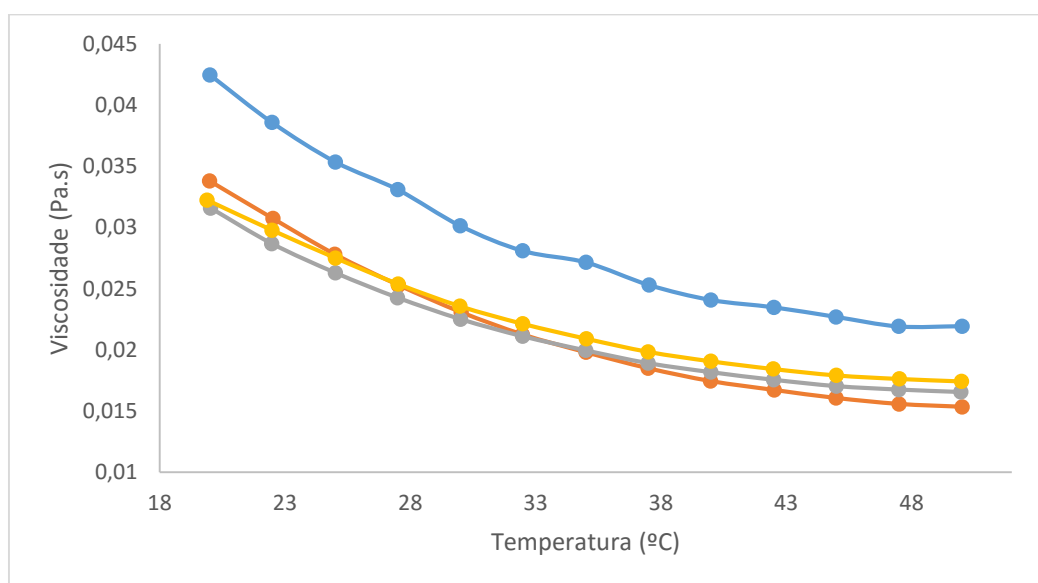


Figura 36 - Teste rotacional com variação de temperatura para amostra com 0,5% de CC dissolvido em TBAOH, utilizando uma solução de 20% de ureia no processo de transformação de CN em CC. Amostra sem exposição a radiação micro-ondas (azul), amostra sujeita a 247 W (laranja), amostra sujeita a 285 W (cinzento), amostra sujeita a 360 W (amarelo).

Esta constatação da diminuição da viscosidade com o aumento da temperatura deve-se essencialmente a um aumento da energia cinética das partículas, sendo que estas quando em movimento passam menos tempo em contacto entre si, o que provoca uma diminuição das interações intermoleculares resultando na diminuição da viscosidade.

O gráfico da figura 37 mostra uma diminuição semelhante, para uma concentração de ureia maior (40%) verificando-se, no entanto que esta diminuição da viscosidade com a temperatura é mais acentuada.

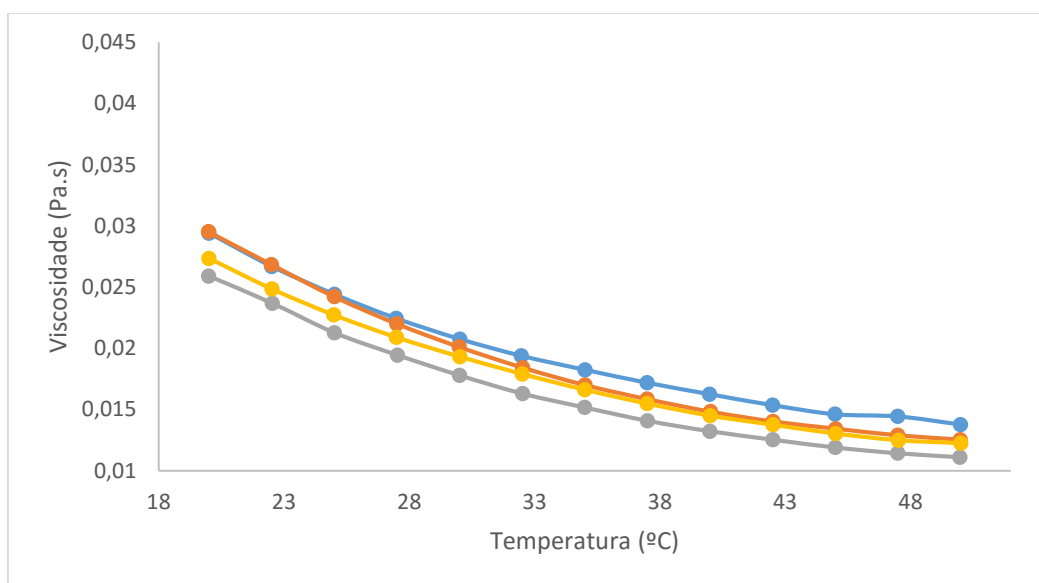


Figura 37 - Teste rotacional com variação de temperatura para amostra com 0,5% de CC dissolvido em TBAOH, utilizando uma solução de 40% de ureia no processo de transformação de CN em CC. Amostra sem exposição a radiação micro-ondas (azul), amostra sujeita a 247 W (laranja), amostra sujeita a 285 W (cinzento), amostra sujeita a 360 W (amarelo).

Comparando as figuras 36 e 37 verificamos que quanto maior a concentração de ureia na amostra menor será a viscosidade à medida que se aumenta a temperatura. Esta diminuição deve-se em parte à diminuição do DP com o tratamento por micro-ondas. Isto é, quanto menor o DP, menor a viscosidade.

3.1.2.4. Energia de ativação

Como visto anteriormente, a celulose é difícil de solubilizar, formando frequentemente agregados, as soluções não são estáveis com o decorrer do tempo e com as variações de temperatura. Isto pode ser destacado pelo cálculo da energia de ativação de viscosidade dinâmica, um parâmetro que é muito sensível a qualquer variação do estado da solução durante as experiências de tensão de corte realizadas no reómetro. As alterações na organização da solução, tais como a gelificação, a degradação da celulose ou do solvente, são fenómenos que influenciam fortemente os valores da energia de ativação [80].

A energia de ativação do processo de fluxo das soluções de CC pode ser extraída através dos gráficos 36 e 37.

Representando o $\ln(\eta)$ em função de $1/T$ (equação 11) é possível obter E_a pelo declive da reta da equação ($y = m x + b$) (ver gráficos 38 e 39).

Com estes valores obtidos traçaram-se retas com o aspeto linear ($y = m x + b$), com o intuito de obter o valor do declive (m) para obtenção da energia de ativação (E_a), com base na equação de Arrhenius:

$$\ln \eta = \ln A * \frac{E_a}{RT} \quad (11)$$

Em que η é a viscosidade, T é a temperatura, A é o fator pré-exponencial e R a constante dos gases perfeitos tendo neste caso sido usado o valor $R = 8,314462 \text{ Pa m}^3 \text{ K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$.

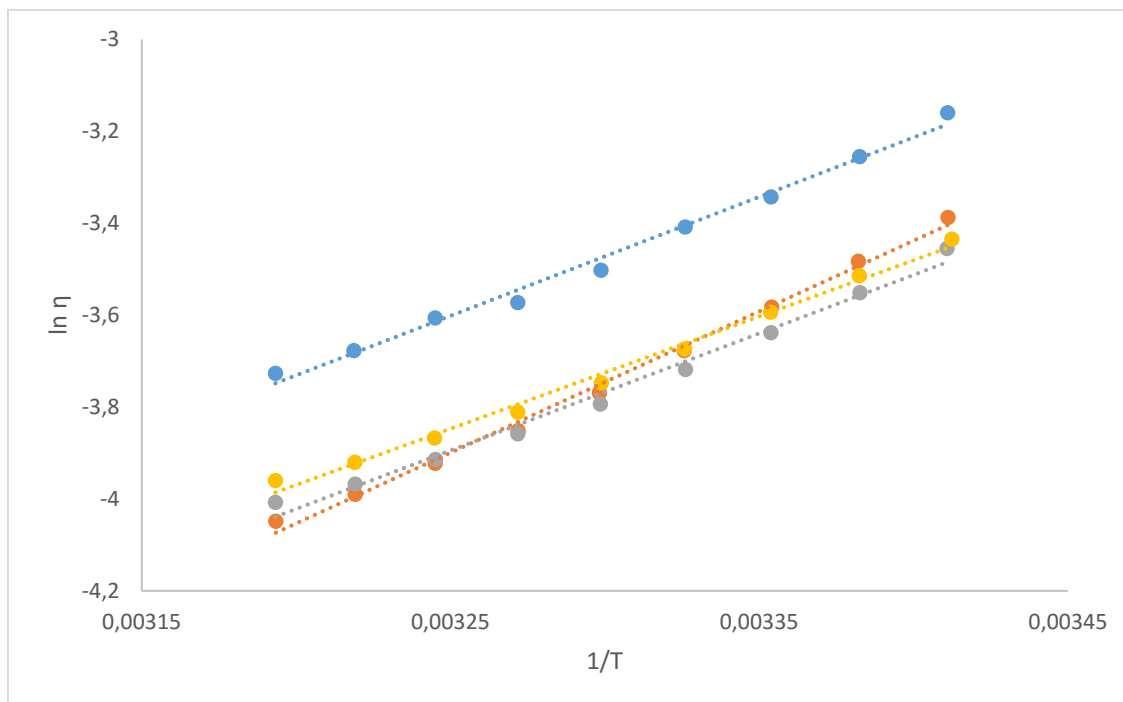


Figura 38 - Logaritmo de base natural da viscosidade em função do inverso da temperatura. Teste rotacional com variação de temperatura para amostra com 0,5% de CC dissolvido em TBAOH, utilizando uma solução de 20% de ureia no processo de transformação de CN em CC. Amostra sem exposição a radiação micro-ondas (azul), amostra sujeita a 247 W (laranja), amostra sujeita a 285 W (cinzento), amostra sujeita a 360 W (amarelo).

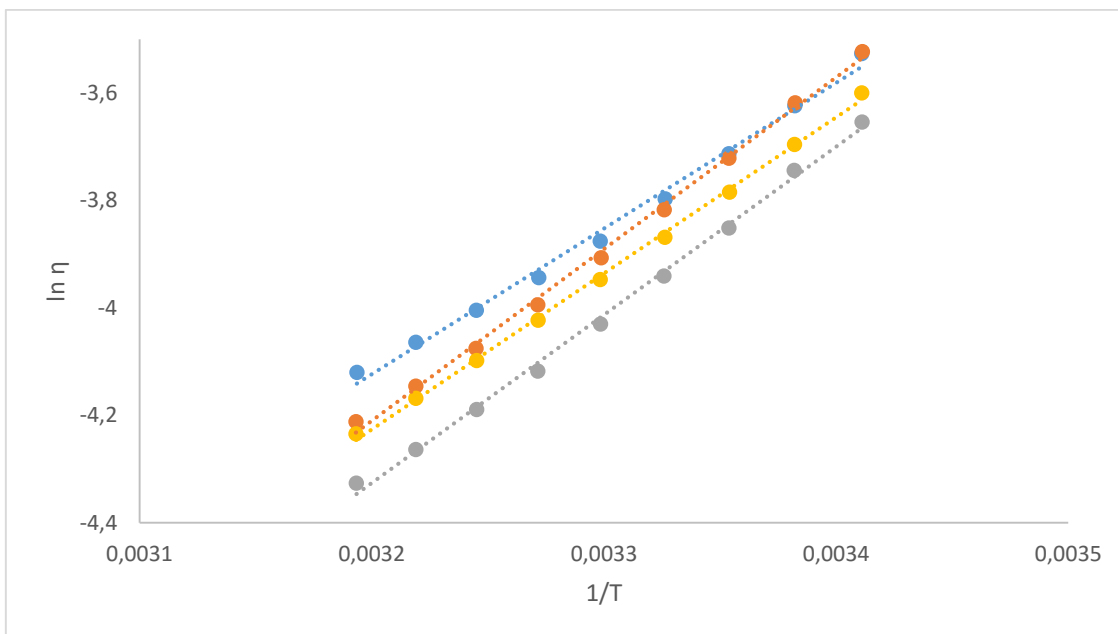


Figura 39 - Logaritmo de base natural da viscosidade em função do inverso da temperatura. Teste rotacional com variação de temperatura para amostra com 0,5% de CC dissolvido em TBAOH, utilizando uma solução de 40% de ureia no processo de transformação de CN em CC. Amostra sem exposição a radiação micro-ondas (azul), amostra sujeita a 247 W (laranja), amostra sujeita a 285 W (cinzento), amostra sujeita a 360 W (amarelo).

A energia de ativação expressa a dificuldade que a cadeia polimérica tem em mover-se de uma posição para outra. Pela análise da figura 40, podemos depreender que a energia de ativação diminui com o aumento da potência de irradiação das amostras.

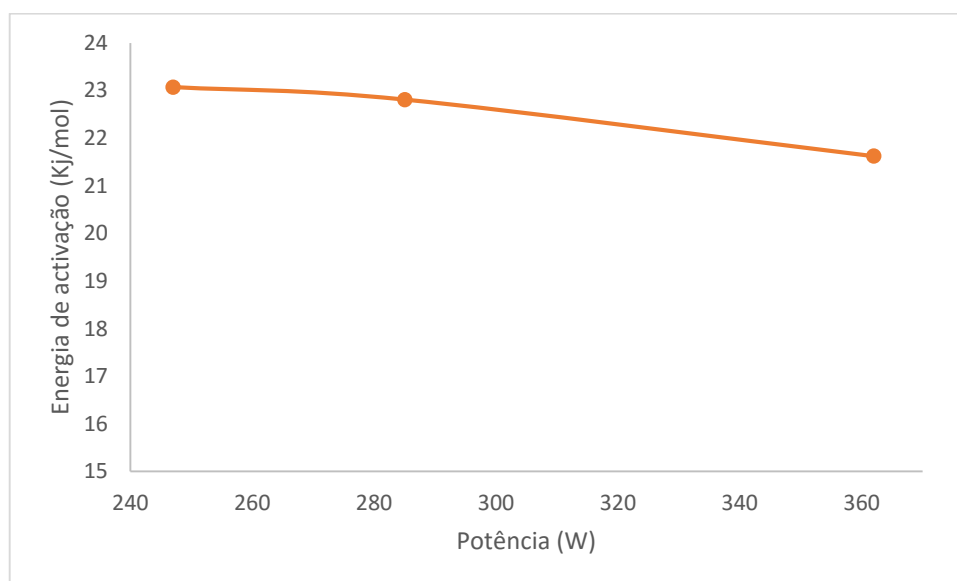


Figura 40 - Variação da energia de ativação em função da potência de irradiação das amostras durante 5 minutos, para amostras dissolvidas em TBAOH com 0,5% de CC dissolvido. Amostra transformada com 40% de Ureia

3.2. Hidrogéis

3.2.1. Hidrogéis de carbamato de celulose

Para elaboração dos hidrogéis foram dissolvidas amostras de carbamato de celulose (irradiadas durante 5 minutos à potência de 247 W) e de celulose nativa, com diferentes concentrações (8 e 10%), em TBAOH. Após dissolução do material a mistura foi depositada, na superfície de placas de Petri, de modo a obter um filme, que depois foi mergulhado numa tina com um solvente. Para este ensaio de gelificação foram utilizadas quatro abordagens distintas: na primeira depositou-se a amostra numa tina com uma mistura de etanol com 0,2% de genipina; na segunda depositou-se somente em etanol; na terceira somente em água destilada; na quarta foi utilizado um banho de etanol, posterior lavagem em água destilada, seguido de deposição numa tina com uma mistura de etanol com 0,2% de genipina.

Em todos os casos se formaram filmes que foram retiradas do banho, passadas 24 horas. Foi recortada uma parte e enviada para análise de espectroscopia de FTIR. O espectro obtido da análise, para as diferentes concentrações de CC e CN, é globalmente semelhante ao do representado pela figura 41, sendo apenas este apresentado para uma concentração.

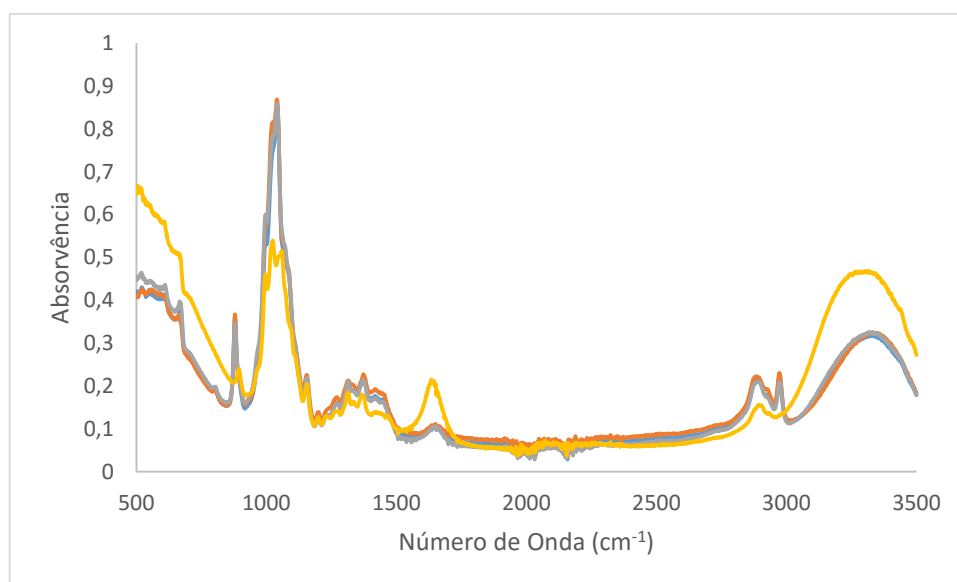


Figura 41 - Análise por FTIR de amostras com 10% de CC, dissolvido em TBAOH, utilizando diferentes meios de gelificação: abordagem 1 (azul); abordagem 2 (cinza); abordagem 3 (amarelo); abordagem 4 (laranja).

A amostra de controlo, que foi mergulhada em água destilada após a dissolução de carbamato de celulose em TBAOH, encontra-se representada a amarelo. Apesar dos diferentes banhos onde foram imersas, todas as outras amostras revelam um comportamento semelhante. Destaca-se o aumento do pico a 880 cm^{-1} que poderá ser devido ao aumento de ligações duplas entre cadeias carbonadas $\text{R}_2\text{C}=\text{CH}_2$. Também se nota a diminuição de intensidade do pico entre 1550 e 1750 cm^{-1} e o aparecimento de um novo pico a 2970 cm^{-1} , que poderá ser devido à presença de C-H alifáticos, ou seja, à quebra de compostos cíclicos e ao aparecimento de cadeias acíclicas [80, 81].

Qualitativamente não se observaram variações significativas nos espectros de FTIR para os diferentes anti solventes usados. Todos os filmes são muito semelhantes.

3.2.2. Hidrogéis de quitosano

Os géis de CC, apesar de interessantes, não foram posteriormente estudados. A estratégia passou pela utilização do quitosano uma vez que este pode formar géis químicos com genipina ao passo que o CC aparentemente não forma.

Na figura 42 estão hidrogéis de quitosano preparados com diferentes concentrações de genipina e de quitosano.

A tonalidade azul é indicadora da reação química entre genipina e quitosano [81].

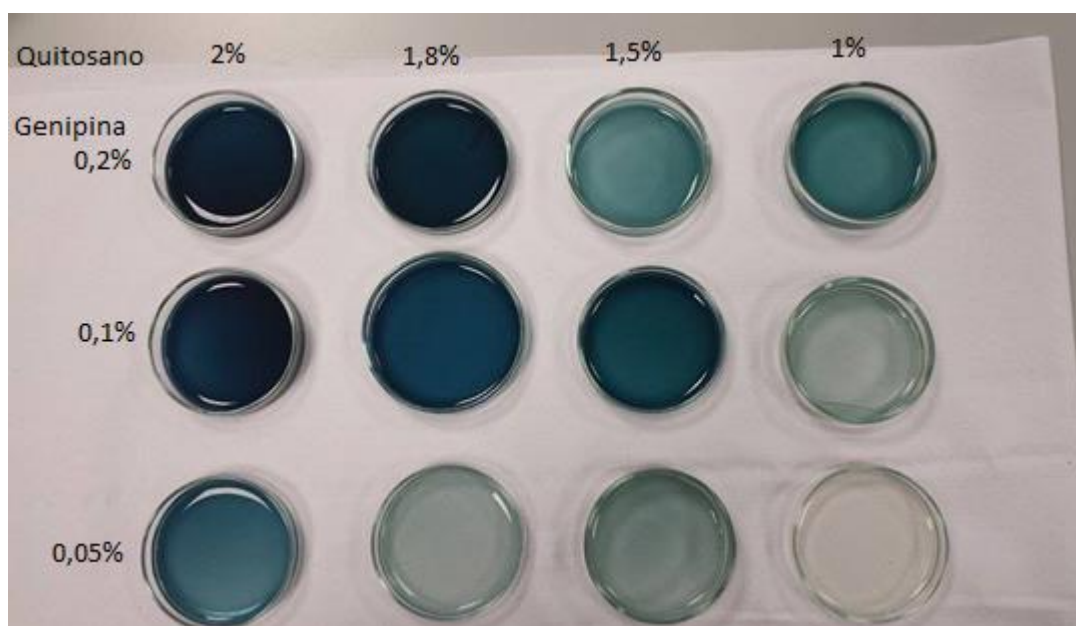


Figura 42 - Hidrogéis elaborados com quitosano (2, 1,8, 1,5 e 1%) e genipina (0,1, 0,2 e 0,5%).

3.2.2.1. Análise reológica dos hidrogéis de quitosano

Nesta parte do trabalho tentou-se inferir da cinética de formação dos hidrogéis por reologia e UV.

Foi realizado um teste oscilatório com frequência e tensão constante, respetivamente 1 Hz e 1Pa, sendo adquirido um ponto a cada 30 segundos, à temperatura ambiente (25°C). Este teste permite avaliar a evolução dos G' e G'' de modo a saber quando a amostra gelifica. Em termos reológicos a gelificação ocorre quando o G' e o G'' se intersectam. No gráfico está também representada uma curva δ que corresponde à divisão do G'' pelo G' , sendo este valor representado em graus, entre 90° (comportamento puramente sólido) e 0° (comportamento puramente líquido), (figura 43).

Como se pode ver na figura 43, a amostra é inicialmente líquida ($G'' > G'$) e ao fim de cerca de 8400s os dois módulos intersectam-se atribuindo-se a este ponto o tempo necessário para gelificar a amostra.

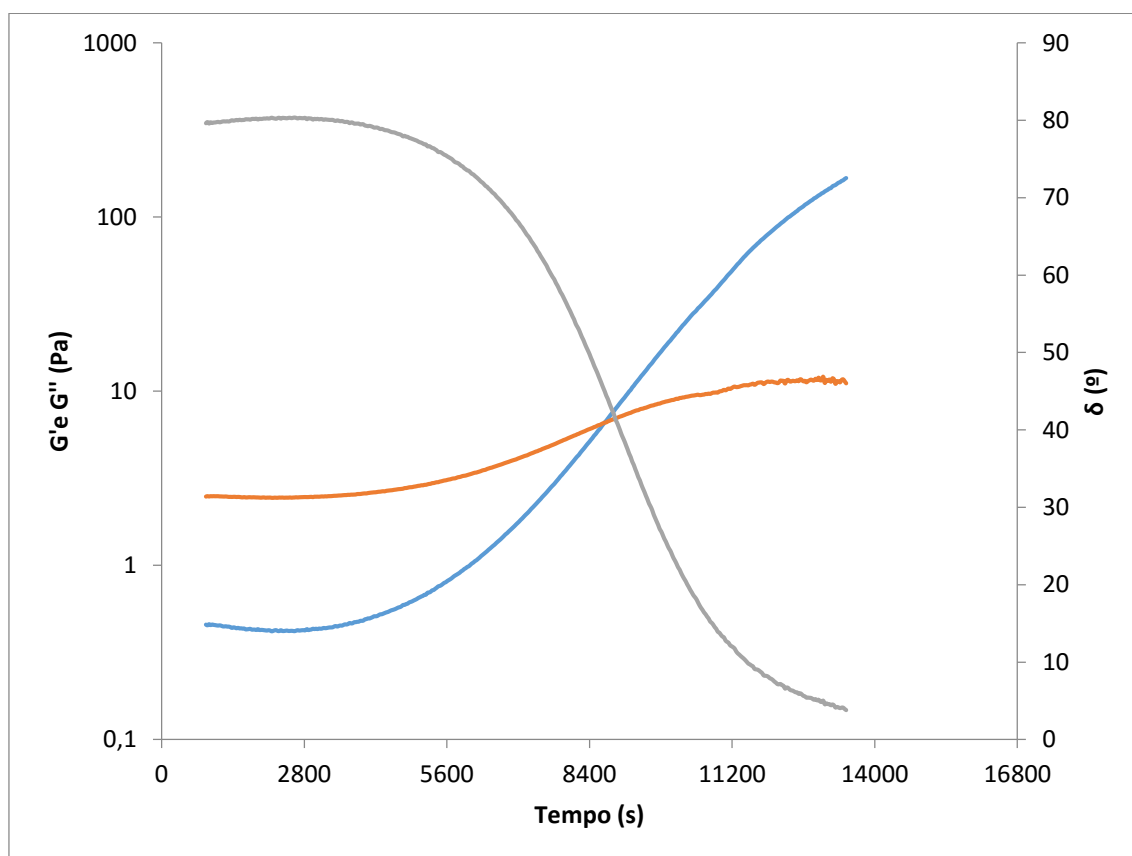


Figura 43 - Teste oscilatório de uma amostra com 2% de quitosano e 0,2% de genipina. G' em Pa (azul) G'' em Pa (laranja), δ em graus (cinzento).

Foram efetuados testes com várias fontes de quitosano (diferentes pesos moleculares) para verificar qual o efeito do peso molecular na cinética de gelificação. As fontes utilizadas foram quitosano de baixo peso molecular (figura 44), quitosano de peso molecular médio (figura 45), e quitosano designado como “Coarse ground flakes and powder” (figura 46).

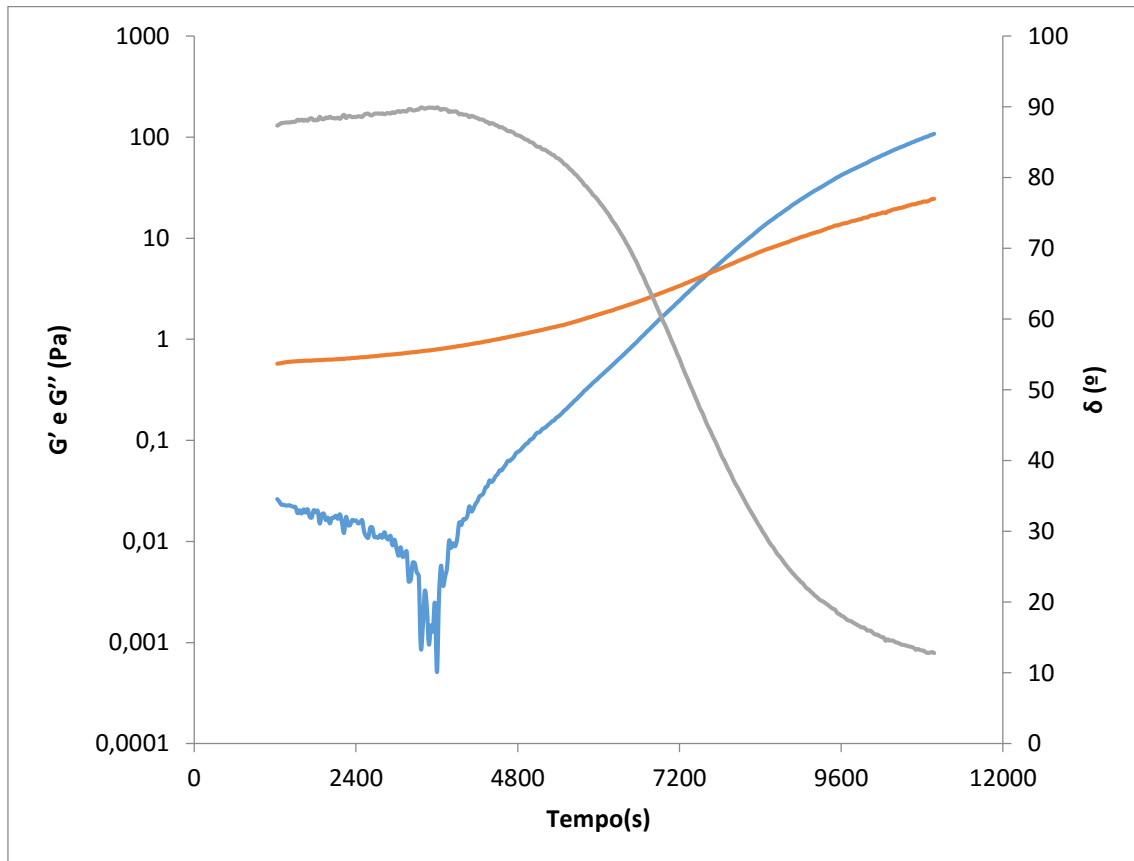


Figura 44 - Teste oscilatório de uma amostra com 2% de quitosano de baixo peso molecular e 0,2% de genipina. G' em Pa (azul) G'' em Pa (laranja), δ em graus (cinzento).

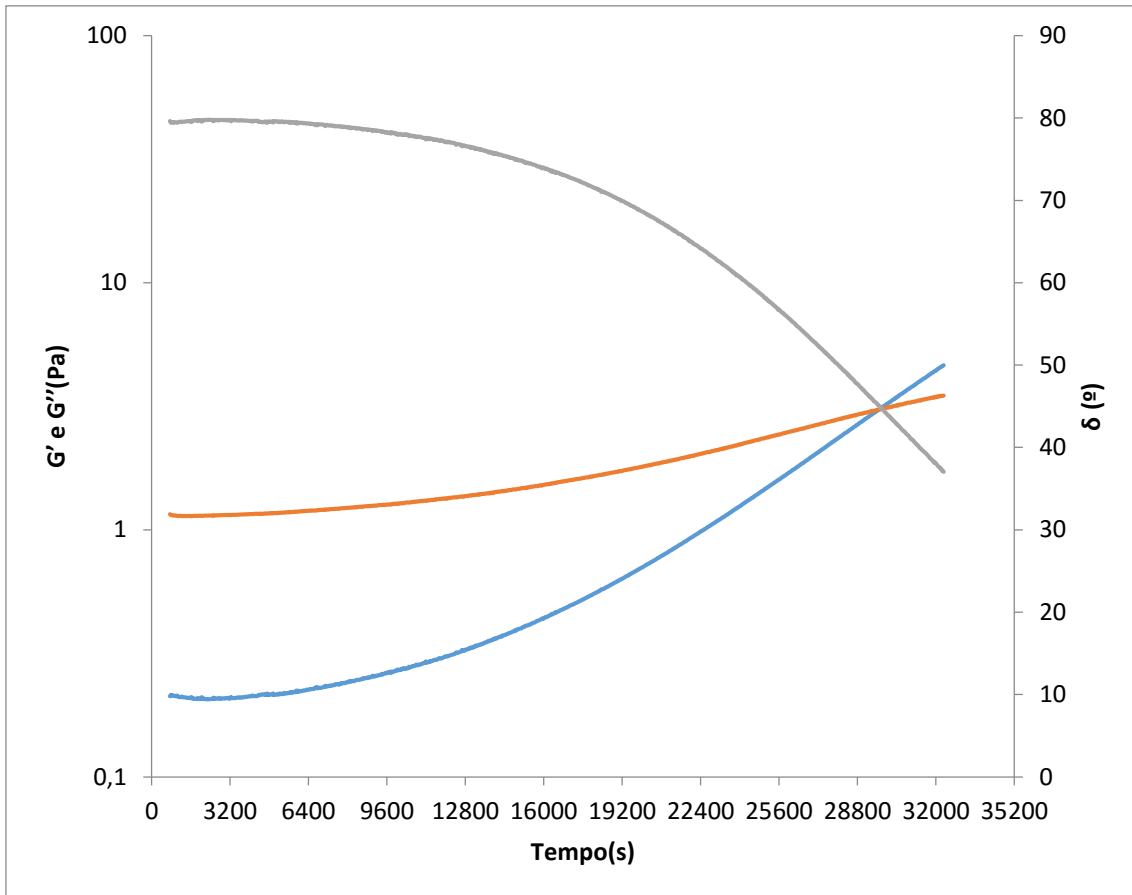


Figura 45 - Teste oscilatório de uma amostra com 2% de quitosano de peso molecular médio e 0,2% de genipina. G' em Pa (azul) G'' em Pa (laranja), δ em graus (cinzento).

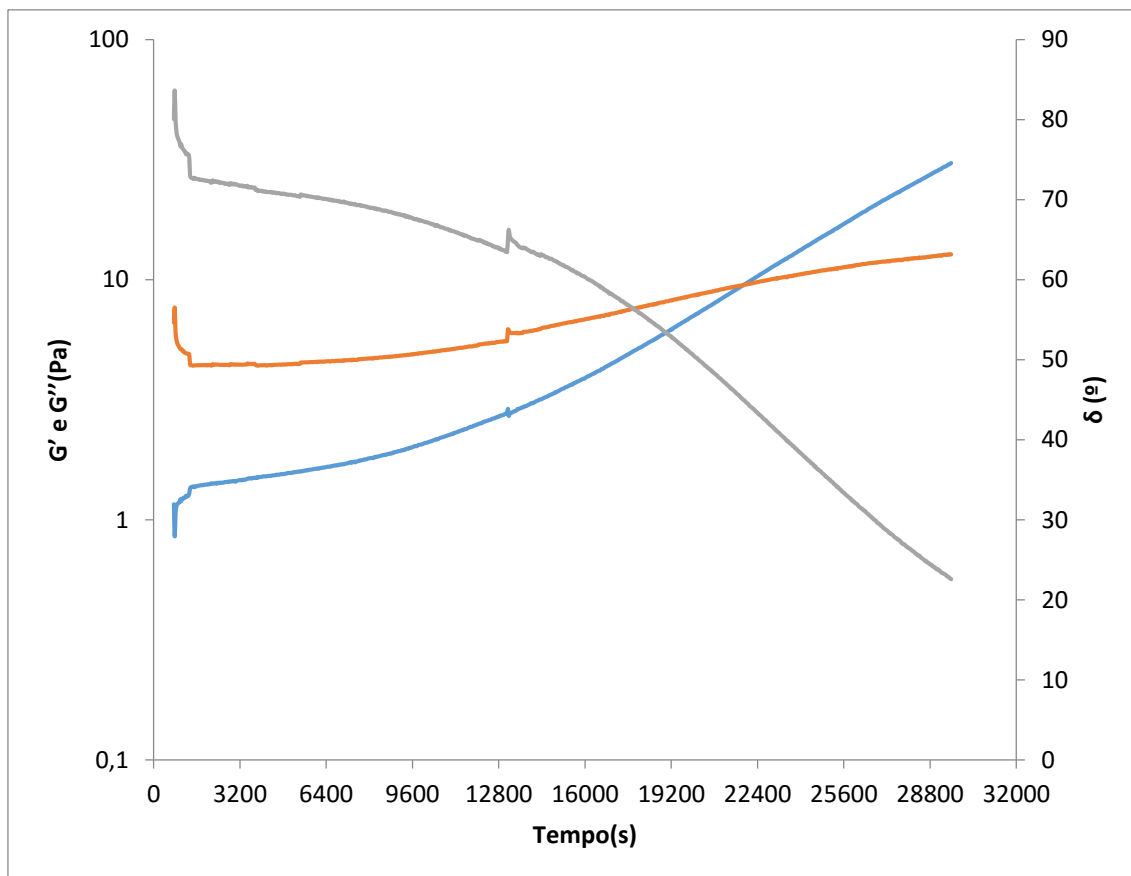


Figura 46 - Teste oscilatório de uma amostra com 2% de quitosano “Coarse ground flakes and powder” e 0,2% de genipina. G' em Pa (azul) G'' em Pa (laranja), δ em graus (cinzento).

Em todos os exemplos se observa a gelificação da amostra. Surpreendentemente, quanto menor o peso molecular mais rápido se dá a gelificação, como se pode ver na tabela 1.

Tabela 1 - Comparação entre as amostras de quitosano e respectivos tempos de gelificação

Amostras com 2% de quitosano e 0,2% de genipina	Tempo de gelificação (s)
Original	8700
Baixo peso molecular	7590
Peso molecular médio	29700
Coarse ground flakes and powder	21840

A amostra de “Coarse ground flakes and powder” tem um peso molecular intermédio, entre a amostra de baixo e médio peso molecular. A amostra, utilizada para

elaboração dos vários ensaios de comparação da influência da concentração de genipina e quitosano para a formação de hidrogéis, tem um peso molecular aproximado da amostra de baixo peso molecular.

De acordo com a análise da figura 47 existe, de um modo geral, uma diminuição do tempo de gelificação com o aumento da concentração de quitosano. O menor tempo de gelificação ocorre para a concentração de 1,8% de quitosano.

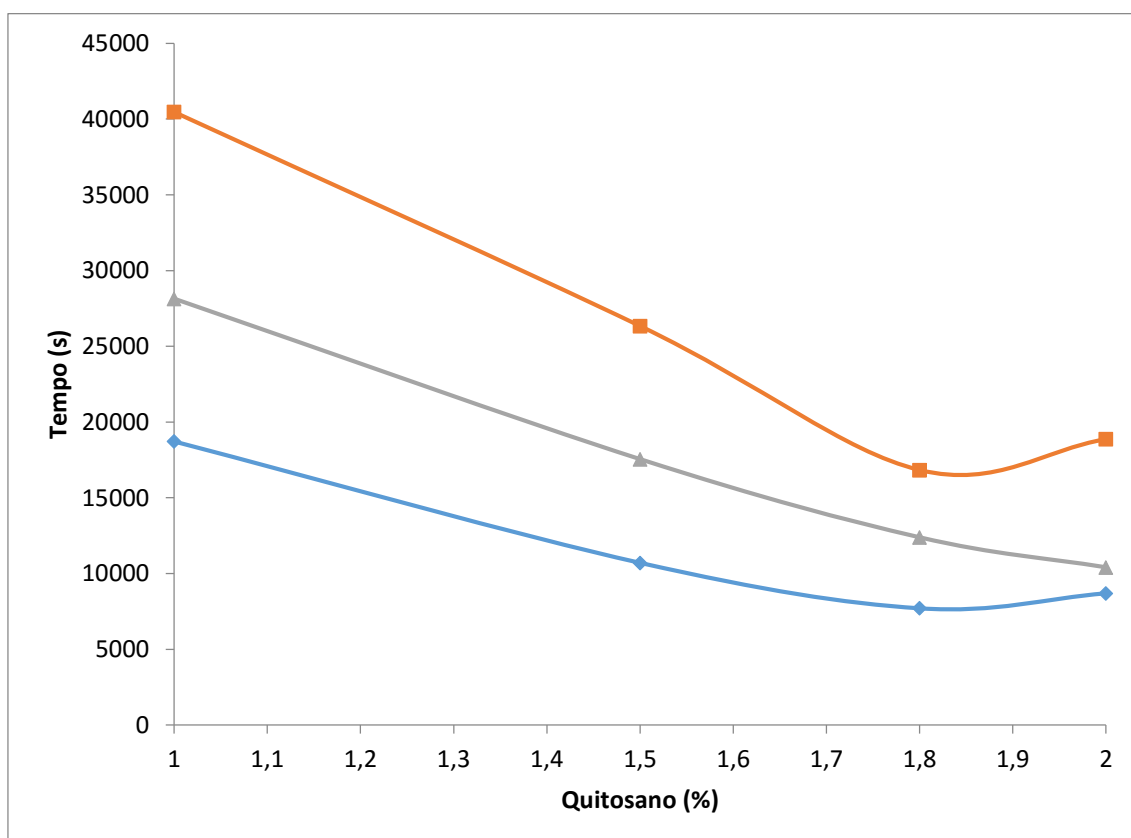


Figura 47 - Análise comparativa do tempo de gelificação em função da concentração de quitosano utilizado na preparação da amostra. Amostra com 0,2% de genipina (azul), amostra com 0,1% de genipina (cinzento), amostra com 0,05% de genipina (laranja).

Na figura 48 verifica-se, de forma análoga, que existe uma diminuição do tempo de gelificação com o aumento da concentração de genipina. Pode-se verificar que, também neste caso, a amostra onde foi utilizado 1,8% de quitosano obtém um ponto de gelificação mais rápido que a amostra onde foi utilizado 2%, como já se tinha constatado na figura 47.

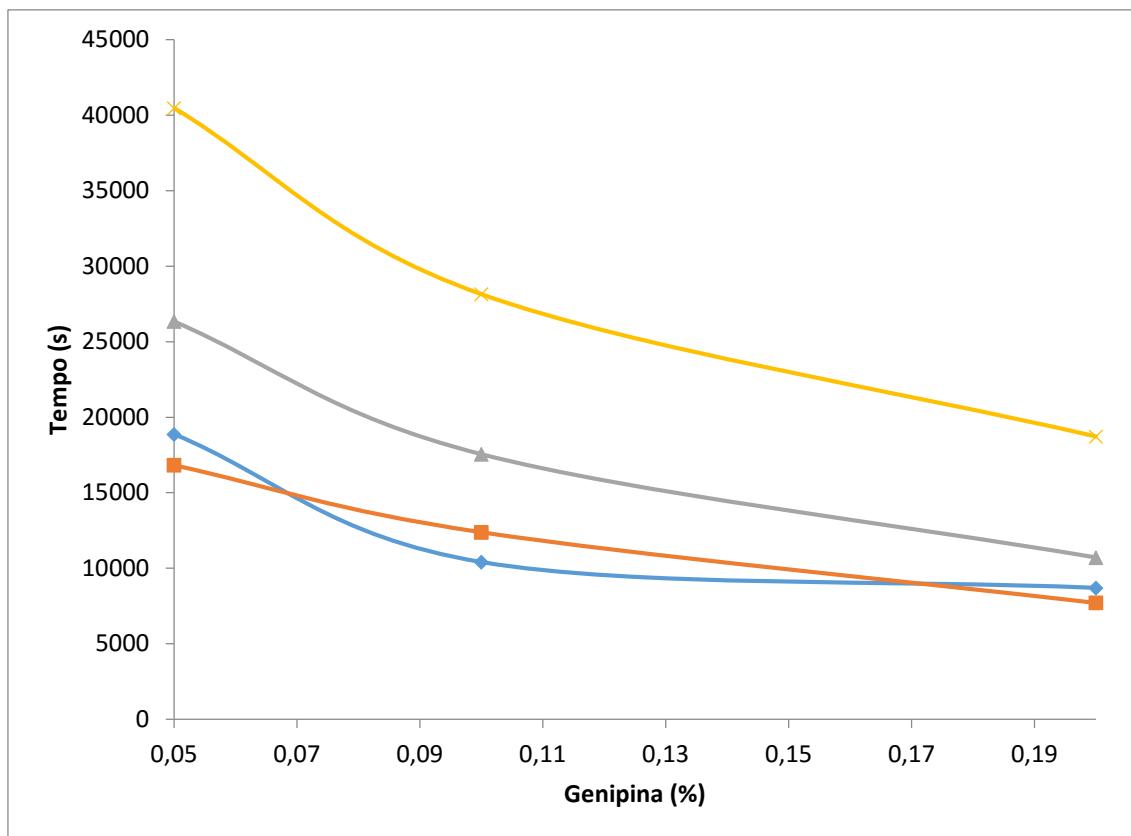


Figura 48 - Análise comparativa do tempo de gelificação em função da concentração de genipina utilizado na preparação da amostra. Amostra com 2% de quitosano (azul), amostra com 1,8% de quitosano (laranja), amostra com 1,5% de quitosano (cinzento) e amostra com 1% de quitosano (amarelo).

3.2.2.2. Análise de espectrometria UV/visível

A gelificação pode também ser seguida por espectroscopia de UV/visível uma vez que as amostras ficam azuladas (ver figura 42). Portanto, ao mesmo tempo que a análise reológica decorria foi também feita uma análise espectroscópica das mesmas amostras.

Todas as amostras apresentam um comportamento semelhante ao da figura 49, tendo sido esta escolhida como exemplo representativo.

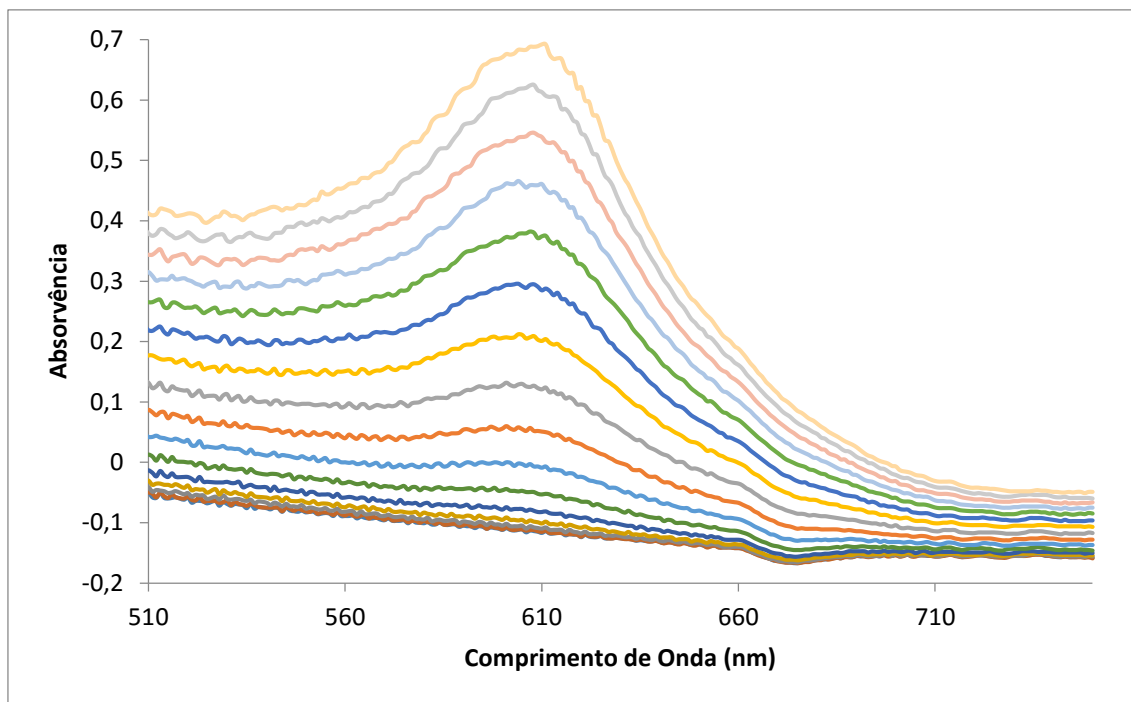


Figura 49 - Variação do espectro de absorção de uma amostra 1,8% de quitosano e 0,1% de genipina, ao longo de 4 horas e 15 minutos, para um espectro compreendido ente 510 e 750 nm. Cada curva representa uma medição efetuada a cada 15 minutos, desde o início da reação.

Como é possível na sua análise depreender com o decorrer da reação, existe um aumento da absorvência para o comprimento de onda de 600 nm. Para melhor se analisar a variação da intensidade da absorvência a 600 nm foram representados num gráfico, como ilustra a figura 50, todos os valores obtidos ao longo do tempo a que as medições foram efetuadas. Estes pontos foram depois adaptados a uma linha de tendência para extrair o ponto de inflexão da curva, ponto este obtido através das derivadas da equação associada à curva [82]. O ponto de inflexão obtido corresponde ao ponto de gelificação de cada hidrogel.

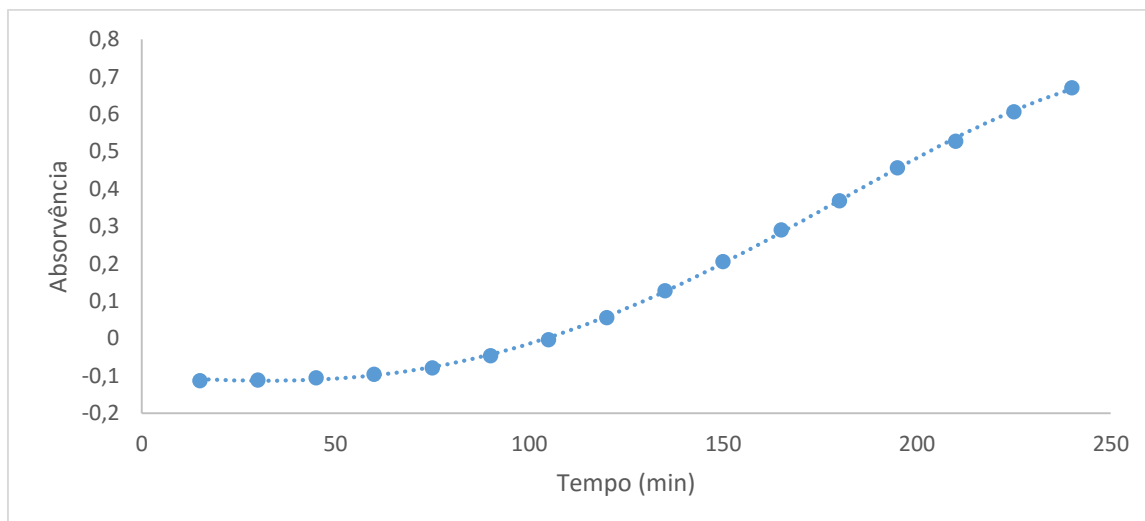


Figura 50 - Variação do espectro de absorção de uma amostra 1,8% de quitosano e 0,1% de genipina, ao longo de 4 horas e 15 minutos, para um pico de 600 nm. Os pontos obtidos foram ajustados a uma equação polinomial de grau 4 ($y = -5 \cdot 10^{-10} x^4 - 2 \cdot 10^{-07} x^3 + 8 \cdot 10^{-07} x^2 - 0,0006x - 0,101$) e respetivo R^2 de 0,9998, tendendo para um máximo de absorção de 0,4.

Apresentam-se de forma análoga, nas figuras 51 e 52, mais dois gráficos correspondentes às amostras de 2,0% de quitosano e de 1,5% de quitosano.

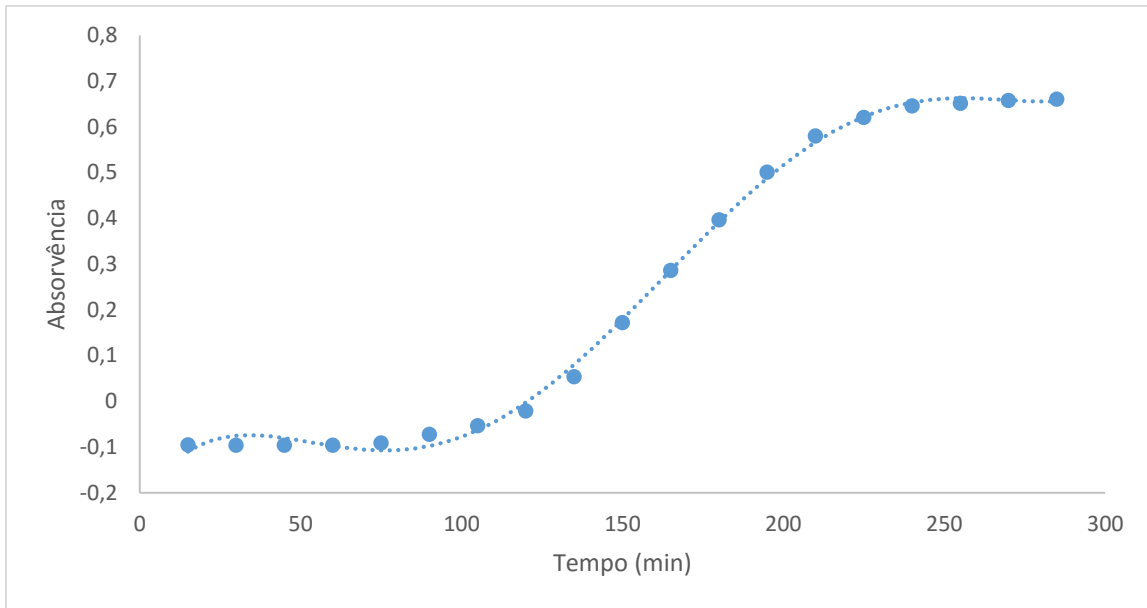


Figura 51 - Variação do espectro de absorção de uma amostra 2,0% de quitosano e 0,1% de genipina, ao longo de 4 horas e 45 minutos, para um pico de 600 nm. Os pontos obtidos foram ajustados a uma equação polinomial de grau 4 ($y = 1 \cdot 10^{-11}x^5 - 9 \cdot 10^{-09}x^4 + 3 \cdot 10^{-06}x^3 - 0,0003x^2 + 0,011x - 0,2215$) e respectivo R^2 de 0,9981, tendendo para um máximo de absorção de 0,7.

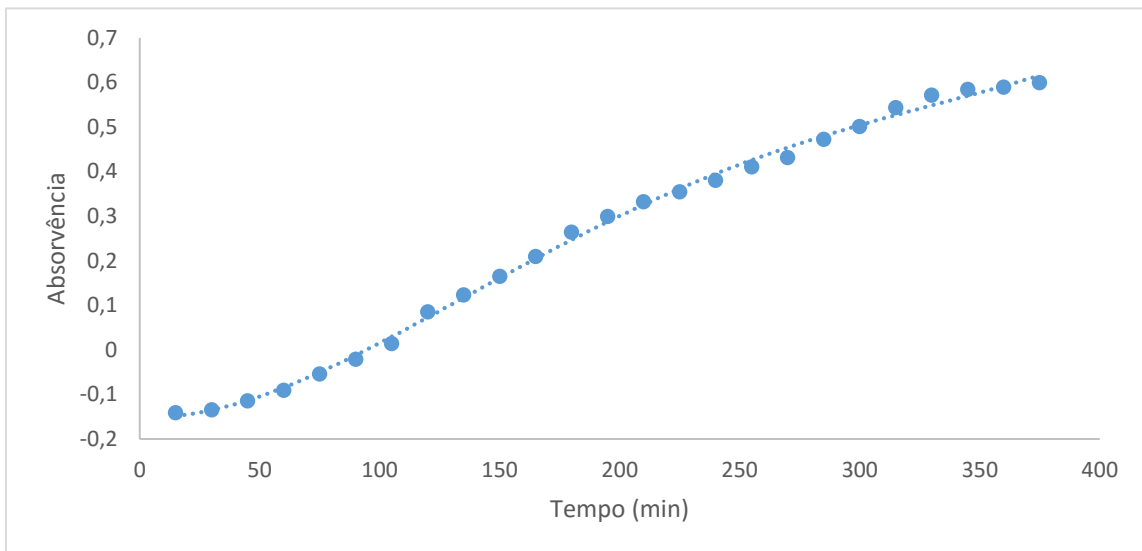


Figura 52 - Variação do espectro de absorção de uma amostra 1,5% de quitosano e 0,1% de genipina, ao longo de 6 horas e 15 minutos, para um pico de 600 nm. Os pontos obtidos foram ajustados a uma equação polinomial de grau 4 ($y = 1 \cdot 10^{-10}x^4 - 9 \cdot 10^{-08}x^3 + 3 \cdot 10^{-05}x^2 - 0,0002x - 0,1513$) e respectivo R^2 de 0,9978, tendendo para um máximo de absorção de 0,6.

A gelificação seguida por UV confirma de forma geral os resultados por reologia. A tabela 2 mostra uma compilação dos tempos de gelificação de todas as amostras, tanto analisadas por espectroscopia de UV/ visível como por reologia.

Tabela 2 - Comparação entre a medição dos tempos de gelificação por técnicas de espectroscopia de UV/visível e Reologia.

Quitosano (%)	Genipina (%)	UV/visível (min)	Reómetro (min)
2.0	0.20	145	147
	0.10	165	167
	0.05	285	289.5
1.8	0.20	120	124
	0.10	180	190.5
	0.05	270	275
1.5	0.20	150	158.5
	0.10	280	293
	0.05	435	442
1.0	0.20	315	315.5
	0.10	465	468
	0.05	675	680.5

Os dados da tabela 2 estão ilustrados no gráfico da figura 53, tendo este um aspeto semelhante ao da análise reológica (figura 48).

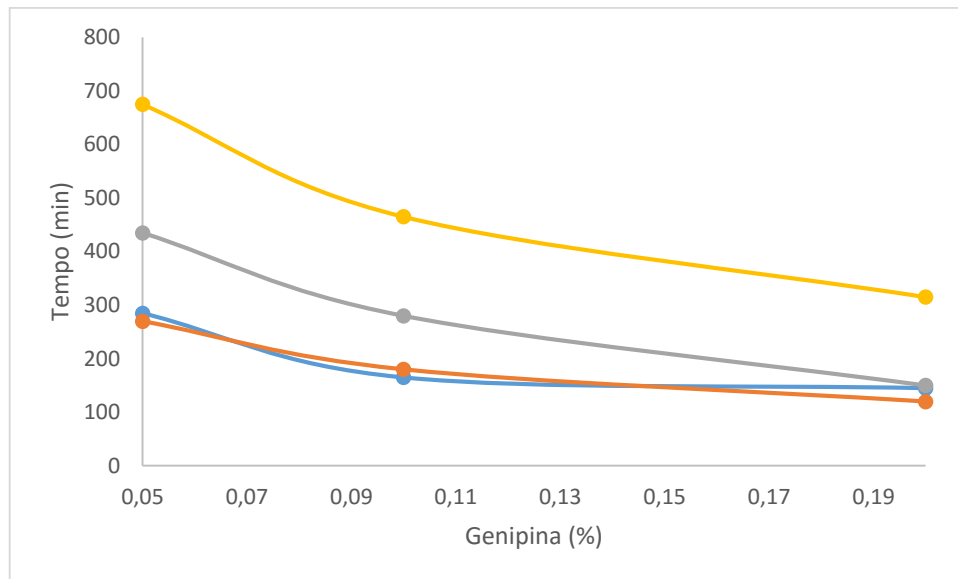


Figura 53 - Análise comparativa do tempo de gelificação em função da concentração de genipina utilizado na preparação da amostra. Amostra com 2% de quitosano (azul), amostra com 1,8% de quitosano (laranja), amostra com 1,5% de quitosano (cinzento) e amostra com 1% de quitosano (amarelo).

3.2.2.3. Adição de α ou β -ciclodextrina

Tendo em conta que a genipina é uma molécula anfifílica, foi testada a utilização de α -ciclodextrina (α -CD) e β -ciclodextrina (β -CD) para ver se a cinética de gelificação era alterada. Para simplificar as medições foi somente utilizada a concentração mais elevada de quitosano, ou seja, aquela cuja cinética de gelificação era mais rápida.

Na análise do tempo de gelificação (figura 54) vemos que, de um modo geral, a adição de β -CD aumenta o tempo de gelificação. Este aumento deve-se provavelmente à inserção de genipina na cavidade da β -CD (complexo “host-guest”), o que diminui a sua concentração disponível para formar o gel e conseqüentemente diminuir a cinética de gelificação.

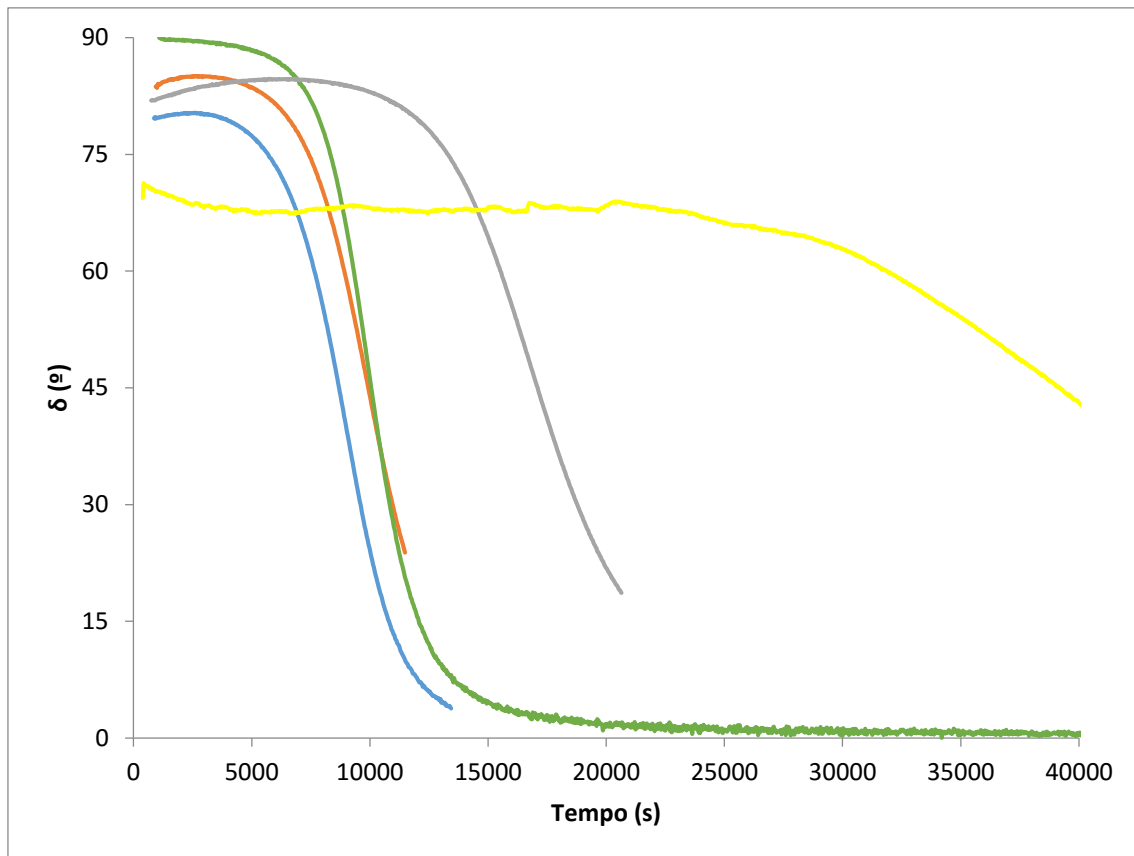


Figura 54 - Teste oscilatório de amostras com 2% de quitosano, 0,2% de Genipina e diferentes concentrações de β -CD, estando representada a variação de δ em graus em função do tempo de gelificação em segundos. Amostra sem β -CD (azul), amostra com 0,1% de β -CD (laranja), amostra com 0,2% de β -CD (verde), amostra com 0,4% de β -CD (cinzento), amostra com 1% de β -CD (amarelo).

Quando se utiliza α -CD em vez de β -CD o tempo de gelificação não se altera. Como a cavidade da α -CD é menor que a β -CD é provável que a interação com a genipina seja menos favorável e não se forme o complexo de inclusão “host-guest”. Consequentemente não se observam alterações significativas na cinética de gelificação (figura 55).

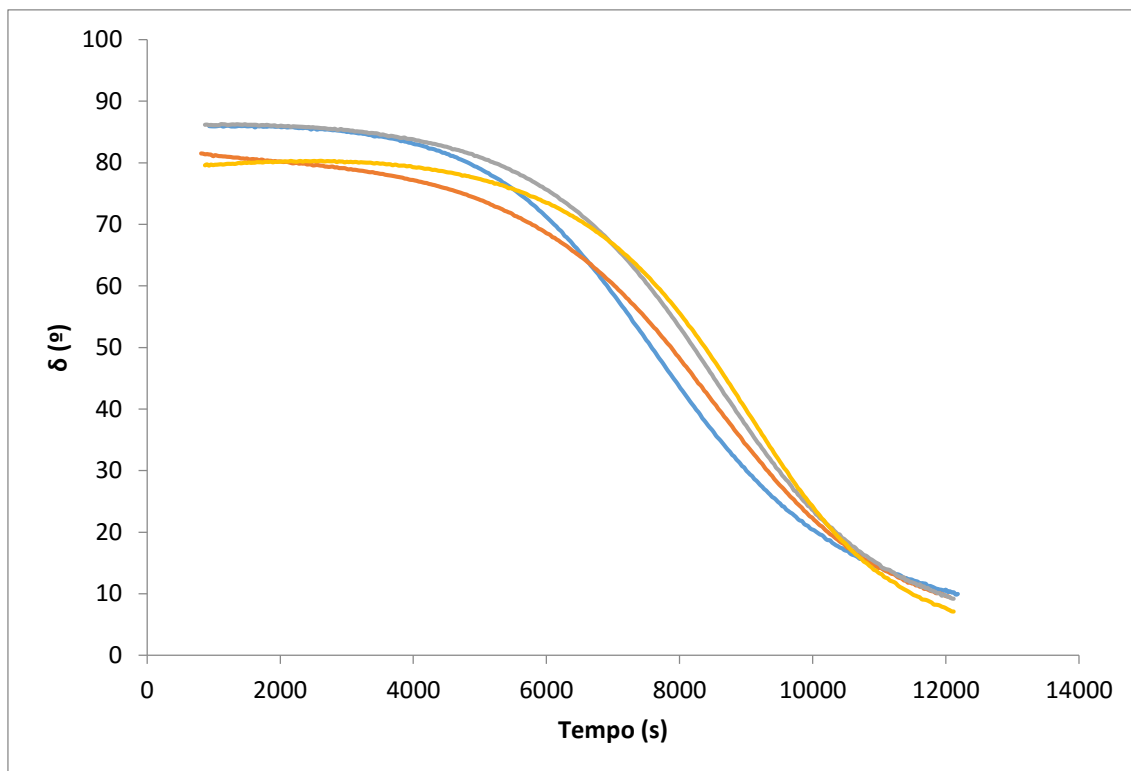


Figura 55 - Teste oscilatório de amostras com 2% de quitosano, 0,2% de genipina e diferentes concentrações de α -CD, estando representada a variação de δ em graus em função do tempo de gelificação em segundos. Amostra sem α -CD (amarelo), amostra com 0,1% de α -CD (laranja), amostra com 0,2% de α -CD (azul), amostra com 0,4% de α -CD (cinzento).

3.2.2.4. Análise SEM

Os hidrogéis formados foram também analisados relativamente à sua morfologia por microscopia eletrónica de varrimento no Laboratório de Coloides da Universidade de Coimbra pelo Dr. Luís Alves e por Cláudia Duarte, no âmbito de um projeto de investigação em curso entre a Universidade do Algarve e a Universidade de Coimbra (figuras 56, 57 e 58).

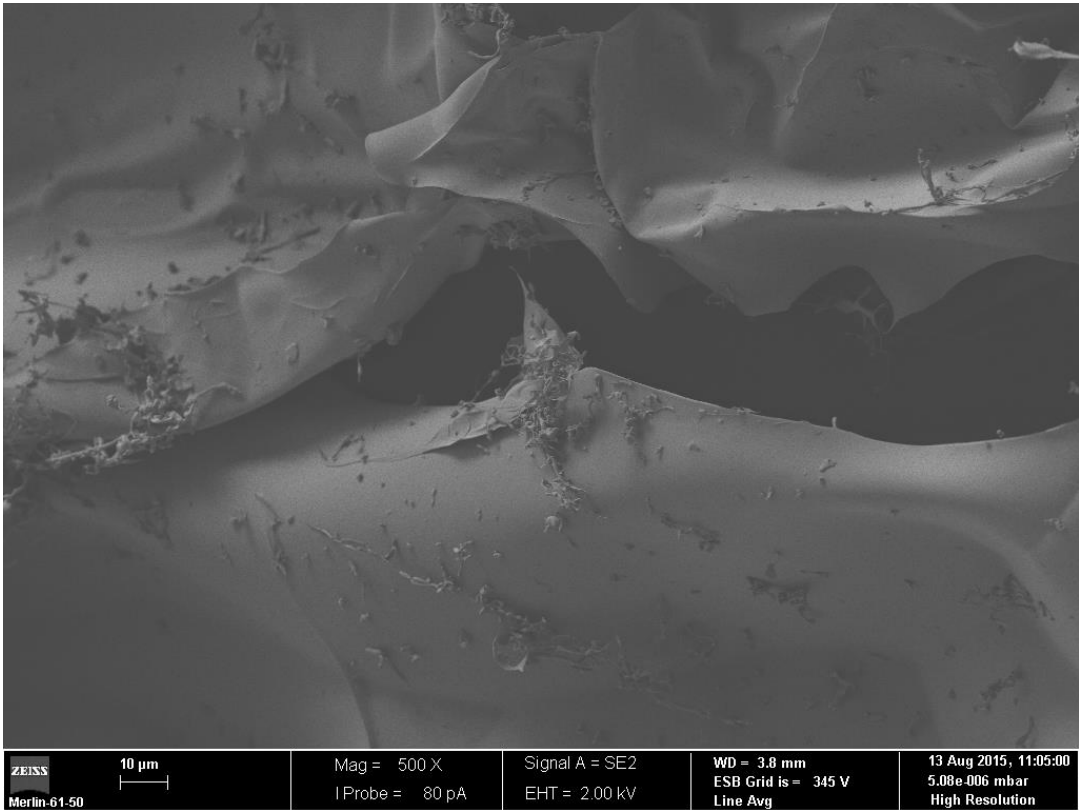


Figura 56 - Imagem ampliada 500X da estrutura de um hidrogel com concentração de 1% de quitosano e 0,2% de genipina (foto cedida pelo Dr. Luís Alves).

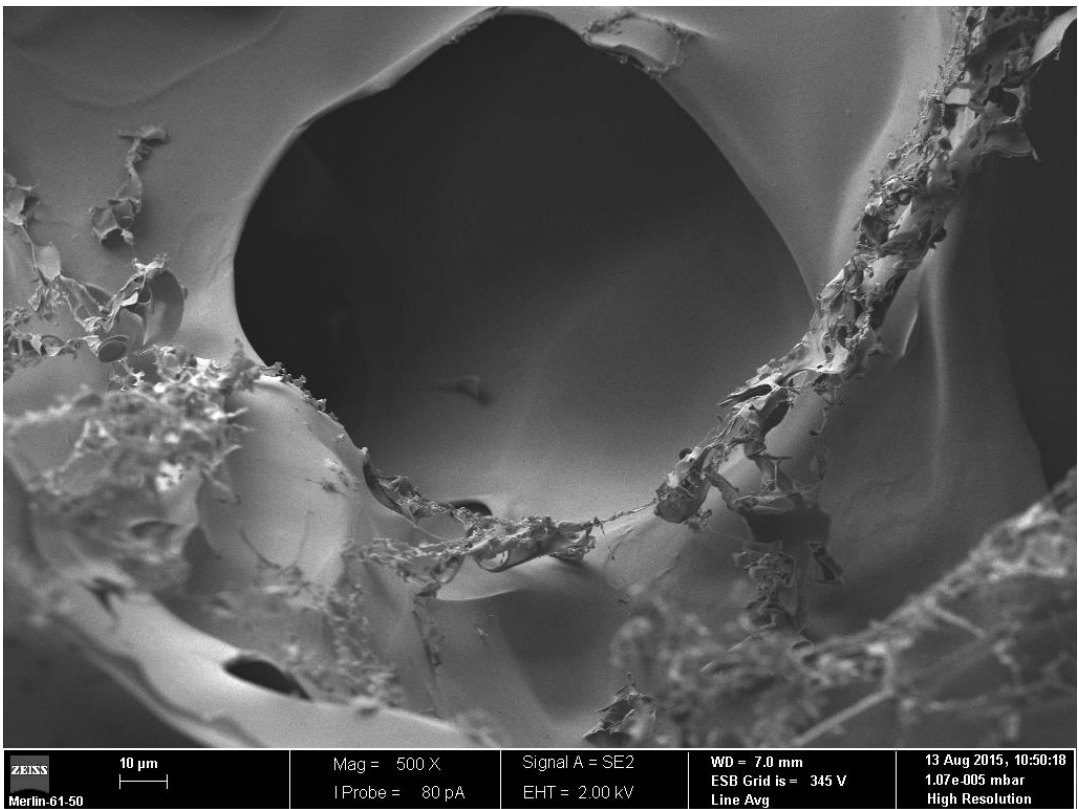


Figura 57 - Imagem ampliada 500X da estrutura de um hidrogel com concentração de 2% de quitosano e 0,2% de genipina (foto cedida pelo Dr. Luís Alves).

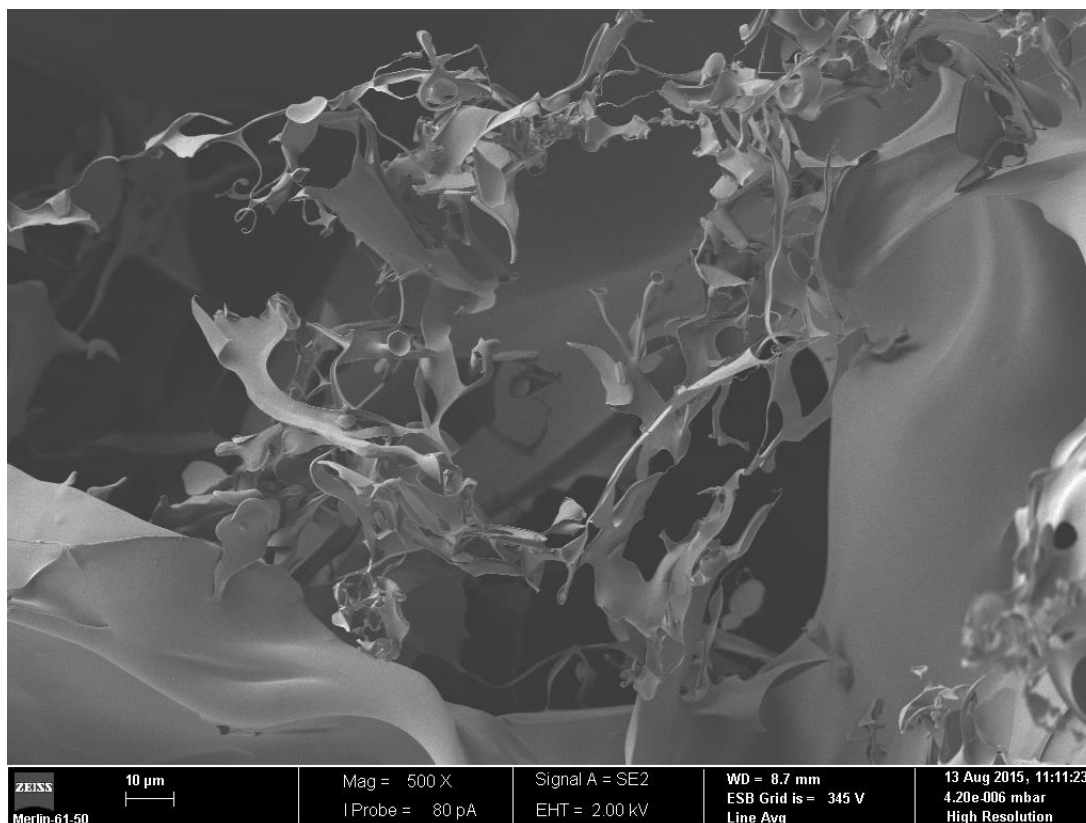


Figura 58 - Imagem ampliada 500X da estrutura de um hidrogel com concentração de 2% de quitosano e 0,05% de genipina (foto cedida pelo Dr. Luís Alves).

Apesar de não ser completamente visível nas figuras, quanto maior a percentagem de genipina maior a reticulação do gel e menor o tamanho dos poros do mesmo. O efeito parece ser menos acentuado com a concentração de quitosano. Este estudo morfológico inicial carece ainda de mais testes.

3.2.2.5. Análise da turgescência das amostras

No estudo da turgescência das amostras, ou seja, a capacidade de absorver água e como é que esta varia num meio em que o pH é neutro ou em que o pH é ácido (5), foram usados suportes metálicos (recipientes de filtros de chá adaptados) para conter frações das amostras (figura 59).

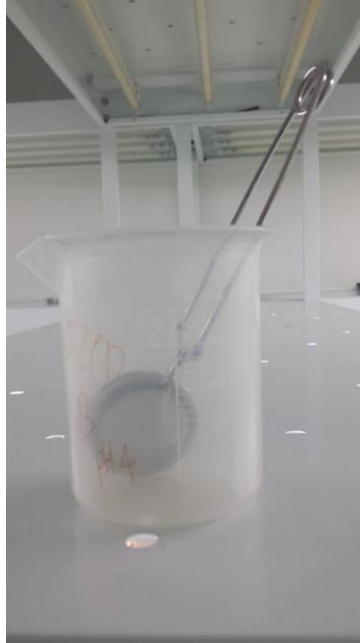


Figura 59 - Suporte improvisado, constituído por goblé e filtro metálico de chá, para medição da turgescência dos hidrogéis.

Foram usadas amostras com 2% de quitosano e 0,2% de genipina, variando β -CD em 0,1% e 0,2%, com um tempo de gelificação de 47 e 65 horas antes da medição. Para cada medição usaram-se sempre duas amostras, de forma a que enquanto que uma estava a ser pesada, a outra permanecia dentro do suporte mergulhada em água destilada, para se minimizar o efeito de perda de água absorvida enquanto se fazia a medição. O uso destes suportes metálicos poderá, de algum modo, influenciar a precisão da pesagem para a medição da turgescência, mas permite, pelo menos, avaliar a evolução qualitativa do comportamento com determinado solvente.

Os gráficos seguintes (figuras 60 a 63) foram elaborados recorrendo ao *software* Kaleida Ghraph, representando os dados da análise da turgescência de algumas amostras que se fizeram. Foram feitos ajustes aos dados experimentais recorrendo a dois modelos matemáticos [83, 84]:

$$m = \frac{S_{\max} * t}{k + t} \quad (12)$$

representado nas figuras seguintes com uma linha a cheio;

$$m = S_{\max} - e^{-k t} \quad (13)$$

representado nas figuras seguintes com uma linha a tracejado.

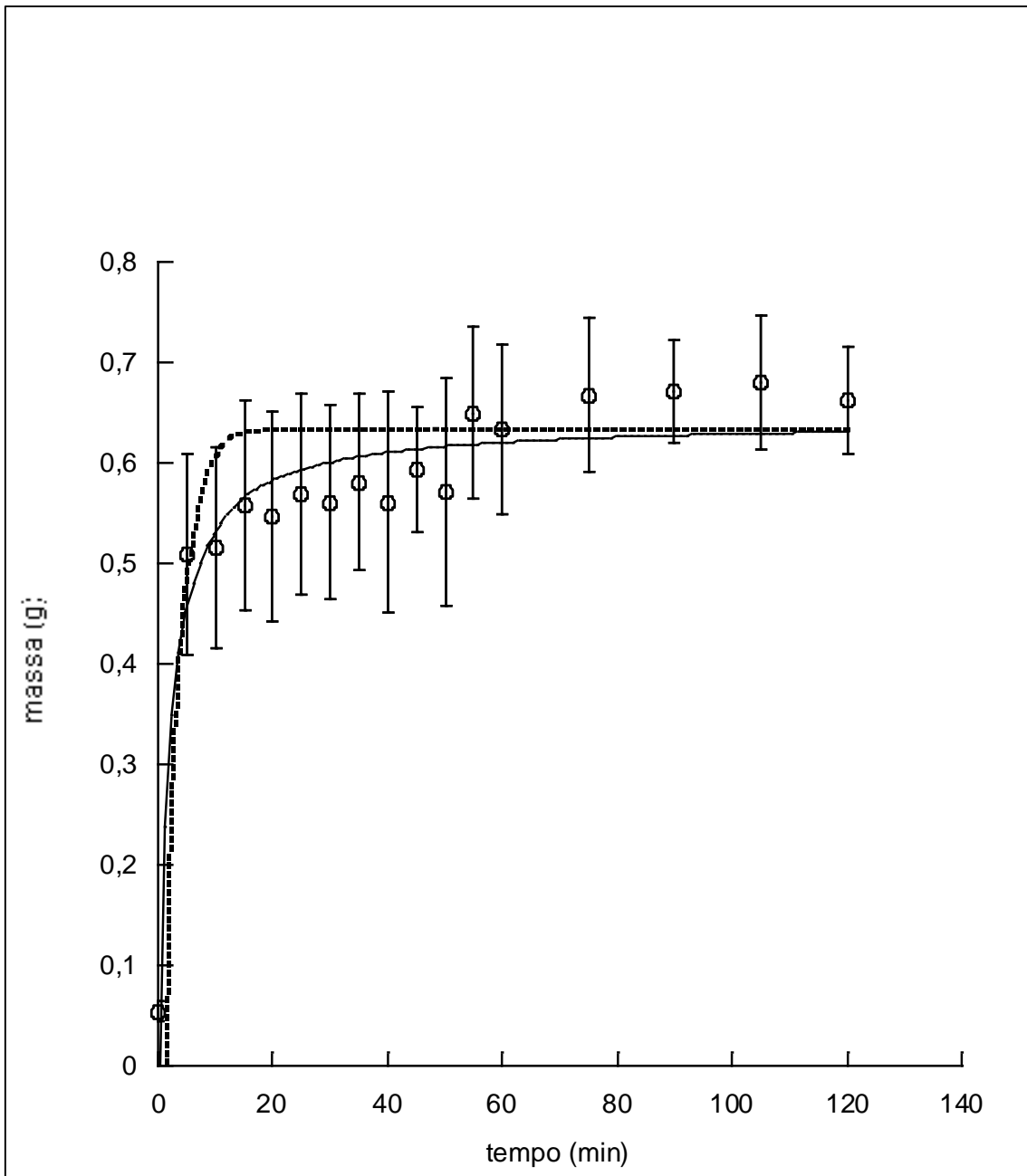


Figura 60 - Análise da turgescência de uma amostra com 2% de quitosano, 0,2% de genipina e 0,1% de β -CD, passado 47 horas da adição de genipina, em meio com pH neutro.

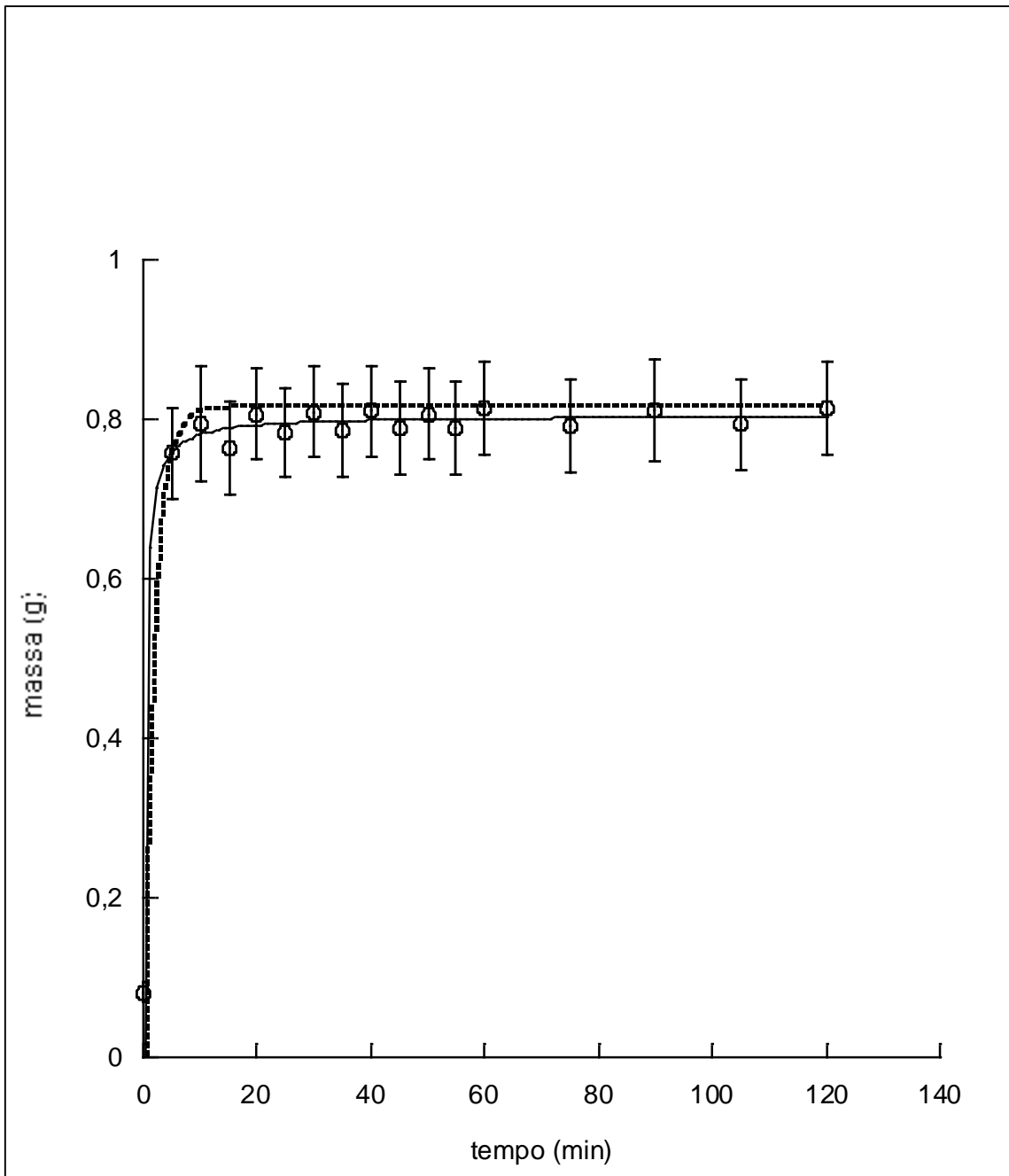


Figura 61 - Análise da turgescência de uma amostra com 2% de quitosano, 0,2% de genipina e 0,1% de β -CD, passado 47 horas da adição de genipina, em meio com pH 5.

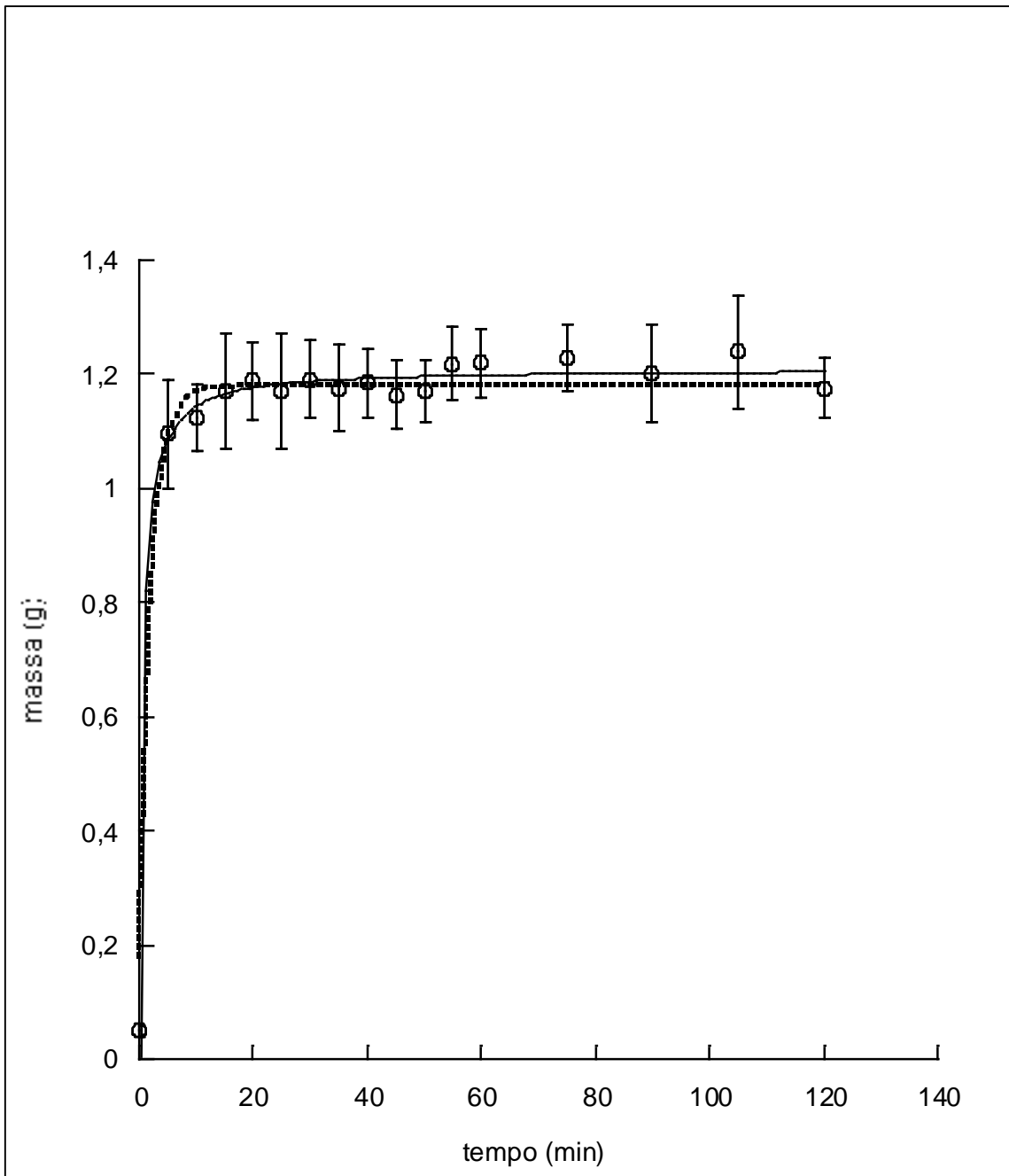


Figura 62 - Análise da turgescência de uma amostra com 2% de quitosano, 0,2% de genipina e 0,1% de β -CD, passado 65 horas da adição de genipina, em meio com pH neutro.

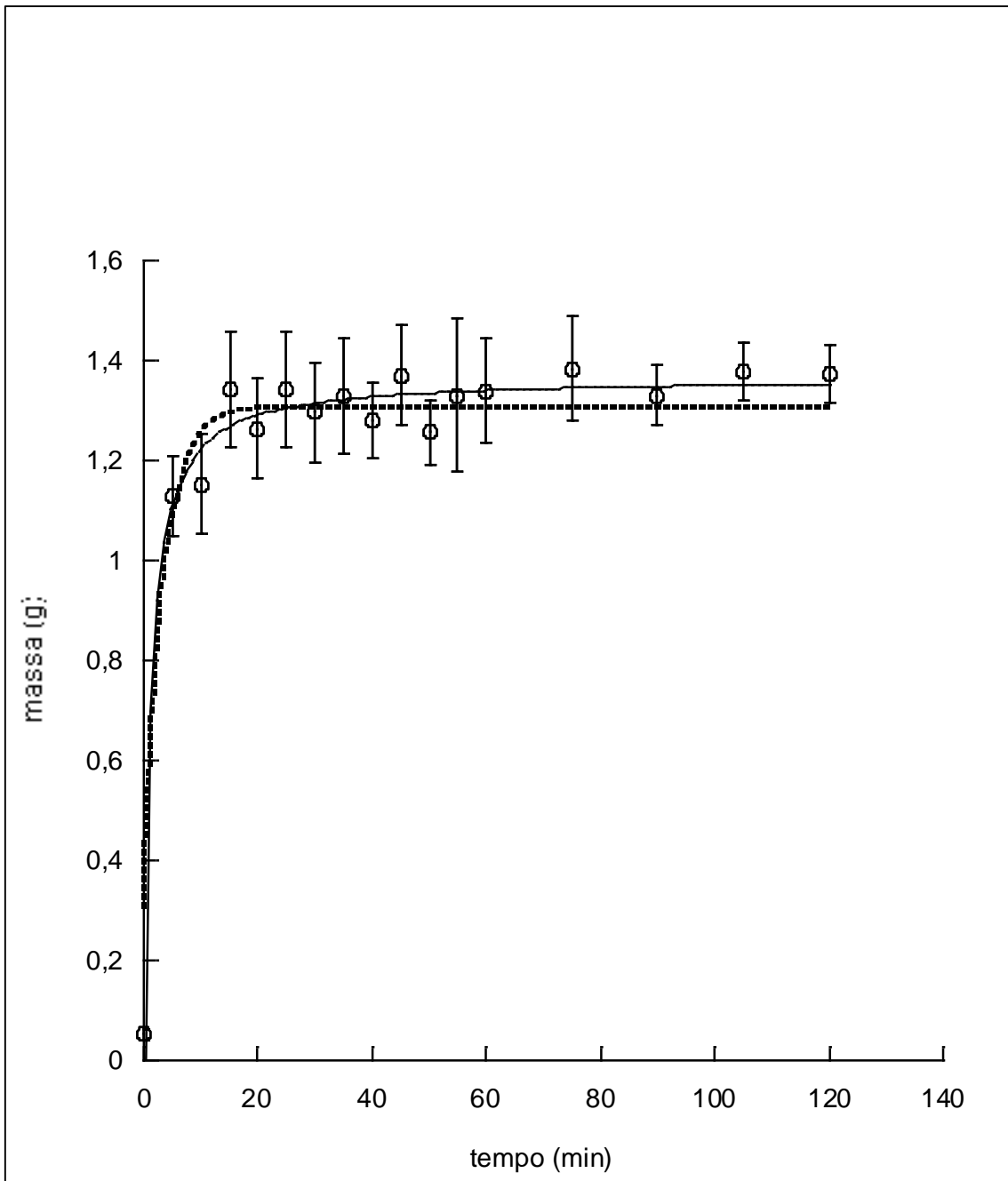


Figura 63 - Análise da turgescência de uma amostra com 2% de quitosano, 0,2% de genipina e 0,1% de β -CD, passado 65 horas da adição de genipina, em meio com pH 5.

Os parâmetros de ajuste das curvas dão-nos o tempo necessário para atingir metade da turgescência total e o valor da turgescência total. Estes valores encontram-se sumariados na tabela 3.

Tabela 3 – Parâmetros obtidos dos modelos de ajuste dos pontos do *swelling* (turgescência) de hidrogéis.

		β -CD (%)	0,1		0,2	
tempo (horas)	Modelo matemático	pH	7	5	7	5
47	$m = \frac{S_{max} * t}{k + t}$	Smax	0,64	0,80	0,67	0,79
		k	2,05	0,31	1,93	0,29
	$m = S_{max} * e^{-k t}$	Smax	0,63	0,82	0,60	0,84
		k	0,37	0,56	0,42	0,59
65	$m = \frac{S_{max} * t}{k + t}$	Smax	1,21	1,37	1,26	1,34
		k	0,58	1,17	0,54	1,15
	$m = S_{max} * e^{-k t}$	Smax	1,18	1,31	1,21	1,32
		k	0,47	0,30	0,46	0,32

A variável Smax, representa o valor de *swelling* máximo atingido em gramas, enquanto k representa o tempo necessário para atingir metade do *swelling* máximo em minutos (m é o valor da massa adquirida em gramas sendo t o valor do tempo em minutos).

Para o caso do Smax, obtiveram-se valores semelhantes, independentemente do uso de um ou do outro modelo. Os valores de Smax são superiores para os hidrogéis com pH 5. Também se verificam maiores valores para os hidrogéis sujeitos ao maior tempo de gelificação. No que diz respeito aos valores de k, estes não apresentam um padrão, como no caso dos de Smax, decorrendo do facto da absorção de água pelo hidrogel se dar quase instantaneamente, nunca passando dos 2 minutos.

Em termos gerais, constata-se que todos os gráficos representativos deste teste apresentaram a configuração de uma curva cinética, havendo inicialmente um grande aumento de massa e estabilizando de seguida. Este efeito é mais rápido no caso das amostras sujeitas a pH ácido (5). As amostras com 0,2% de β -CD são qualitativamente idênticas às de 0,1%, sugerindo que a β -CD não tem nenhum efeito relevante.

4. Conclusões

No decurso deste trabalho conseguiu-se com sucesso concretizar dois desideratos principais decorrentes dos objetivos traçados. O primeiro foi sintetizar carbamato de celulose, por dissolução de celulose natural. O segundo foi o desenvolvimento e a caracterização de hidrogéis obtidos a partir de quitosano. No entanto, a introdução do carbamato de celulose em soluções de polímero, com o intuito de formar hidrogéis, não se revelou frutífera.

Com base nos métodos que foram utilizados para identificar e caracterizar o CC, quimicamente sintetizado, pode considerar-se que o método reproduzido da literatura (CarbaCell), mas com adaptações importantes, é eficaz na produção deste. A transformação das amostras de celulose em carbamato de celulose foi mais eficiente com uma maior quantidade de ureia disponível no meio. De uma forma global verificou-se que os picos são mais intensos no caso da amostra de 40% de ureia do que na amostra de 20%. Após análises aos resultados do DP, da viscosidade, bem como do FTIR verificou-se que a criação de CC foi bem sucedida.

Com o uso do quitosano conseguiram-se obter hidrogéis. Foram efetuados testes com várias fontes de quitosano para verificar qual seria a fonte que nas mesmas condições consegue tempos mais reduzidos de gelificação, ou seja, qual o tipo de quitosano que proporciona uma cinética de gelificação mais rápida.

Constata-se uma diminuição do tempo de gelificação com o aumento da concentração de quitosano. Existe também uma diminuição do tempo de gelificação com o aumento da concentração de genipina. O menor tempo de gelificação ocorre para a concentração de 1,8% de quitosano.

A adição de α -CD e β -CD foi testada de modo a competir com o quitosano para as ligações com a genipina, resultando num aumento do tempo de gelificação. Este aumento é mais visível no caso da adição de β -CD, pois a sua cavidade é maior que a da α -CD, melhorando a sua inserção (complexo “host-guest”). A concentração de genipina disponível para fazer as ligações com o quitosano, para a formação do gel, torna-se menor, resultando num aumento do tempo de gelificação.

Através do estudo dos géis por SEM, constata-se que a reticulação é tanto maior quanto maior a taxa de genipina adicionada, diminuindo o número de poros e o seu tamanho nos géis. O mesmo efeito é visível quanto maior a concentração de quitosano disponível no meio, no entanto de uma maneira menos acentuada que no caso da genipina.

No que diz respeito à turgescência dos hidrogéis é visível que a absorção de água, adota o comportamento típico de uma curva cinética, resultando num grande aumento de massa por parte do gel. A diminuição do pH diminui o tempo necessário até que a turgescência seja máxima.

Relacionando as conclusões retiradas, considero que seria interessante completar os estudos realizados com as seguintes sugestões para trabalhos futuros:

- Testar outras concentrações de quitosano e genipina, assim como outras ciclodextrinas como a beta-CD modificada ou a gamma-CD;
- Realizar mais testes morfológicos de SEM;
- Testar a criação de hidrogéis baseados numa mistura de quitosano e celulose;
- Estudar hidrogéis que contenham fármacos, como potenciais materiais aplicados à liberação controlada de drogas;
- Estudar a cinética de libertação de um determinado fármaco pelos hidrogéis de quitosano, com recurso a um modelo matemático de equações de difusão, variações de pH e temperatura do meio exterior.

Bibliografia

- [1] W. B. Jensen, "The Origin of the Polymer Concept," *J. Chem. Educ.*, vol. 85, no. 5, p. 624, 2008.
- [2] M. S. M. Alger, *Polymer Science Dictionary*. Springer Science & Business Media, 1997.
- [3] M. P. Stevens, *Polymer Chemistry: An Introduction*. Oxford University Press, 1999.
- [4] J. J. Lagowski, *Chemistry: foundations and applications*. Macmillan Reference USA, 2004.
- [5] J. C. Carvalhais, "Estudo do comportamento de absorção de resinas de PVC com diferentes plastificantes," Tese de Mestrado em Química, Universidade de Coimbra, 2013.
- [6] A. K. Mohanty, M. Misra, and L. T. Drzal, *Natural Fibers, Biopolymers, and Biocomposites*. CRC Press, 2005.
- [7] R. Chandra and R. Rustgi, "Pergamon Biodegradable Polymers," *Prog. Polym. Sci.*, vol. 23, no. 97, pp. 1273–1335, 1998.
- [8] M. A. Meyers, P.-Y. Chen, A. Y.-M. Lin, and Y. Seki, "Biological materials: Structure and mechanical properties," *Prog. Mater. Sci.*, vol. 53, no. 1, pp. 1–206, 2008.
- [9] A. Kumar, A. Srivastava, I. Y. Galaev, and B. Mattiasson, "Smart polymers: Physical forms and bioengineering applications," *Prog. Polym. Sci.*, vol. 32, no. 10, pp. 1205–1237, 2007.
- [10] NNFCC, "Biopolymers: A Renewable Resource for the Plastics Industry," *NNFCC Newsl.*, no. 5, 2006.
- [11] S. Kim, J. Xu, and S. Liu, "Production of biopolymer composites by particle bonding," *Compos. Part A Appl. Sci. Manuf.*, vol. 41, no. 1, pp. 146–153, 2010.
- [12] A. L. Lehninger, D. L. Nelson, and M. M. Cox, *Lehninger Principles of Biochemistry*. W. H. Freeman, 2005.
- [13] K. Peters, "Korseby Online - Chemical Formulas," 2006. [Online]. Available: <http://www.korseby.net/computer/templates/chem.html>. [Accessed: 01-Sep-2015].
- [14] R. Young and R. Rowell, *Cellulose: Structure, Modification, and Hydrolysis*. Wiley, 1986.
- [15] R. M. Rowell, *Handbook of Wood Chemistry and Wood Composites*, 2nd ed. CRC Press, 2012.
- [16] D. Fengel and G. Wegener, *Wood: chemistry, ultrastructure, reactions*. Walter de Gruyter, 1984.

- [17] D. Klemm, B. Heublein, H.-P. P. Fink, and A. Bohn, "Cellulose: fascinating biopolymer and sustainable raw material.," *Angew. Chemie - Int. Ed.*, vol. 44, no. 22, pp. 3358–93, 2005.
- [18] C. Olsson and G. Westman, "Direct Dissolution of Cellulose: Background, Means and Applications," in *Cellulose - Fundamental Aspects*, 2013.
- [19] S. Pérez and K. Mazeau, "Conformations, Structures, and Morphologies of Celluloses," in *Polysaccharides: Structural Diversity and Functional Versatility*, 2nd ed., S. Dumitriu, Ed. 2005.
- [20] SikSite, "Célula, a unidade da vida." [Online]. Available: <http://www.siksite.com/PreHistPCell.htm>. [Accessed: 07-Mar-2016].
- [21] D. J. Cosgrove, "Growth of the plant cell wall.," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 6, no. 11, pp. 850–61, 2005.
- [22] D. Klemm, *Comprehensive Cellulose Chemistry: Functionalization of cellulose*. Wiley-VCH, 1998.
- [23] C. Yamane, T. Aoyagi, M. Ago, K. Sato, K. Okajima, and T. Takahashi, *Polymer Journal*, vol. 38, no. 7–9. Society of Polymer Science, Japan, 2006.
- [24] B. Lindman, G. Karlström, and L. Stigsson, "On the mechanism of dissolution of cellulose," *J. Mol. Liq.*, vol. 156, no. 1, pp. 76–81, 2010.
- [25] A. C. O'Sullivan, "Cellulose: the structure slowly unravels," *Cellulose*, vol. 4, no. 3, pp. 173–207, 1997.
- [26] M. Egal, T. Budtova, and P. Navard, "Structure and properties of cellulose / NaOH aqueous solutions, gels and regenerated objects," Mines ParisTech, 2006.
- [27] H. A. Krässig, "Accessibility, solubility and reactivity of cellulose substrates," in *Cellulose, structure, accessibility and reactivity*, vol. 32, no. 12, Gordon and Breach Publishers, 1993.
- [28] S. J. Eichhorn, "Cellulose nanowhiskers: promising materials for advanced applications," *Soft Matter*, vol. 7, no. 2, pp. 303–315, 2011.
- [29] S. Saka, "Cotton fibers as natural raw materials for cellulose acetate production," *Macromol. Symp.*, vol. 208, no. 1, pp. 29–36, 2004.
- [30] B. Medronho, A. Romano, M. G. Miguel, L. Stigsson, and B. Lindman, "Rationalizing cellulose (in)solubility: reviewing basic physicochemical aspects and role of hydrophobic interactions," *Cellulose*, vol. 19, no. 3, pp. 581–587, 2012.
- [31] H. Duarte, "Desenvolvimento e caracterização de solventes aquosos para a dissolução de celulose: reologia e comportamento de fase," Tese de Mestrado Integrado em Engenharia Biológica, Universidade do Algarve, 2014.
- [32] M. Chaplin, "Water Structure and Science," 2015. [Online]. Available: http://www1.lsbu.ac.uk/water/water_vibrational_spectrum.html.
- [33] O. Biermann, E. Hädicke, S. Koltzenburg, and F. Müller-Plathe, "Hydrophilicity and Lipophilicity of Cellulose Crystal Surfaces.," *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, vol. 40, no. 20, pp. 3822–3825, 2001.

- [34] H. Miyamoto, M. Umemura, T. Aoyagi, C. Yamane, K. Ueda, and K. Takahashi, "Structural reorganization of molecular sheets derived from cellulose II by molecular dynamics simulations.," *Carbohydr. Res.*, vol. 344, no. 9, pp. 1085–94, 2009.
- [35] B. Medronho and B. Lindman, "Competing forces during cellulose dissolution: From solvents to mechanisms," *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, vol. 19, no. 1, pp. 32–40, 2014.
- [36] T. Liebert, "Cellulose Solvents - Remarkable History, Bright Future," *ACS Symp. Ser.*, vol. 1033, pp. 3–54, 2010.
- [37] T. Heinze and A. Koschella, "Solvents applied in the field of cellulose chemistry: a mini review," *Polímeros*, vol. 15, no. 2, pp. 84–90, 2005.
- [38] S. Sen, J. D. Martin, and D. S. Argyropoulos, "Review of Cellulose Non-Derivatizing Solvent Interactions with Emphasis on Activity in Inorganic Molten Salt Hydrates," *ACS Sustain. Chem. Eng.*, vol. 1, no. 8, pp. 858–870, 2013.
- [39] A. Pinkert, K. N. Marsh, and S. Pang, "Reflections on the Solubility of Cellulose," *Ind. Eng. Chem. Res.*, vol. 49, no. 22, pp. 11121–11130, 2010.
- [40] Y. Guo, J. Zhou, Y. Song, and L. Zhang, "An efficient and environmentally friendly method for the synthesis of cellulose carbamate by microwave heating.," *Macromol. Rapid Commun.*, vol. 30, no. 17, pp. 1504–8, 2009.
- [41] L. Pinto, "Síntese e estudo de derivados do quitosano com pontecial interesse biológico e ambiental," Tese de Mestrado em Química, Universidade do Porto, 2005.
- [42] K. M. Rudall and W. Kenchington, "The Chitin System," *Biol. Rev.*, vol. 48, no. 4, pp. 597–633, 1973.
- [43] K. Yao, T. Peng, Y. Yin, M. Xu, and M. Goosen, "Microcapsules/Microspheres Related to Chitosan," *J. Macromol. Sci. Part C Polym. Rev.*, vol. 35, no. 1, pp. 155–180, Feb. 1995.
- [44] F. M. Goycoolea, E. Agulló, and R. . Mato, *Quitina y Quitosano*. Pontificia Universidad Católica del Peru -CYTED-CIAD, 2004.
- [45] H. K. No and S. P. Meyers, "Preparation of chitin and chitosan," *Chitin Handb.*, 1997.
- [46] J. Blackwell, K. D. Parker, and K. M. Rudall, "Chitin fibres of the diatoms *Thalassiosira fluviatilis* and *Cyclotella cryptica*," *J. Mol. Biol.*, vol. 28, no. 2, pp. 383–385, 1967.
- [47] M. Jaworska, K. Sakurai, P. Gaudon, and E. Guibal, "Influence of chitosan characteristics on polymer properties. I: Crystallographic properties," *Polym. Int.*, vol. 52, no. 2, pp. 198–205, 2003.
- [48] F. Shahidi, J. K. V. Arachchi, and Y.-J. Jeon, "Food applications of chitin and chitosans," *Trends Food Sci. Technol.*, vol. 10, no. 2, pp. 37–51, 1999.
- [49] J. Hosokawa, M. Nishiyama, K. Yoshihara, and T. Kubo, "Biodegradable film derived from chitosan and homogenized cellulose," *Ind. Eng. Chem. Res.*, vol. 29, no. 5, pp. 800–805, 1990.

- [50] J. Berger, M. Reist, A. Chenite, O. Felt-Baeyens, J. M. Mayer, and R. Gurny, "Pseudo-thermosetting chitosan hydrogels for biomedical application.," *Int. J. Pharm.*, vol. 288, no. 1, pp. 17–25, 2005.
- [51] M. Rinaudo, "Chitin and chitosan: Properties and applications," *Prog. Polym. Sci.*, vol. 31, no. 7, pp. 603–632, 2006.
- [52] R. A. A. Muzzarelli and M. G. Peter, *Chitin handbook*. Atec, 1997.
- [53] C. A. Martínez-Huitle, N. S. Fernandes, M. Cerro-Lopez, and M. A. Quiroz, "Determination of Trace Metals by Differential Pulse Voltammetry at Chitosan Modified Electrodes," *Port. Electrochim. Acta*, vol. 28, no. 1, pp. 39–49, 2010.
- [54] S. P. Campana-Filho and R. Signini, "Efeito de Aditivos na Desacetilação de Quitina," *Polímeros*, vol. 11, no. 4, pp. 169–173, 2001.
- [55] A. P. Abram and I. Higuera, *Generalidades en: Quitina y Quitosano*. Pontificia Universidad Católica del Peru -CYTED-CIAD, 2004.
- [56] K. Okuyama, K. Noguchi, M. Kanenari, T. Egawa, K. Osawa, and K. Ogawa, "Structural diversity of chitosan and its complexes," *Carbohydr. Polym.*, vol. 41, no. 3, pp. 237–247, 2000.
- [57] N. Peppas, "Hydrogels in pharmaceutical formulations," *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 50, no. 1, pp. 27–46, 2000.
- [58] A. S. Hoffman, "Hydrogels for biomedical applications," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 54, no. 1, pp. 3–12, 2002.
- [59] J. F. Almeida, "Preparação e caracterização de hidrogéis para aplicações biomédicas," Tese de Doutorado em Engenharia Química, Universidade de Coimbra, 2010.
- [60] B. D. Ratner, A. S. Hoffman, F. J. Schoen, and J. E. Lemons, *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine*. Elsevier San Diego California, 2004.
- [61] W. E. Hennink and C. F. van Nostrum, "Novel crosslinking methods to design hydrogels," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 54, no. 1, pp. 13–36, 2002.
- [62] M. J. Moura, M. M. Figueiredo, and M. H. Gil, "Rheological study of genipin cross-linked chitosan hydrogels.," *Biomacromolecules*, vol. 8, no. 12, pp. 3823–9, Dec. 2007.
- [63] A. N. Martin and P. Bustamante, *Physical Pharmacy: Physical Chemical Principles in the Pharmaceutical Sciences*. Lea & Febiger, 1993.
- [64] K. Holmberg, B. Jönsson, B. Kronberg, and B. Lindman, *Surfactants and Polymers in Aqueous Solution*. John Wiley & Sons, Ltd, 2003.
- [65] ISO5351, "Pulps - Determination of limiting viscosity number in cupri-ethylenediamine (CED) solution," 2010. [Online]. Available: <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:5351:ed-2:v1:en>. [Accessed: 28-Nov-2015].
- [66] E. H. Immergut, B. G. Ranby, and H. F. Mark, "Recent Work on Molecular Weight of Cellulose," *Ind. Eng. Chem.*, vol. 45, no. 11, pp. 2483–2490, 1953.

- [67] D. A. Skoog and F. J. Holler, *Principles of instrumental analysis*. Thomson Brooks/Cole, 2007.
- [68] Breto, “Componentes de un espectofotometro,” 2011. [Online]. Available: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Componentes_de_un_espectofotometro.jpg. [Accessed: 29-Nov-2015].
- [69] R. Ottenbrite, K. Park, and T. Okano, *Biomedical Applications of Hydrogels Handbook*. Springer Science & Business Media, 2010.
- [70] D. R. Rohindra, A. V Nand, and J. R. Khurma, “Swelling properties of chitosan hydrogels,” *South Pacific J. Nat. Appl. Sci.*, vol. 22, no. 1, pp. 32–35, 2004.
- [71] D. Y. Duygu, T. Baykal, İ. Açıkgöz, and K. Yildiz, “REVIEW Fourier Transform Infrared (FT-IR) Spectroscopy for Biological Studies,” *Gazi Univ. J. Sci.*, vol. 22, no. 3, pp. 117–121, 2009.
- [72] M. Martins, “Desenvolvimento de hidrogéis à base de quitosano/fosfatos de cálcio para aplicações ortopédicas,” Tese de Mestrado em Engenharia Biomédica, Universidade Nova de Lisboa, 2012.
- [73] B. C. Smith, *Fundamentals of Fourier Transform Infrared Spectroscopy, Second Edition*. CRC Press, 2011.
- [74] D. McMullan, “Scanning electron microscopy 1928-1965,” *Scanning*, vol. 17, no. 3, pp. 175–185, 2006.
- [75] R. Reed, “Introduction to Biological Scanning Electron Microscopy,” *Journal of Anatomy*, vol. 127, no. Pt 3. Wiley-Blackwell, p. 636, 1978.
- [76] J. Atteberry, “How Scanning Electron Microscope work,” 2009. [Online]. Available: <http://science.howstuffworks.com/scanning-electron-microscope2.htm>.
- [77] M. A. Hayat, *Principles and techniques of electron microscopy: biological applications, Volume 1*. University Park Press, 1981.
- [78] R. M. Silverstein, *Spectrometric Identification of Organic Compounds*. 7th Ed. John Wiley and Sons Inc., 2005.
- [79] “IR-frequencies.” [Online]. Available: <http://www2.ups.edu/faculty/hanson/Spectroscopy/IR/IRfrequencies.html>. [Accessed: 19-Feb-2016].
- [80] T. Budtova and P. Navard, “Viscosity-temperature dependence and activation energy of cellulose solutions,” *Nord. Pulp Pap. Res. J.*, vol. 30, no. 01, pp. 099–104, 2015.
- [81] R. A. A. Muzzarelli, “Genipin-crosslinked chitosan hydrogels as biomedical and pharmaceutical aids,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 77, no. 1, pp. 1–9, 2009.
- [82] E. W. Weisstein, “Inflection Point.” [Online]. Available: <http://mathworld.wolfram.com/InflectionPoint.html>. [Accessed: 29-Jan-2016].
- [83] K. A. Johnson and R. S. Goody, “The Original Michaelis Constant: Translation of the 1913 Michaelis–Menten Paper,” *Biochemistry*, vol. 50, no. 39, pp. 8264–8269, 2011.

- [84] M. Sadeghi and H. Hosseinzadeh, "Synthesis and Swelling Behavior of Starch-Poly (Sodium Acrylate-co-Acrylamide) Superabsorbent Hydrogel," *Turkish J. Chem.*, vol. 32, no. 3, pp. 375–388, 2008