

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
ESCOLA DE ENGENHARIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

Desenvolvimento de Filmes Assimétricos de Quitosana

Carollina Ferreira Marques

Dissertação de Mestrado

Porto Alegre

2023

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
ESCOLA DE ENGENHARIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

Desenvolvimento de Filmes Assimétricos de Quitosana

Carollina Ferreira Marques

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul para obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Orientadoras:

Profa. Dra. Paula Bettio Staudt

Profa. Dra. Liliane Damaris Pollo

Colaboradora: Dra. Raiane Valenti Gonçalves

Porto Alegre

2023

AGRADECIMENTOS

Agradeço a universidade Federal de Rio Grande do Sul por me proporcionarem essa oportunidade, o conhecimento e a formação profissional e acadêmica.

Aos meus pais Cleidi Maria e Gerson Luís por sempre apoiarem meus sonhos e me proporcionarem um porto seguro para meu crescimento, acreditando no meu potencial.

Às orientadoras Liliane Damaris Pollo e Paula Bettio Staudt pela oportunidade, paciência, dedicação e apoio na elaboração deste trabalho. Sinto-me imensamente afortunada por ter sido orientada por vocês.

A pós-doutoranda Raiane Gonçalves por todos os ensinamentos, suporte, companheirismo, acolhimento e colaboração incansável.

Ao meu noivo Paulo Sidnei por sempre estar junto de mim nos meus momentos mais difíceis.

Ao Programa de Pós-Graduação em engenharia química, UFRGS-PPGEQ, por dispor de seus melhores técnicos e equipamentos de análise para atender as demandas solicitadas.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

Agradeço principalmente a companhia de pessoas excelentes que contribuíram imensamente para meu crescimento pessoal e profissional.

RESUMO

A quitosana é um biopolímero proveniente de fontes renováveis que se destaca devido à biocompatibilidade, biodegradabilidade e não toxicidade. Filmes assimétricos de quitosana se mostram como uma interessante alternativa para sua aplicação como curativos frente aos filmes densos comerciais, uma vez que a presença de poros propicia a troca de fluidos entre a pele e o curativo e, ao mesmo tempo, evita a entrada de microrganismos patogênicos. Na formação de filmes porosos assimétricos, é necessária uma caracterização detalhada do material, assim como o conhecimento do comportamento termodinâmico do mesmo em solução, constituindo o objetivo deste trabalho. A quitosana comercial foi purificada utilizando a liofilização como método de secagem, o grau de desacetilação determinado foi de 91 % e sua estrutura química foi confirmada por análises de FTIR. O diagrama ternário do sistema quitosana/solução aquosa de ácido acético/solução aquosa de hidróxido de sódio foi determinado pelo método de titulação de ponto de nuvem nas temperaturas de 30 e 50 °C. Com o aumento da temperatura ficou evidente a diminuição da região heterogênea do diagrama. Os resultados do diagrama de fases mostraram que o sistema estudado tem potencial para a formação de filmes porosos assimétricos pelo método de precipitação por imersão. Os poros formados apresentaram morfologia lamelar e o aumento da concentração de quitosana de 3 para 5 % (m/m) resultou em filmes com poros menores e melhores propriedades mecânicas. As análises de MEV, FTIR e TGA dos filmes mostraram a presença do sal de acetato de sódio na estrutura, indicando a necessidade de acrescentar uma etapa de lavagem/neutralização na metodologia de preparo dos filmes. O melhor processo de remoção dos resíduos foi a imersão dos filmes em água após a etapa do banho de precipitação, antes da secagem por liofilização. Os filmes formados apresentaram morfologia dos poros assimétrica, estabilidade térmica e estrutura química similares à quitosana purificada. Desta forma, os filmes produzidos neste trabalho apresentam potencial aplicação na área biomédica.

Palavras-chave: biopolímero, quitosana, filmes assimétricos, diagrama de fases.

ABSTRACT

Chitosan is a biopolymer from renewable sources that stands out due to its biocompatibility, biodegradability and non-toxicity. Asymmetric chitosan films are an interesting alternative for application as dressings compared to commercial dense films, since the presence of pores facilitates the exchange of fluids between the skin and the dressing and, at the same time, prevents the entry of microorganisms pathogenic. Towards the formation of asymmetrical porous films, a detailed characterization of the material is necessary, as well as knowledge of its thermodynamic behavior in solution, constituting the objective of this work. Commercial chitosan was purified using lyophilization as a drying method, the degree of deacetylation determined was 91 % and its chemical structure confirmed by FTIR analysis. The ternary diagram of the chitosan/aqueous acetic acid solution/aqueous sodium hydroxide solution system was determined by the cloud point titration method at temperatures of 30 and 50 °C. With the increase in temperature, a decrease in the heterogeneous region of the diagram was evident. The phase diagram results showed that the studied system has potential for the formation of asymmetric porous films by the immersion precipitation method. The formed pores showed lamellar morphology and the increase of chitosan concentration from 3 to 5% (m/m) resulted in films with smaller pores and better mechanical properties. The SEM, FTIR and TGA analyzes of the films showed the presence of sodium acetate salt in the structure, indicating the need to add a washing/neutralization step in the film preparation methodology. The best residue removal process was the immersion of the films in water after the precipitation bath step, before drying by lyophilization. The formed films showed asymmetrical pore morphology, thermal stability and chemical structure similar to purified chitosan. Thus, the films produced in this work have potential application in the biomedical area.

Keywords: biopolymer, chitosan, asymmetric films, phase diagram.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. OBJETIVOS DA DISSERTAÇÃO	2
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1. BIOPOLÍMEROS.....	4
2.2. QUITOSANA	5
2.2.1. <i>Estrutura e propriedades físicas e químicas</i>	6
2.2.2. <i>Determinação do Grau de desacetilação (GD) da quitosana</i>	10
2.2.3. <i>Solubilidade da quitosana</i>	13
2.2.4. <i>Atividade antimicrobiana da quitosana</i>	17
2.2.5. <i>Aplicações da quitosana na área médica</i>	20
2.2.6. <i>Filmes de quitosana</i>	22
2.3. FABRICAÇÃO DE FILMES	24
2.3.1. <i>Metodologias utilizadas na fabricação de filmes porosos assimétricos</i>	24
2.3.2. <i>Técnica de Inversão de Fases</i>	24
2.3.2.1. <i>Separação de fases induzida por precipitação térmica</i>	26
2.3.2.2. <i>Separação de fases induzida por evaporação de solvente</i>	26
2.3.2.3. <i>Separação de fases induzida por difusão</i>	27
2.3.2.4. <i>Separação de fases induzida por não solvente</i>	27
2.4. FILMES ASSIMÉTRICOS DE QUITOSANA.....	28
2.5. ASPECTOS TERMODINÂMICOS E CINÉTICOS NA SEPARAÇÃO DE FASES	30
2.5.1. <i>Termodinâmica de soluções poliméricas</i>	30
2.5.2. <i>Diagrama de fases para sistemas ternários</i>	31
2.5.3. <i>Curva de ponto de nuvem</i>	34
2.5.4. <i>Aspectos cinéticos na separação de fases</i>	36
3. METODOLOGIA	40
3.1. MATERIAIS	40
3.2. FLUXOGRAMA EXPERIMENTAL	40
3.3. CARACTERIZAÇÃO DA QUITOSANA.....	41
3.3.1. <i>Purificação da quitosana</i>	41
3.3.2. <i>Caracterização estrutural da quitosana por FTIR</i>	42
3.3.3. <i>Grau de desacetilação (GD)</i>	42
3.3.4. <i>Grau de cristalinidade (Cr %)</i>	44
3.3.5. <i>Análise da estabilidade térmica</i>	44
3.4. PONTO DE NUVEM	44
3.5. PREPARAÇÃO DOS FILMES ASSIMÉTRICOS	45
3.5.1. <i>Pós lavagem dos filmes assimétricos</i>	46
3.5.2. <i>Preparação de filmes assimétricos com etapa de neutralização</i>	46
3.6. CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES DE QUITOSANA.....	47
3.6.1. <i>Análise da composição química</i>	47
3.6.2. <i>Grau de cristalinidade (Cr %)</i>	47
3.6.3. <i>Análise da estabilidade térmica</i>	47
3.6.4. <i>Morfologia</i>	48
3.6.5. <i>Propriedades mecânicas</i>	48
3.6.6. <i>Grau de inchamento</i>	48
4. RESULTADOS.....	49
4.1. CARACTERIZAÇÃO DA QUITOSANA.....	49
4.1.1. <i>Purificação da quitosana</i>	49
4.1.2. <i>Grau de desacetilação (GD)</i>	51
4.1.3. <i>Grau de cristalinidade (Cr %)</i>	54
4.1.4. <i>Análise da estabilidade térmica</i>	56
4.2. PONTO DE NUVEM	57

4.3.	CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES SEM BANHO DE NEUTRALIZAÇÃO	63
4.3.1.	<i>Caracterização físico-química por FTIR.....</i>	63
4.3.2.	<i>Grau de cristalinidade dos filmes (Cr %)</i>	65
4.3.3.	<i>Análise da estabilidade térmica dos filmes.....</i>	67
4.3.4.	<i>Morfologia dos filmes</i>	68
4.3.5.	<i>Propriedades mecânicas dos filmes.....</i>	70
4.3.6.	<i>Grau de inchamento dos filmes.....</i>	70
4.4.	CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES APÓS A LAVAGEM COM ÁGUA	71
4.4.1.	<i>Caracterização físico-química dos filmes após a lavagem.....</i>	72
4.4.2.	<i>Grau de cristalinidade (Cr %) dos filmes após a lavagem.....</i>	73
4.4.3.	<i>Análise da estabilidade térmica dos filmes após a lavagem</i>	73
4.4.4.	<i>Morfologia dos filmes após a lavagem.....</i>	74
4.5.	CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES COM ETAPA DE NEUTRALIZAÇÃO.....	75
4.5.1.	<i>Análise da composição química dos filmes com etapa de neutralização.....</i>	76
4.5.2.	<i>Grau de cristalinidade (Cr %) dos filmes com etapa de neutralização</i>	78
4.5.3.	<i>Análise da estabilidade térmica dos filmes com etapa de neutralização</i>	79
4.5.4.	<i>Morfologia dos filmes com etapa de neutralização</i>	80
5.	CONCLUSÃO E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	82
5.1.	CONCLUSÃO	82
5.2.	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	83
6.	REFERÊNCIAS.....	85
7.	APÊNDICE A.....	99

LISTA DE FIGURAS

Figura 2-1 – Representações estruturais da quitina (a) e quitosana (b).....	7
Figura 2-2 – Diagrama demonstrativo da solubilidade da quitosana em função da sua protonação versus pH do meio. Fonte: adaptado de ARSHAD; ZUBAIR; ULLAH, 2020.	14
Figura 2-3 – Equação química da reação entre a quitosana e o ácido acético. Fonte: adaptado de ARSHAD; ZUBAIR; ULLAH, 2020.....	15
Figura 2-4 – (I) Representação ilustrativa do primeiro modelo de ação antimicrobiana da quitosana. Composição estrutural do envelope externo de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas: (a) membrana externa; (b) camada de peptidoglicano; (c) membrana citoplasmática. (II) Efeito da ligação da quitosana ao envelope externo de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Fonte: Adaptado de SAHARIAH; MÁSSON, 2017.....	18
Figura 2-5 – Imagens de microscopia eletrônica de varredura de filmes de quitosana obtidos por inversão de fases induzida por não solvente. a) seção transversal; b) superfície densa; c) e d) superfície porosa. Fonte: HONG; WEI; LIU, 2007.	23
Figura 2-6 – Ilustração esquemática dos principais tipos de morfologias de filmes. Fonte: Adaptado de HABERT; BORGES; NOBREGA, 2006.....	25
Figura 2-7 – Etapas do processo de inversão de fases por imersão-precipitação. Fonte: Adaptado de HABERT; BORGES; NOBREGA, 2006.....	28
Figura 2-8 – Imagens de microscopia eletrônica de varredura de <i>scaffolds</i> de quitosana obtidos por inversão de fases induzida por não solvente e liofilização. Fonte: WANG et al., 2020.	29
Figura 2-9 – Representação esquemática do diagrama de energia de Gibbs com a temperatura e composição. Fonte: Adaptado de BULTE et al., 1996.....	32
Figura 2-10 – Representação do que ocorre no sistema ternário durante a inversão de fases em um sistema polímero, solvente e não solvente. Fonte: Adaptado de MULDER, 1997.	33
Figura 2-11 – Representação ilustrativa do diagrama ternário com a localização da curva de ponto de nuvem, obtida experimentalmente. Fonte: Adaptado de BULTE et al., 1996.	35
Figura 2-12 – Imagem de MEV na seção transversal de filmes de poliétersulfona. (a) morfologia tipo dedos; (b) morfologia tipo esponja. Fonte: HABERT; BORGES; NOBREGA, 2006.	38
Figura 3-1 – Fluxograma experimental.....	41
Figura 3-2 – Ilustração da obtenção de linha de base em um espectro de FTIR da quitosana.	43
Figura 3-3 – Fluxograma simplificado das etapas envolvidas nos processos de fabricação dos filmes assimétricos de quitosana.	45
Figura 4-1 – Espectro de FTIR das amostras de quitosana comercial (QtC) e purificadas (QtL – liofilizada, QtE – em estufa).....	50
Figura 4-2 – Curva de titulação condutivimétrica para determinação do GD médio da quitosana QtL.	53
Figura 4-3 – Difractogramas da quitosana comercial (QtC) e quitosana purificada (QtL).	55
Figura 4-4 – Curvas de análise térmica (TGA) das amostras de quitosana.	56
Figura 4-5 – Curvas de TGA da amostra QtL.....	57
Figura 4-6 – Imagem ilustrativa do comportamento de uma solução de quitosana 0,5 % (m/m) (a) antes e (b) depois de atingir o ponto de nuvem.....	58
Figura 4-7 - Imagem ilustrativa do comportamento de uma solução de quitosana 3 % (m/m) (a) antes e (b) depois de chegar ao ponto de nuvem.	58
Figura 4-8 – Diagrama ternário para quitosana/solução de ácido acético/solução de hidróxido de sódio a 30 e 50 °C.	59
Figura 4-9 – Grau de protonação da quitosana para as diferentes soluções de quitosana utilizadas nos experimentos de ponto de nuvem.....	61
Figura 4-10 – pH das diferentes soluções ácidas de quitosana utilizadas nos experimentos de ponto de nuvem.....	61
Figura 4-11 – pH das diferentes soluções de quitosana medido no ponto de nuvem, com as soluções turvas.....	62
Figura 4-12 – Imagem dos filmes de quitosana em diferentes concentrações.	63
Figura 4-13 – Espectro de FTIR da amostra de quitosana QtL e dos filmes preparados em diferentes concentrações.	64

Figura 4-14 – Padrão de DRX para a amostra de quitosana QtL e dos filmes formados em diferentes concentrações.	66
Figura 4-15 – Termogramas da amostra QtL de quitosana e dos filmes de quitosana em diferentes concentrações.	68
Figura 4-16 –Imagens de MEV dos filmes de quitosana na magnitude de 5000x: (a) superfície Qt3 (b) superfície Qt4 (c) superfície Qt5 (d) seção transversal Qt3 (e) seção transversal Qt4 (f) seção transversal Qt5.	69
Figura 4-17 – Filmes de quitosana pós lavagem em diferentes concentrações.	72
Figura 4-18 – Espectro de FTIR da amostra de quitosana QtL e dos filmes após a lavagem.....	73
Figura 4-19 – Curvas de análise térmica (TGA) da amostra de quitosana QtL e dos filmes pós-lavados de diferentes concentrações.	74
Figura 4-20 – Imagens de MEV do filme de quitosana 5 % (m/m) Qt5-lav com magnitude de 5000x: (a) superfície (b) seção transversal.....	75
Figura 4-21 – Filmes de quitosana: (a) 5 % (m/m), lavado com água; (b) 6 % (m/m), imerso em banho de água destilada por 8 horas.....	76
Figura 4-22 – Espectro de FTIR da amostra de quitosana QtL e dos filmes neutralizados: Qt5-N, lavado com água; Qt6-N imerso em banho de água destilada por 8 horas.	77
Figura 4-23 – Espectro de FTIR dos filmes 5 % (m/m) de quitosana com diferentes metodologias de obtenção: filme sem pré-tratamento Qt5 e filme lavado com água antes da liofilização.	78
Figura 4-24 – Padrão de DRX para o filme de quitosana Qt6-N.....	78
Figura 4-25 – Curvas de análise térmica (TGA) da amostra de quitosana QtL e dos filmes pós lavados de diferentes concentrações.	79
Figura 4-26 – Imagens de MEV dos filmes de quitosana com neutralização com magnitude de 5000x: (a) superfície Qt5-N (b) superfície Qt6-N (c) seção transversal Qt5-N (d) seção transversal Qt6-N.....	80
Figura 7-1 – Imagens MEV dos filmes pós lavagem: (a) superfície QT 3 % (m/m) (b) superfície QT 4 % (m/m) (c) seção transversal QT 3 % (m/m) e (d) seção transversal QT 4 % (m/m).....	99

LISTA DE TABELAS

Tabela 2-1 – Relação entre as propriedades biológicas da quitosana, suas características físico-químicas e os métodos de determinação.	10
Tabela 3-1 – Identificação das amostras de quitosana.....	42
Tabela 3-2 – Identificação dos filmes assimétricos de quitosana.	46
Tabela 3-3 – Identificação dos filmes pós-lavados de quitosana.....	46
Tabela 3-4 – Identificação dos filmes neutralizados de quitosana.....	47
Tabela 4-1 – Equações, relação das bandas e resultados para o grau de desacetilação da quitosana	52
Tabela 4-2 – Composição dos pontos de nuvem na temperatura de 30 °C e 50 °C: % mássica de solução aquosa de NaOH e % de quitosana em solução de ácido acético 2 % (v/v).	59
Tabela 4-3 – Propriedades mecânicas dos filmes de quitosana.	70
Tabela 4-4 – Grau de inchamento dos filmes de quitosana.....	71

1. INTRODUÇÃO

É notório o alto potencial poluidor ambiental dos polímeros produzidos através de petróleo, devido a não-biodegradabilidade apresentada pelos materiais. Sendo assim, é indispensável a busca por novos meios de obtenção de matéria-prima sustentável para produção de polímeros. Nesse sentido, a capacidade de processamento de recursos naturais como fonte de produção de polímeros biodegradáveis vem se destacando, demonstrando grande potencial de aplicação industrial. Dentre os diversos polímeros biodegradáveis, a quitosana apresenta vantagens em sua utilização, tais como, ação antimicrobiana, capacidade antioxidante, efeitos hemostáticos e melhora na cicatrização de feridas (KOU; PETERS; MUCALO, 2022; UDAYAKUMAR *et al.*, 2021).

A quitosana é originada através da desacetilação parcial da quitina. A quitina é formada por unidades de N-acetil-D-glucosamina e D-glucosamina ligadas por ligações de β -(1,4)-glicosídicas. Diferente de sua precursora, a quitosana apresenta maior solubilidade em soluções ácidas diluídas, sendo facilmente processada devido à presença de aminas primárias. A protonação dos grupos aminas, o qual ocorre em pH abaixo de 6, torna a quitosana um polieletrólito catiônico (BASTIAENS *et al.*, 2019; CRINI; LICHTFOUSE, 2019; KOU; PETERS; MUCALO, 2021).

O caráter catiônico da quitosana faz com que seus oligômeros apresentem características de biodegradabilidade, baixa toxicidade e biocompatibilidade. Por essas razões, a quitosana é utilizada para múltiplas aplicações, como na agricultura, em tratamento de água e esgoto, em alimentos e bebidas, em cosméticos, na biomedicina e em diversos outros campos industriais (ABD EL-HACK *et al.*, 2020; QIAO *et al.*, 2021; SAHARIAH; MÁSSON, 2017).

Em destaque, a área biomédica tem demonstrado grande interesse do uso de quitosana devido ao seu comportamento junto às características químicas da lisozima. Esta enzima, presente nos fluidos do corpo humano, pode hidrolisar a quitosana e o copolímero alternativo ligado à parede celular bacteriana, N-acetilglucosamina, tornando-a um polímero biocompatível (RAVI KUMAR, 2000). Autores afirmam que a quitosana pode ser um ótimo agente contra a fibroplasia na cicatrização de feridas, proteção da ferida contra agentes nocivos e para promover o crescimento e

regeneração de tecidos (MIGUEL; MOREIRA; CORREIA, 2019), tornando-a ideal para a confecção de suturas absorvíveis, materiais para curativos e bioadesivos.

A aplicação de biopolímeros em curativos vem sendo investigada através da formação de filmes assimétricos, devido a sua semelhança estrutural com a arquitetura da pele (MIGUEL; MOREIRA; CORREIA, 2019). Um filme assimétrico é caracterizado pela variação de tamanho de poros ao longo de sua seção transversal. Quando aplicado como curativo, a superfície do filme contendo poros de tamanhos maiores fica em contato com a pele, possibilitando a troca de fluidos entre a mesma e o meio externo. A superfície contendo poros menores fica em contato com o meio externo, impedindo a entrada de microrganismos patogênicos.

Um dos métodos mais comuns para a formação de filmes assimétricos, a partir de diversos precursores poliméricos, é a inversão de fases. Para entender a base destes processos de separação que ocorrem durante a formação do filme assimétrico, o conhecimento da termodinâmica do sistema em equilíbrio é essencial. A curva de ponto de nuvem é uma ferramenta útil para a fabricação de filmes pela técnica de inversão de fases por precipitação por imersão, pois determina a região de miscibilidade do sistema ternário solvente/polímero/não solvente.

Com base no apresentado e na situação atual das pesquisas em progresso na área biomédica, se faz necessário um melhor entendimento do equilíbrio líquido-líquido do sistema quitosana/solvente/não solvente, assim como da relação estrutura-propriedade através da caracterização da quitosana e dos filmes assimétricos produzidos.

1.1. Objetivos da dissertação

Nesse contexto, o presente trabalho tem como objetivo geral estudar o comportamento termodinâmico na inversão de fases do sistema quitosana/solução aquosa de ácido acético/solução aquosa de hidróxido de sódio e o desenvolvimento de filmes assimétricos de quitosana por precipitação por imersão para aplicação na área da saúde.

Os seguintes objetivos específicos foram traçados:

- caracterizar a quitosana quanto a sua pureza, grau de desacetilação, estrutura química, cristalinidade e estabilidade térmica;

- avaliar o comportamento termodinâmico do sistema composto por quitosana/solução aquosa de ácido acético/solução aquosa de hidróxido de sódio através de experimentos de ponto de nuvem;
- avaliar o processo de formação de filmes através da técnica de inversão de fases de precipitação por imersão seguido de secagem por liofilização, com diferentes concentrações do polímero;
- caracterizar os filmes formados quanto à estrutura química, morfologia, estabilidade térmica, cristalinidade, grau de inchamento e propriedades mecânicas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Este capítulo se destina à análise e discussão de artigos e revisão do estado da arte sobre o polímero quitosana, a termodinâmica de soluções, formação de filmes microporosos e a aplicação na área médica, assuntos que motivam o desenvolvimento do presente trabalho.

2.1. Biopolímeros

Há muito tempo o petróleo vem sendo a principal fonte de matéria-prima para a produção de polímeros, porém, devido ao alto potencial poluidor desse insumo, se faz necessária a busca por novos materiais que sejam obtidos de outras fontes (NIAOUNAKIS, 2015). Nesse sentido, os biopolímeros vêm se destacando como materiais poliméricos que podem ser produzidos de fontes biodegradáveis e têm grande capacidade de aproveitamento dos recursos naturais como fonte de produção, além de grande potencial de aplicação industrial.

Os biopolímeros são materiais poliméricos que podem ser produzidos a partir de organismos vivos ou de matérias-primas de fontes renováveis. Biopolímeros originados de microrganismos são formados devido ao ciclo de crescimento microbiano, que os forma dentro de células em seu metabolismo. Exemplos de biopolímeros naturais são proteínas, poliésteres, polissacarídeos (NIAOUNAKIS, 2015) e poliácido láctico. Quando originados de fontes renováveis, assim como produtos usados para a fabricação de embalagens plásticas, formam-se biopolímeros sintéticos como a poli(ϵ -caprolactona), poliamidas e poli (vinil álcool) (YAASHIKAA; SENTHIL KUMAR; KARISHMA, 2022).

Nos biopolímeros sintetizados por organismos vivos, os monômeros são: aminoácidos, ácidos nucleicos e monossacarídeos. Os monômeros tem estruturas ligadas umas às outras, em formas que podem ser lineares ou ramificadas (KOU; PETERS; MUCALO, 2022; YAASHIKAA; SENTHIL KUMAR; KARISHMA, 2022). A quitosana, a celulose e a quitina pertencem à classe de polissacarídeos, são biopolímeros em que as ligações glicosídicas conectam sacarídeos monoméricos (ASPINALL, 1970; KARTIK *et al.*, 2021). A caracterização desses biopolímeros é

essencial para entender a sua complexidade estrutural e garantir a sua melhor aplicação.

O potencial de aplicabilidade dos biopolímeros é extenso e vai desde materiais simples como suturas, sacos de lixo e material de preenchimento de embalagens até matérias-primas importantes nas áreas de medicina, alimentação, cosmética, agronegócios, entre outras aplicações (AMBAYE *et al.*, 2022). Entre as aplicações na área médica estão os sistemas de liberação de drogas, os produtos de fechamento e cicatrização de feridas e os dispositivos de implante cirúrgico. No campo da cicatrização de feridas estão dispostos os materiais reabsorvíveis para substituição de tecido humano (HAMEDI *et al.*, 2022; VAN DE VELDE; KIEKENS, 2002) que apresentam grande visibilidade da indústria devido a sua biodegradabilidade, compatibilidade e não toxicidade. Segundo a literatura, os principais biopolímeros empregados nessa área são: colágeno, celulose, amido e a quitosana. Dentre os polímeros biodegradáveis, a quitosana se destaca devido a sua ação antimicrobiana, capacidade antioxidante, efeitos hemostáticos e melhora na cicatrização de feridas (KOU; PETERS; MUCALO, 2022; UDAYAKUMAR *et al.*, 2021).

2.2. Quitosana

A quitosana é conhecida como o principal derivado parcialmente desacetilado da quitina, apresenta maior solubilidade que sua precursora (quitina), sendo solúvel em soluções ácidas diluídas, melhorando, desta forma, as condições de processamento (BASTIAENS *et al.*, 2019; KOU; PETERS; MUCALO, 2021). Os oligômeros de quitosana foram relatados como tendo biodegradabilidade, baixa toxicidade e biocompatibilidade. Por essas razões, a quitosana é utilizada para múltiplas aplicações, como a agricultura, tratamento de água e esgoto, alimentos e bebidas, cosméticos, biomedicina e diversos outros campos industriais (ABD EL-HACK *et al.*, 2020; QIAO *et al.*, 2021; SAHARIAH; MÁSSON, 2017).

A quitosana é derivada da quitina que consiste em polissacarídeos cristalinos formados por cadeias de monossacarídeo de glicose modificado, tais como N-acetil-D-glucosamina e a D-glucosamina (BASTIAENS *et al.*, 2019). É o biopolímero mais encontrado na natureza depois da celulose e está presente em uma variedade de espécies eucarióticas, como crustáceos, insetos e fungos (ARSHAD; ZUBAIR; ULLAH, 2020; EL KNIDRI *et al.*, 2018). As propriedades físico-químicas da quitosana

diferem entre as espécies de crustáceos que originam a quitina (ARSHAD; ZUBAIR; ULLAH, 2020). O processo de obtenção mais comum da quitina consiste, basicamente, na moagem de conchas dos crustáceos, seguido da desmineralização e descalcificação do pó, normalmente, com ácido clorídrico diluído. Essa etapa é realizada para retirar os minerais presentes, principalmente o carbonato de cálcio. Em seguida, é realizada a desproteínização com hidróxido de sódio e desodorização da quitina, visando reduzir o odor marcante do material (BASTIAENS *et al.*, 2019).

Nos organismos vivos a quitina age na biomineralização, como calcificação e silicificação, fornecendo locais preferenciais para nucleação e controlando a localização e orientação das fases minerais. A biomineralização explica a presença de quitina em estruturas sólidas em uma variedade de biomassa, como em paredes celulares (KOU; PETERS; MUCALO, 2021).

2.2.1. Estrutura e propriedades físicas e químicas

Como visto, a quitina é formada por unidades de N-acetil-D-glucosamina e D-glucosamina ligadas por ligações de β -(1,4)-glicosídicas. Quando sujeitas à desacetilação, parte das unidades de repetição no polímero são transformadas em unidades sem o grupo acetil, como β -(1,4)-D-glucosamina, passando então a ser conhecida como quitosana (ABD EL-HACK *et al.*, 2020; EL KNIDRI *et al.*, 2018). A fração molar de unidades N-acetiladas é definida como o grau de acetilação (GA), enquanto a porcentagem das unidades de repetição de β -(1,4)-D-glucosamina nos polissacarídeos é conhecida como o grau de desacetilação (GD) (EL KNIDRI *et al.*, 2019; KOU; PETERS; MUCALO, 2021). Diversas definições de quitina e quitosana estão presentes na literatura, porém as publicações atuais não chegam a um consenso quanto aos valores de GD onde a quitina passa a ser considerada quitosana, contudo geralmente a sua venda comercial em pó, tem valores de GD entre 70 e 90 % (KOU; PETERS; MUCALO, 2021; WEISSPFLOG *et al.*, 2021).

A quitosana possui entre 5 e 8 % de nitrogênio que se apresenta na forma de grupos de amina alifática primária, o que a torna elegível para reações típicas de aminas (ISLAM; BHUIYAN; ISLAM, 2017). Na quitina, estes grupos se apresentam na forma de amina acetilada, sendo assim, a quitosana é quimicamente mais ativa do que a quitina devido à presença de grupos hidroxila primários e secundários em cada unidade de repetição e ao grupo amina em cada unidade desacetilada (ARSHAD;

ZUBAIR; ULLAH, 2020; PILLAI; PAUL; SHARMA, 2009). A representação da estrutura química da quitina e da quitosana pode ser vista na Figura 2-1.

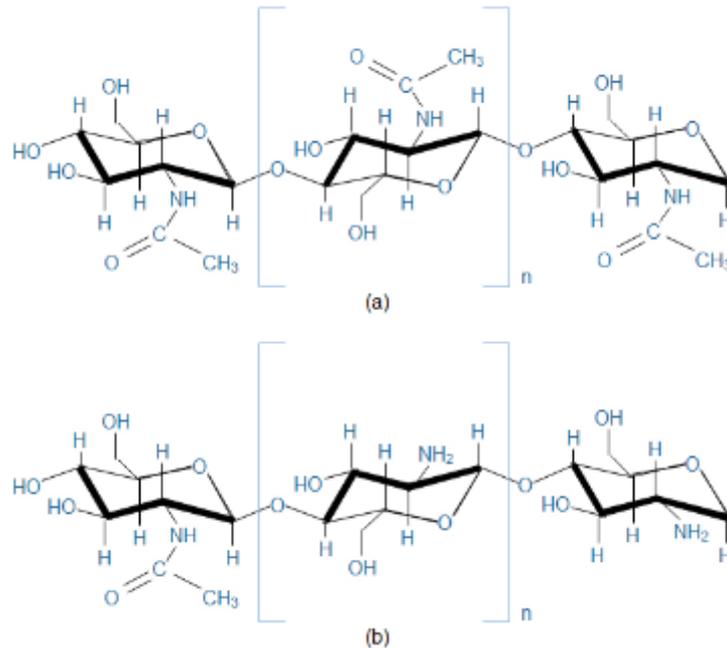


Figura 2-1 – Representações estruturais da quitina (a) e quitosana (b).
Fonte: adaptado de KUMARI; KISHOR, 2020.

Desacetilação da Quitina

A abordagem mais usual para a produção da quitosana é através do método de desacetilação da quitina. O processo de desacetilação é principalmente caracterizado pela remoção do grupo acetil das moléculas de quitina e determina o conteúdo do grupo amina livre (NH_2) na quitosana. Nesse método, a quitina é tratada com uma solução aquosa de hidróxido de sódio ou potássio, a fim de evitar que a quitosana seja contaminada pelas proteínas geradas pelos produtos da quitina. Após, o material resultante é transformado em quitosana por meio de uma etapa de desacetilação (ARSHAD; ZUBAIR; ULLAH, 2020; EL KNIDRI *et al.*, 2019; MUXIKA *et al.*, 2017). A reação de substituição nucleofílica de desacetilação tem duas etapas, começando pela etapa de adição nucleofílica de um hidróxido nos grupos carboxila (BASTIAENS *et al.*, 2019) e a formação da amina pela separação do ácido acético. A desacetilação é tradicionalmente realizada em meio alcalino usando hidróxido de sódio ou potássio em concentrações de 40 a 45 % (m/m) e temperatura que varia entre 100 e 160 °C no intervalo de 1 a 3 horas (BASTIAENS *et al.*, 2019; KOU; PETERS; MUCALO, 2021). Todo o processo é realizado na ausência de oxigênio,

seguido por procedimentos de purificação para a obtenção da quitosana de natureza catiônica (KHAYROVA; LOPATIN; VARLAMOV, 2021).

A desacetilação heterogênea, onde a quitina é tratada com uma solução concentrada de NaOH e a quitosana é produzida como um resíduo insolúvel, não é capaz de alcançar a completa desacetilação da quitina em uma única etapa, porém com a repetição do tratamento com NaOH pode-se atingir até 99 % de GD (LI; ZHUANG, 2020).

Como visto anteriormente, o GD é proporcional ao grau de transformação da quitina em quitosana, e esse depende diretamente do processo de tratamento com hidróxido de sódio, da sua concentração, da temperatura e do tempo de reação (ISLAM; BHUIYAN; ISLAM, 2017). O grau de desacetilação é responsável por indicar as características químicas mais importantes para a aplicação da quitosana, assim como, atividade antimicrobiana, biodegradabilidade, biocompatibilidade e solubilidade (LI; ZHUANG, 2020).

Autores avaliaram o uso de quitosana com GD de 72 e 85 % e como resultado obtiveram um produto com propriedades mecânicas diminuídas para quitosana com maior GD, aumentando a fragilidade do material (FOSTER *et al.*, 2015). TAKAHASHI *et al.* (2008) demonstraram que o aumento do GD de 84 % para 92 % apresentou maior potencial inibidor para *Staphylococcus aureus*, não apresentando inibição para a quitosana com GD menor que 82 %. Resultados semelhantes foram observados por CHIU *et al.*, (2007) e YOUNES *et al.*, (2014). ARANAZ *et al.* (2012) demonstraram que a biodegradabilidade da quitosana aumenta na medida em que o GD diminui. Estes estudos demonstram que a quitosana de alto GD tem potencial de aplicação em produtos biomédicos, mas, ao mesmo tempo, com comportamento mecânico muito complexo.

Além do grau de desacetilação, a massa molar, a solubilidade, a cristalinidade, o conteúdo de água e valor de retenção de água são parâmetros considerados de suma importância na aplicação da quitosana (HISHAM *et al.*, 2021).

A determinação da massa molar (MM) é muito utilizada para a avaliação da atividade biológica da quitosana, influenciando na viscosidade de soluções. Estudos mostram que tal atividade aumenta com a diminuição da MM e GD (ARANAZ *et al.*, 2012; PILLAI; PAUL; SHARMA, 2009). Desta forma, a massa molar relaciona a estrutura molecular com a atividade biológica, possibilitando avaliar os processos bioquímicos induzidos nas células (LI; ZHUANG, 2020; RASHKI *et al.*, 2021;

VINSOVA; VAVRIKOVA, 2011). Pesquisadores avaliaram o uso da quitosana de baixa massa molar e verificaram que a atividade antimicrobiana foi melhorada, quando comparada à quitosana de média e alta massa molar, porém se tornou praticamente nula para bactérias gram-negativas quando a massa molar é muito baixa, abaixo de 50 kDa. Quitosana de alta massa molar, acima de 700 kDa, mostrou maior efetividade na inibição de bactérias gram-negativas, porém menor atividade para bactérias gram-positivas. Para a quitosana de média massa molar, entre 300 e 500 kDa, tanto bactérias gram-negativas quanto gram-positivas apresentaram grande sensibilidade (ARANAZ *et al.*, 2012; NO *et al.*, 2002).

Sabemos que a quitosana é o derivado solúvel da quitina, também é conhecido o fato de que a cristalinidade está diretamente ligada à solubilidade do polímero. Estudos indicam que a quitosana é menos cristalina que a quitina, isso se deve ao fato da quitina ter uma estrutura bem compacta na qual a cadeia antiparalela favorece fortes ligações de hidrogênio de quatro grupos hidroxila e dois grupos amida na unidade de repetição (CHO *et al.*, 2000). Conseqüentemente, a quantidade de ligações de hidrogênio diminui para a quitosana com a diminuição dos grupos acetil, tornando-a menos cristalina. Esse fato traz uma ligação direta com o grau de desacetilação da quitosana, sendo que quanto maior o GD da quitosana menor será sua cristalinidade e mais solúvel será a amostra.

A Tabela 2-1, traz um resumo das características físico-químicas mencionadas com os respectivos métodos de determinação e suas relações com as propriedades da quitosana (ARANAZ *et al.*, 2012).

Além dos critérios já mencionados, a distribuição dos grupos acetil ao longo da estrutura linear das moléculas de quitosana pode ser de grande importância na definição das interações com os sistemas biológicos (LECETA *et al.*, 2013; LI; ZHUANG, 2020; LIM; HWANG; LEE, 2021). A distribuição dos grupos acetil pode ser determinada por cromatografia de permeação em gel, detecção de índice refletivo e espectroscopia no ultravioleta visível. Autores mostraram que quitosana com distribuição de grupos acetil aleatória apresenta como característica uma melhor solubilidade em ácido acético, sem formar precipitados ou géis, facilitando seu processamento, porém essa distribuição não é comum para quitosana obtida por desacetilação heterogênea, que apresenta distribuição de grupos acetil em blocos sequenciais (KUMARI; KISHOR, 2020).

Tabela 2-1 – Relação entre as propriedades biológicas da quitosana, suas características físico-químicas e os métodos de determinação.

Fonte: Adaptado de ARANAZ et al., 2012.

Características Físico-químicas	Métodos de determinação	Propriedades
Grau de desacetilação	Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)	Biodegradabilidade, biocompatibilidade, atividade antioxidante, muco adesividade e capacidade de adsorção
	Espectroscopia UV	
	Espectroscopia de ressonância magnética (RMN)	
	Titulação condutivimétrica	
	Titulação potenciométrica	
Massa molar	Calorimetria exploratória diferencial (DSC)	Biodegradabilidade, atividade antioxidante, atividade antimicrobiana e muco adesividade
	Viscosimetria	
	Cromatografia de permeação em gel	
	Dispersão de luz	
Cristalinidade	Difração de raios X (DRX)	Solubilidade e atividade antimicrobiana

2.2.2. Determinação do Grau de desacetilação (GD) da quitosana

Como visto anteriormente, o grau de desacetilação é um dos parâmetros mais importantes a ser investigado antes da aplicação da quitosana, pois influencia em muitas propriedades do material, como biodegradabilidade, biocompatibilidade, ação antioxidante e solubilidade. Assim, a busca por métodos precisos, simples, rápidos e de baixo custo para determinar o GD tem sido uma das principais preocupações relatadas em diversas pesquisas. A determinação do GD por espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) foi avaliada como a principal técnica que reúne essas vantagens (BAXTER *et al.*, 1992; DOMSZY; ROBERTS, 1985; KASAAI, 2009). O grau de desacetilação é definido como a razão entre os grupos N-acetil-D-glucosamina e a D-glucosamina. Para a determinação do GD a partir da análise de FTIR é necessária a construção de uma curva de calibração em relação aos valores de grau de desacetilação padrão, utilizando razões de absorbâncias (A) de uma banda de sonda sensível ao número de grupos acetil presentes (PB), em relação a uma banda de referência independente de GD (RB). As absorbâncias de PB e RB são determinadas pelo método de linha de base (BL) (BEIL et al., 2012; DUARTE et al., 2002).

A construção da curva de calibração não é trivial, já que a escolha das bandas de sonda e referência com diversas linhas de base não é óbvia. Diversas razões para $A_{PB}(BL)/A_{RB}(BL)$ foram sugeridas, onde A é a área da banda escolhida, mas nenhuma delas poderia realmente fornecer valores precisos em toda a faixa de GD de 0–100 %.

O resultado depende diretamente da escolha das bandas, tendo em vista que diferentes razões $A_{PB}(BL)/A_{RB}(BL)$ geram diferentes resultados para o GD. DUARTE (2002) e KASAAI (2009) compilaram e testaram algumas razões indicadas por autores para determinação do GD pela técnica de FTIR.

Em 1980, MOORE e ROBERTS, propuseram as bandas em 1663 cm^{-1} (estiramento do grupo C=O da amida I) como banda sensível e em 3448 cm^{-1} (estiramento do grupo O-H, a hidroxila) como banda referência. O GD é obtido pela Equação 1:

$$GD = 100 - \left(\frac{A_{PB}}{A_{RB}} * \frac{100}{1,33} \right) \quad (1)$$

O valor 1,33 representa a razão entre A_{PB}/A_{RB} para quitina totalmente acetilada.

DONG et al. (2002) propuseram as bandas em 1561 cm^{-1} (estiramento da amida II) como PB e a banda em 2877 cm^{-1} (estiramento do grupo CH no anel) como RB. KASAAI (2009) adaptou os resultados aplicando a seguinte equação linear:

$$\frac{A_{PB}}{A_{RB}} = 0,0125 * GA + 0,2 \quad (2)$$

A Equação 2 retorna o valor do grau de acetilação (GA), sabe-se que $GA + GD = 100\%$, sendo assim, $GD = 100 - GA$.

BAXTER et al. (1992) estudaram o uso das mesmas bandas defendidas por Moore e Roberts (1980), com a utilização da Equação 3:

$$GD = 100 - \left(\frac{A_{PB}}{A_{RB}} * 115 \right) \quad (3)$$

O valor 115 representa o valor das inclinações das curvas lineares para as razões de bandas obtidas por repetidos testes com diferentes amostras de quitosana com diferentes GD. O autor KASAAI sugeriu uma modificação na fórmula proposta por

Moore e Roberts, adicionando a banda 1626 cm⁻¹ (C=O), estiramento da amida primária) como somatório à banda sensível, resultando na Equação 4:

$$GD = 100 - \left(\frac{A_{PB} + A_{1626}}{A_{RB}} * \frac{100}{1,33} \right) \quad (4)$$

O autor também sugeriu uma modificação semelhante ao sistema proposto por BAXTER et al. (1992), segundo a Equação 5:

$$GD = 100 - \left(\frac{A_{PB} + A_{1626}}{A_{RB}} * 115 \right) \quad (5)$$

Para uma leitura mais completa da faixa de GD, Kumirska (2010) indica a banda do estiramento CH. No entanto, essa banda também é uma banda de leitura complexa, pois muitas bandas CH simétricas e assimétricas podem ser lidas nessa região, assim como, C-H do anel glicosídeo, CH₂OH e CH₃ ligado a grupos acetil. Contudo, apenas os CH ligados ao grupo acetil são afetados pelo GD (KASAAI, 2008). Apesar disso, essa banda é escolhida pelo fato de não ser afetada pelo teor de água e ligações de hidrogênio.

A relação proposta entre A₁₅₆₁/A₂₈₇₇ tem melhores resultados para GD entre 40-100 % e mais imprecisos para GD abaixo de 30 %. É amplamente visto que a intensidade da banda de flexão de NH aumenta com o aumento do GD (BRANCA et al., 2016; KASAAI, 2008).

Em síntese, as bandas de C=O e NH como bandas sensíveis não são capazes de compreender toda a faixa de GD. Ainda assim, a banda C=O é dita sendo melhor para leituras de GD > 90 % e a banda NH se adequaria a leituras de GD < 90 % (DUARTE et al., 2002; KASAAI, 2008; MOORE; ROBERTS, 1980).

Os desvios vistos com o uso da banda C=O são atribuídos ao possível ombro de sobreposição causado pelo estiramento C=O e C-N da amida primária, encontrados em 1655 e 1625 cm⁻¹, respectivamente. Assim, sugere-se que a soma dessas duas bandas poderia aumentar a precisão dos valores de GD (KASAAI, 2008).

Comparando as bandas de referência O-H e C-H, a banda referente ao estiramento O-H tem maior intensidade, mas o fato de a banda C-H não ser afetada por ligações de hidrogênio, traz certa segurança para a determinação mais precisa do GD (BRANCA et al., 2016; KASAAI, 2008).

Em resumo, as leituras utilizando as razões entre as bandas A_{1655}/A_{3450} e A_{1630}/A_{3450} são mais indicados para GD entre 20-85 % e 40-100 %, respectivamente. Essas razões são indicadas para amostras com maior cristalinidade e sem umidade, com pouca precisão para altos valores de GD. Já a razão A_{1560}/A_{2870} oferece uma boa leitura de GD em torno de 40-100 %, podendo causar erros para valores baixos de GD (KASAAI, 2008, 2009).

A soma das bandas em 1655 e em 1625 cm^{-1} promete compreender toda a faixa de valores de GD, evitando os problemas de formação de ombro e alargamento de banda. Porém, pode causar imprecisões quando a amostra está úmida e os valores de GD são muito baixos (KASAAI, 2008).

Outra maneira de determinar o grau de desacetilação da quitosana é através de titulação condutivimétrica. A titulação condutivimétrica se mostra mais econômica e precisa para determinações de GD entre 65 e 100 % (KASAAI, 2009). Uma das limitações desse método é a alta capacidade de absorção de água da quitosana, pois mesmo uma curta exposição da amostra à umidade do ar pode causar mudanças no valor do GD. Mesmo assim, a técnica de titulação condutivimétrica é comumente empregada para quantificar os grupos ácidos com boa precisão e simplicidade. A solubilidade é um fator limitante na escolha da técnica, pois amostras com baixo grau de desacetilação são insolúveis na maioria dos solventes.

Na faixa de massa molar da quitosana utilizada neste trabalho (190 a 310 kDa) o uso de ambas as técnicas, FTIR e titulação condutivimétrica, traz resultados confiáveis para o GD médio da quitosana.

2.2.3. Solubilidade da quitosana

A ciência e tecnologia de polímeros tem mostrado grande interesse na área voltada à dissolução de polímeros devido ao aumento das possibilidades de processamento (ARSHAD; ZUBAIR; ULLAH, 2020). A estrutura e a composição do polímero têm grande influência na determinação da sua solubilidade em determinado solvente e a estrutura da quitina exemplifica essa relação. Sua estrutura semicristalina conta com fortes ligações de hidrogênio que causam um aumento nos parâmetros de solubilidade, tornando-a insolúvel na maioria dos solventes comuns (PILLAI; PAUL; SHARMA, 2009). A maioria dos solventes aplicados à dissolução da quitina são potencialmente tóxicos, corrosivos ou mutagênicos, na sua maioria são ácidos fortes

como fluoroálcoois, cloroálcoois e algumas soluções salinas hidrotópicas, que podem promover a degradação da quitina impossibilitando a sua aplicação em escala industrial e em produtos medicinais (DENG *et al.*, 2021; KAMALI *et al.*, 2019). A quitosana também tem restrições na solubilização, não é solúvel em nenhum solvente orgânico, como por exemplo, a dimetilformamida (PILLAI; PAUL; SHARMA, 2009), porque a estrutura semicristalina da quitosana e a presença da rede de ligações de hidrogênio intra e intermolecular conferem propriedades insolúveis ao polímero (EL KNIDRI; LAAJEB; LAHSINI, 2020). Porém, a quitosana apresenta como característica a formação de sais de nitrogênio, conforme ilustrado na Figura 2-2, em pH baixo (abaixo de 6,5), o que permite a sua dissolução em ácidos orgânicos. A quitosana pode ser dissolvida em uma série de soluções aquosas ácidas diluídas de ácidos, como ácido acético, ácido clorídrico, ácido láctico, ácido fítico, entre outros, com o pH abaixo de seu pKa de 6,3 (LI; ZHUANG, 2020). Sabe-se que a quitosana tem alta hidrofiliabilidade (ARSHAD; ZUBAIR; ULLAH, 2020), porém, ela não é miscível em água pura.

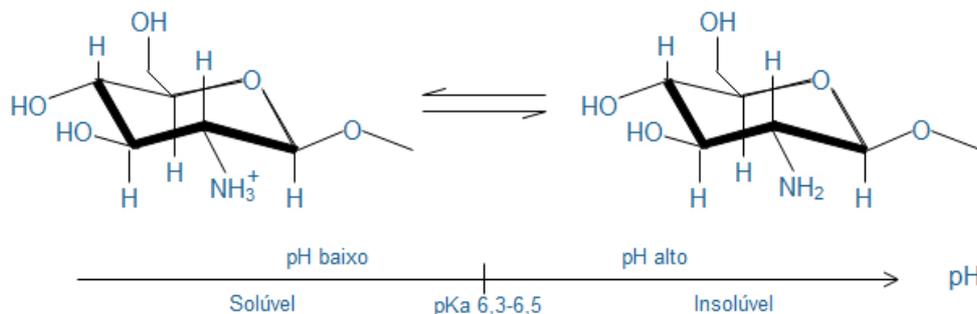


Figura 2-2 – Diagrama demonstrativo da solubilidade da quitosana em função da sua protonação versus pH do meio. Fonte: adaptado de ARSHAD; ZUBAIR; ULLAH, 2020.

A solubilidade da quitosana é diretamente dependente da distribuição dos grupos acetil ao longo da sua cadeia, do grau de desacetilação e das propriedades do ácido empregado (THEVARAJAH *et al.*, 2016). A quitosana pode ser considerada uma base forte por ter grupos de amina primárias em sua composição. Em pH abaixo de 6, esses grupos podem ser protonados, o que a torna um polieletrólito catiônico solúvel em água. A Figura 2-2 traz a representação do que ocorre quando o pH é aumentado acima de 6: as amins tornam-se não protonáveis e a quitosana passa a ser insolúvel.

Outro parâmetro importante para a solubilização da quitosana é o grau de ionização do ácido, que decorre do seu pH e pKa, baseando-se no mecanismo de

protonação da quitosana. Dessa forma, a protonação da quitosana é de suma importância, pois a dissolução do biopolímero permite a obtenção de filmes, membranas, grânulos, fibras ou esponjas a partir de processos de precipitação. Mesmo a dissolução da quitosana sendo mais fácil que a da quitina, a estabilidade dos produtos é comprometida pelo seu caráter extremamente hidrofílico (QIAO *et al.*, 2021). A Figura 2-3 ilustra a possível reação entre a quitosana e o ácido acético.

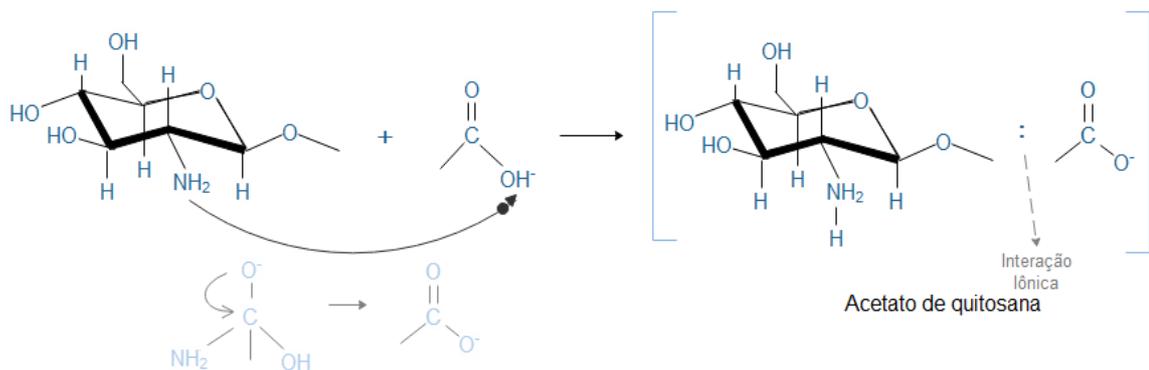


Figura 2-3 – Equação química da reação entre a quitosana e o ácido acético. Fonte: adaptado de ARSHAD; ZUBAIR; ULLAH, 2020.

A eficiente caracterização físico-química, além de outros fatores como a aplicação segura (sem o risco de liberação de produtos tóxicos), são significativamente prejudicados pela dificuldade de dissolução total da quitosana sem correr o risco de degradá-la. Uma solução completamente diluída é definida como uma solução onde todas as cadeias de quitosana estão envoltas pelas moléculas do solvente (MILLER-CHOU; KOENIG, 2003; THEVARAJAH *et al.*, 2016). Sabe-se que mesmo que a amostra esteja aparentemente dissolvida (líquido transparente), essa aparência não afirma a sua completa dissolução. A completa dissolução da quitosana depende de diversos fatores que incluem características estruturais, como a distribuição dos grupos acetil, e de fatores ambientais como força iônica, pH, temperatura, tempo e constante dielétrica do solvente (CRINI; LICHTFOUSE, 2019; DOMARD, 2011; THEVARAJAH *et al.*, 2016).

Segundo THEVARAJAH (2016), a quitosana não é capaz de ser dissolvida totalmente em ácido acético a temperatura ambiente, porém na presença de temperatura, entre 30 °C e 60 °C, seria possível formar uma solução límpida devido a alteração do equilíbrio, que é deslocado favorecendo a solução.

A constante de ionização (K_a) do grupo amina é de fundamental importância para aplicação de materiais poliméricos, uma vez que delimita suas interações físico-

químicas, bem como as propriedades do produto. A constante de dissociação/ionização é baseada no equilíbrio envolvendo ácidos e bases e para a quitosana é obtida a partir do equilíbrio apresentado nas Equações 6, 7 e 8.



$$K_a = \frac{[\text{Quit} - \text{NH}_2][\text{H}_3\text{O}^+]}{[\text{Quit} - \text{NH}_3^+]} \quad (7)$$

$$pK_a = -\log(K_a) \quad (8)$$

A constante de ionização da quitosana depende diretamente da concentração de íons H_3O^+ da solução, sendo esse dependente da constante de dissociação do ácido (K) e do grau de protonação da quitosana. O grau de protonação (α) da quitosana pode ser calculado usando a Equação 9, demonstrada por Rinaudo, 1999:

$$\alpha = \frac{(\alpha'' C_A - [\text{H}_3\text{O}^+])}{C_p} \quad (9)$$

onde C_A é a concentração do ácido em solução aquosa, C_p é a concentração de quitosana e α'' é o grau de dissociação do ácido na presença de quitosana, dado por $K/(K + [\text{H}_3\text{O}^+])$. A concentração de H_3O^+ é determinada por leituras de pH do meio. Finalmente, a constante de ionização da quitosana (K_a) pode ser calculada por meio da Equação 10:

$$K_a = K \frac{(1-\alpha'')}{\alpha''} \cdot \frac{1-\alpha}{\alpha} = [\text{H}_3\text{O}^+] \frac{1-\alpha}{\alpha} \quad (10)$$

Segundo RINAUDO et. al. (1999), a solubilização da quitosana ocorre em α variando de 0,5 a 0,6. Outros autores avaliaram o uso da quitosana com α igual a 0,5 e verificaram que a completa solubilização não foi alcançada sem variação de temperatura e/ou filtragem da solução (LUKMAN HEKIEM *et al.*, 2021; PILLAI; PAUL; SHARMA, 2009; THEVARAJAH *et al.*, 2016). Portanto, pode-se constatar que a solubilidade da quitosana é um parâmetro difícil de ser controlado, pois tem muitos fatores envolvidos em sua determinação. Esses fatores podem incluir temperatura,

tempo e grau de desacetilação do polímero, massa molar e tratamentos anteriores aplicados à quitina (QIAO *et al.*, 2019). O solvente mais amplamente utilizado para a solubilização deste material é a solução aquosa de ácido acético (com concentração entre 1 e 2 % v/v), que tem seu pH em torno de 4,0 (QIAO *et al.*, 2021). O ácido acético é amplamente empregado como solvente da quitosana pois é um solvente acessível, no qual as moléculas de quitosana são muito menos decompostas, mantendo as propriedades do polímero. A concentração de ácido necessária para a solubilização da quitosana depende diretamente da quantidade de quitosana a ser dissolvida, pois a concentração de prótons necessária para dissolve-la deve ser ao menos igual à concentração de unidades –NH₂ (PILLAI; PAUL; SHARMA, 2009).

2.2.4. Atividade antimicrobiana da quitosana

A atividade antibacteriana da quitosana tem sua ação influenciada, entre outros, pela sua massa molar, grau de desacetilação, tipo da bactéria, pH e temperatura do ambiente e idade da célula bacteriana, ou seja, a fase de crescimento da célula (KUCHARSKA *et al.*, 2019). A literatura confirma que a quitosana apresenta mecanismos diferentes de ação para bactérias gram-positivas e gram-negativas (HOSSEINNEJAD; JAFARI, 2016; RASHKI *et al.*, 2021; SAHARIAH; MÁSSON, 2017). Essa diferença na atividade pode ser devida à diferença na composição das suas paredes celulares.

As bactérias Gram-positivas possuem uma parede celular composta por uma espessa camada de peptidoglicano, contendo ácidos teicóicos carregados negativamente ligados covalentemente ao ácido n-acetilmurâmico. Os ácidos lipopoliteicóicos formam ligações covalentes com a membrana citoplasmática. Os ácidos teicóicos têm como função promover força à parede celular e organizar cargas uniformes de alta densidade, afetando assim a passagem de íons através das camadas superficiais externas.

Já as bactérias Gram-negativas, contam com uma fina camada de peptidoglicano acima da membrana citoplasmática, elas são cobertas pela membrana externa, composta principalmente por lipoproteína e lipopolissacarídeo (SAHARIAH; MÁSSON, 2017).

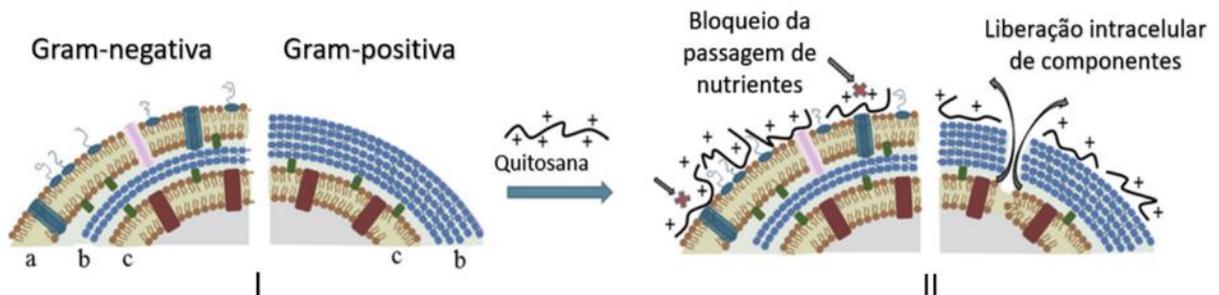


Figura 2-4 – (I) Representação ilustrativa do primeiro modelo de ação antimicrobiana da quitosana. Composição estrutural do envelope externo de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas: (a) membrana externa; (b) camada de peptidoglicano; (c) membrana citoplasmática. (II) Efeito da ligação da quitosana ao envelope externo de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Fonte: Adaptado de SAHARIAH; MÁSSON, 2017.

O mecanismo exato de ação antibacteriana da quitosana ainda permanece em debate, porém há um consenso de que ele ocorre pela interação da quitosana com a superfície bacteriana. Para explicar esse mecanismo, são encontrados três modelos na literatura: (i) interação eletrostática; (ii) quelação da superfície bacteriana e (iii) interação com o DNA. O primeiro mecanismo, e o mais corroborado pela literatura, se baseia na atração eletrostática dos grupos catiônicos da quitosana em direção aos componentes carregados negativamente existentes na superfície bacteriana. Em $\text{pH} < 6$, devido à ligação com os poliânions, os grupos amina de D-glucosamina (NH_3^+) protonados disputam com os íons metálicos bivalentes, que assim são encontrados na parede celular bacteriana. Portanto, a presença de cargas catiônicas no esqueleto de quitosana é um requisito chave para que o biopolímero seja efetivo no combate às bactérias. Sendo assim, a atividade antimicrobiana de quitosana é altamente diminuída em $\text{pH} 7$ ou acima deste, devido à desprotonação de grupos amina e sua solubilidade diminuída. Muito se discute sobre como a interação eletrostática pode se comportar de forma diferente de acordo com o tipo de espécie bacteriana. Em bactérias Gram-positivas, o vazamento dos componentes intracelulares da bactéria ocorre devido a hidrólise dos peptidoglicanos na parede celular, como mostra a Figura 2-4. Alguns estudos demonstraram um aumento na interação elétrica dessas bactérias, em consequência da hidrólise dos peptidoglicanos, esse comportamento pode ser observado pela suspensão celular, que tem sua condutividade aumentada, assim como pela liberação de β -galactosidase citoplasmática.

Um segundo mecanismo proposto é que os íons metálicos presentes na superfície bacteriana são quelados pelos grupos amina da quitosana, que apresenta excelentes propriedades quelantes, devido à capacidade de doação dos grupos amina

não protonados formando complexos metálicos. O pH do meio tem grande influência na efetividade desse mecanismo, tendo em vista que o efeito quelante supera o efeito eletrostático apenas quando o pH do meio é maior que o pKa da quitosana. O processo quelante pode ocorrer tanto pelo modelo em ponte, onde os grupos amino ou de diferentes cadeias de quitosana estão ligados aos íons metálicos, quanto pelo modelo pingente, em que os íons metálicos estão ligados aos grupos amino. Essa ligação entre os grupos amino livres e os íons metálicos bivalentes, como Ca^{2+} e Mg^{2+} que estão presentes na parede celular do microrganismo, impedem a produção de toxinas e, assim, inibem o seu crescimento.

No terceiro modo de ação proposto, supõe-se que haja um ataque intracelular aos microrganismos pela quitosana. De acordo com essa teoria, a quitosana é capaz de interagir diretamente com o DNA da célula, quando se tratando de bactérias e fungos, perfurando a célula microbiana. Estudos concluíram que a mureína reticulada (parede celular bacteriana multicamada) pode ser perfurada pela quitosana, bem como na membrana citoplasmática. Com a ligação da quitosana ao DNA, a célula acaba por ser destruída impedindo a reprodução do DNA e interrompendo a síntese de proteínas e mRNA. Esse modelo de ação antibacteriana parte da ideia de que a quitosana é capaz de penetrar na parede celular de múltiplas camadas e na membrana citoplasmática (SAHARIAH; MÁSSON, 2017).

A atividade antimicrobiana da quitosana é igualmente afetada pela idade da célula microbiana: ela tem maior capacidade de danificar as células “jovens”, aquelas que ainda não chegaram a sua fase estacionária. Assim também ocorre com a faixa de temperatura entre 4 e 37 °C, que favorece a interação bacteriana (KUCHARSKA *et al.*, 2019). Além disso, o grau de desacetilação causa variação na atividade antimicrobiana da quitosana e é de grande interesse entre muitos pesquisadores. (ABD EL-HACK *et al.*, 2020). Diversos pesquisadores defendem que com o aumento do GD da quitosana a atividade antimicrobiana aumenta gradualmente (BYUN *et al.*, 2013; CHUNG; CHEN, 2008; FEI LIU *et al.*, 2000). Porém, outros defendem que a diminuição do grau de desacetilação favorece a ação antimicrobiana (GOY; DE BRITTO; ASSIS, 2009; OMURA *et al.*, 2003; QIN *et al.*, 2006). Sendo assim, não há um consenso sobre o melhor GD de atividade antimicrobiana da quitosana, mesmo que seu efeito já tenha sido comprovado.

Em relação à atividade antifúngica da quitosana, estudos relatam uma ação mais fungistática, na maior parte de sua ação, do que fungicida (ABD EL-HACK *et al.*,

2020). Ainda assim, a ação da quitosana não é igualmente efetiva para todos os fungos e estes se dividem em dois grupos: os sensíveis e os resistentes à quitosana. O mecanismo de ação antifúngica depende da estrutura da parede celular dos fungos. A parede celular dos fungos é, em sua maioria, formada por quitina e glucanos. Para os fungos sensíveis à quitosana, é dito que a quitosana é capaz de penetrar na superfície da célula interferindo diretamente no seu crescimento. O mecanismo de ação pode ocorrer pela interação dos grupos catiônicos da quitosana com a superfície do fungo devido a atrações eletrostáticas, rompendo a mesma e causando a liberação de componentes intracelulares, muito semelhante ao que ocorre com as bactérias Gram-positivas (SAHARIAH; MÁSSON, 2017). Para os fungos resistentes à quitosana, esse sistema não se adequa, pois a quitosana não consegue penetrar em sua parede celular (VERLEE; MINCKE; STEVENS, 2017).

Neste contexto, a quitosana apresenta-se como uma alternativa promissora para o tratamento de infecções, uma vez que apresenta características desejáveis para confecção de curativos, como capacidade de formação de filme, biocompatibilidade, biodegradabilidade, bioadesividade e atividade antimicrobiana.

2.2.5. Aplicações da quitosana na área médica

Atualmente, a maioria dos polímeros disponíveis consiste em materiais sintéticos, logo a biocompatibilidade e biodegradabilidade desses materiais são limitadas ou inexistentes, quando comparadas aos biopolímeros como a celulose e a quitina (AMBAYE *et al.*, 2022; NIAOUNAKIS, 2015). No entanto, esses biopolímeros apresentam uma limitação quanto a sua processabilidade e caracterização (RAVI KUMAR, 2000). Devido às suas propriedades únicas como solubilização, biocompatibilidade, biodegradabilidade, não toxicidade e absorção, a quitosana tem sido amplamente aplicada nas indústrias de alimentos, biomedicina, farmacêutica, tratamento de efluentes, têxtil, agrícola e outros campos industriais (KONG *et al.*, 2010). Em vista da grande necessidade da área médica em materiais não agressivos ao corpo humano, muitas pesquisas têm sido voltadas ao uso da quitosana em diversas áreas da medicina (HAMED *et al.*, 2022).

O grande interesse do uso de quitosana demonstrado pela área médica se origina das suas características físico-químicas. Boa parte dos tecidos vivos apresentam carga negativa, assim como os microrganismos, permitindo a interação

eletrostática com a quitosana que, quando protonada, possui carga positiva (ORYAN; SAHVIEH, 2017). Um exemplo é a lisozima, uma enzima presente nos fluidos do corpo humano que pode hidrolisar a quitosana e o copolímero alternativo ligado à parede celular bacteriana, N-acetil-D-glucosamina. Este fato torna a quitosana potencialmente útil para aliviar dores, prevenir doenças ou contribuir para uma boa saúde (RAVI KUMAR, 2000). Autores afirmam que a quitosana pode ser um ótimo agente contra a fibroplasia na cicatrização de feridas, proteção da ferida contra agentes nocivos e para promover o crescimento e regeneração de tecidos (MIGUEL; MOREIRA; CORREIA, 2019), tornando-a ideal para a confecção de suturas absorvíveis, materiais para curativos e bioadesivos. A quitosana tem forte potencial para uso em materiais cirúrgicos, farmacêuticos e sistema de liberação de medicamentos, já que complicações advindas de infecções proporcionadas pelos microrganismos ocorrem com muita frequência (ARSHAD; ZUBAIR; ULLAH, 2020). É esperado que devido a esses fatores existam altas taxas de mortalidade, e por essa razão, não se tem medido esforços para o desenvolvimento de um meio de compensar e/ou minimizar esses efeitos com o uso de um antibiótico a esses materiais. A quitosana pode ser uma alternativa para o uso em bioadesivos curativos, suturas cirúrgicas, implantes dentários, reconstituição óssea e tem sido amplamente investigada em liberação controlada de medicamentos em animais e humanos (HAMED I et al., 2022).

Atualmente, uma grande variedade de curativos à base de várias formas de quitosana estão disponíveis no mercado (RASHKI et al., 2021), que, além de apresentarem a capacidade de absorver o líquido exsudato, também se caracterizam pela alta eficácia no transporte de água, entre a pele e o meio ambiente, e contenção do transporte microbiano para a ferida. Muitos estudos têm sido direcionados para a avaliação da capacidade de absorção e evaporação de curativos, para melhoria da capacidade de respiração e liberação de exsudatos da pele através do mesmo. Análises como a absorbância (ABS), a taxa de transmissão de vapor (*moisture vapour transmission rate*, MVTR) e a capacidade de retenção de fluido (*fluid handling capacity*, FHC) são utilizadas para comprovar a efetividade dos curativos nesses quesitos, os quais podem ser obtidos com o uso de uma célula de Paddington (ABD EL-HACK et al., 2020; SUN et al., 2021).

Um curativo ideal para lesões na pele deve ser seguro, esterilizável, atóxico, aderir fortemente ao tecido, controlar a infecção, conservar o ambiente úmido e

promover a troca gasosa, inibir o crescimento bacteriano, absorver os exsudatos, ser degradável e absorvível em prazo razoável e ser acessível, tanto em preço como obtenção (HAMEDI et al., 2022; MIGUEL; MOREIRA; CORREIA, 2019). Nesse campo são aplicados os bioadesivos, uma classe de adesivos derivados de fontes poliméricas, que adere a superfícies de tecido vivo (HAMEDI et al., 2022). Os bioadesivos podem ser fabricados a partir de polímeros sintéticos ou naturais, como por exemplo poli(n-2-hidroxipropil metacrilamida), pectina, alginato, quitosana e ácido poliacrílico.

Para aplicação em curativos, os filmes assimétricos vêm chamando atenção devido a sua semelhança estrutural com a arquitetura da pele (MIGUEL; MOREIRA; CORREIA, 2019). Os filmes assimétricos possuem uma camada superior com poros mais fechados, que é capaz de proteger a pele de poluentes externos, da entrada de microrganismos patogênicos e ainda, controlar as trocas gasosas. A camada inferior, com poros maiores, pode absorver os exsudatos e suportar a bioadesão e proliferação celular (HABERT; BORGES; NOBREGA, 2006; MIGUEL; MOREIRA; CORREIA, 2019).

2.2.6. Filmes de quitosana

Materiais médicos são utilizados para proteger locais de ferida de contaminações nocivas e/ou infecções. No entanto, a maioria desses materiais tradicionais são extremamente secos, permitindo a evaporação da umidade da pele e tendem a se tornar mais aderentes às feridas. Como resultado, eles são difíceis e dolorosos de remover. Para superar esses problemas em relação aos materiais precursores, tem-se utilizado biopolímeros para confecção de curativos, suturas e bioadesivos (KUMARI; KISHOR, 2020).

Neste contexto, a quitosana tem recebido grande atenção na fabricação de materiais biomédicos, pois além de sua capacidade de formar filmes, apresenta a unidade monomérica N-acetil-D-glucosamina que é precursora do ácido hialurônico, uma macromolécula extracelular importante para a recuperação de feridas.

Muitos trabalhos na literatura reportam a fabricação de filmes densos de quitosana, cuja técnica baseia-se na solubilização do polímero em solução ácida diluída e posterior evaporação controlada do solvente (ALTIOK; ALTIOK;

TIHMINLIOGLU, 2010; BALAU et al., 2004; COLOBATIU et al., 2019; DE MASI et al., 2019; NUNTHANID et al., 2001; QIAO et al., 2021; S. BHUVANESHWARI et al., 2011),

Porém, como dito anteriormente, filmes assimétricos porosos são mais interessantes para a utilização como curativos, pois desempenham papel fundamental no controle de exsudatos e no controle de proliferação de microrganismos patogênicos, responsáveis pelas infecções da pele. Na obtenção destes filmes pode ser utilizada a técnica de inversão de fases induzida por precipitação em contato com banho de não solvente. Neste processo, a solução de quitosana dissolvida é espalhada sobre uma placa e colocada em um banho de coagulação contendo não solvente, promovendo a precipitação do polímero.

Autores que seguem essa técnica para o preparo de filmes de quitosana (HONG; WEI; LIU, 2007; KAMIŃSKI; MODRZEJEWSKA, 2006; LOU et al., 2008; MI et al., 2001), obtiveram filmes com estrutura assimétrica, consistindo em três camadas, sendo elas, camada densa, camada de transição densa média com alguns poros e uma camada porosa. A Figura 2-5 traz um exemplo da morfologia dos filmes obtidos.

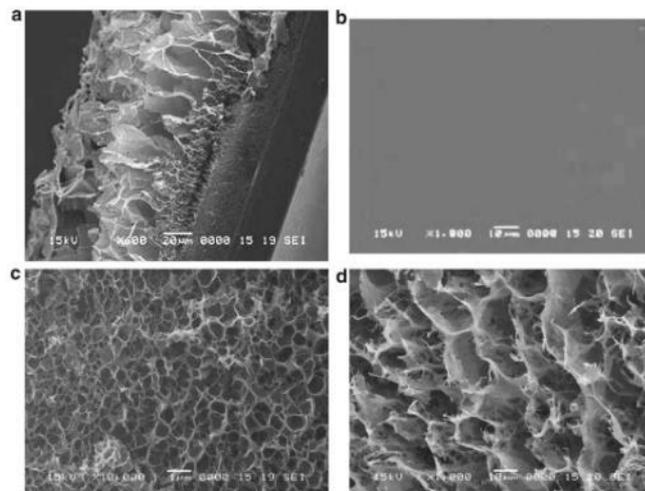


Figura 2-5 – Imagens de microscopia eletrônica de varredura de filmes de quitosana obtidos por inversão de fases induzida por não solvente. a) seção transversal; b) superfície densa; c) e d) superfície porosa. Fonte: HONG; WEI; LIU, 2007.

Soluções com diferentes concentrações de hidróxido de sódio são comumente aplicadas para o banho de precipitação de filmes de quitosana devido ao esgotamento da dissociação do ácido no meio, ao ser adicionado à solução de NaOH (TAKARA; MARCHESE; OCHOA, 2015). Sabe-se que a adição de hidróxido de sódio desloca o equilíbrio da reação de protonação da quitosana, consumindo H_3O^+ ,

ocasionando a desprotonação da quitosana e elevando o pH do meio (TAKARA; MARCHESE; OCHOA, 2015; YIP *et al.*, 2014).

A técnica de obtenção de filmes por inversão de fases é bastante complexa, com diversas variáveis que interferem na morfologia final. Como o desenvolvimento de filmes assimétricos de quitosana é o objeto de estudo deste trabalho, este assunto será melhor discutido nas próximas sessões.

2.3. Fabricação de filmes

2.3.1. Metodologias utilizadas na fabricação de filmes porosos assimétricos

Os primeiros filmes assimétricos foram desenvolvidos pelo processo de inversão de fases por precipitação por imersão no final da década de 1960 por Loeb e Sourirajan. Desde então, a produção de filmes poliméricos sintéticos tem sido amplamente investigada. A formação de um filme se mostra relativamente simples, quando partido de uma solução polimérica onde o polímero esteja totalmente dissolvido (FELTON, 2013). Existem diferentes metodologias de preparo de filmes poliméricos como sinterização de particulados, estiramento a quente, gravação e inversão de fases. Dentre essas, a técnica de inversão de fases destaca-se devido à ampla variação morfológica que pode ser alcançada com apenas pequenas alterações nos parâmetros utilizados durante o processo de inversão, sendo a mais utilizada na fabricação de membranas comerciais.

2.3.2. Técnica de Inversão de Fases

A técnica de inversão de fases é uma das metodologias mais utilizadas para preparar filmes porosos. Neste processo, a solução polimérica passa, de forma controlada, do estado líquido para o estado sólido. Baseia-se na transformação de uma solução polimérica estável em instável, que pode ser realizada pela modificação da temperatura da solução, evaporação do solvente, difusão induzida, precipitação por evaporação controlada e precipitação por imersão em não solvente. Para minimizar a energia livre da mistura, a separação de fases ocorre e um novo estado de equilíbrio é alcançado (DI LUCCIO; NOBREGA; BORGES, 2000).

Diferentes morfologias podem ser obtidas dependendo do processo de inversão de fases utilizado, sendo muito importante o controle de todas as variáveis envolvidas para se obter filmes adequados à aplicação desejada. Os filmes são definidos morfologicamente segundo duas grandes categorias: densa e porosa. Um filme pode apresentar as duas morfologias, nesse caso é classificado como anisotrópico, constituído por uma fina camada superior de morfologia mais fechada, podendo ter ou não poros, seguido de uma morfologia porosa. Quando o filme possui apenas uma morfologia na sua seção transversal é chamado de isotrópico (HABERT; BORGES; NOBREGA, 2006). A Figura 2-7 apresenta uma ilustração esquemática desses tipos estruturais de filmes.

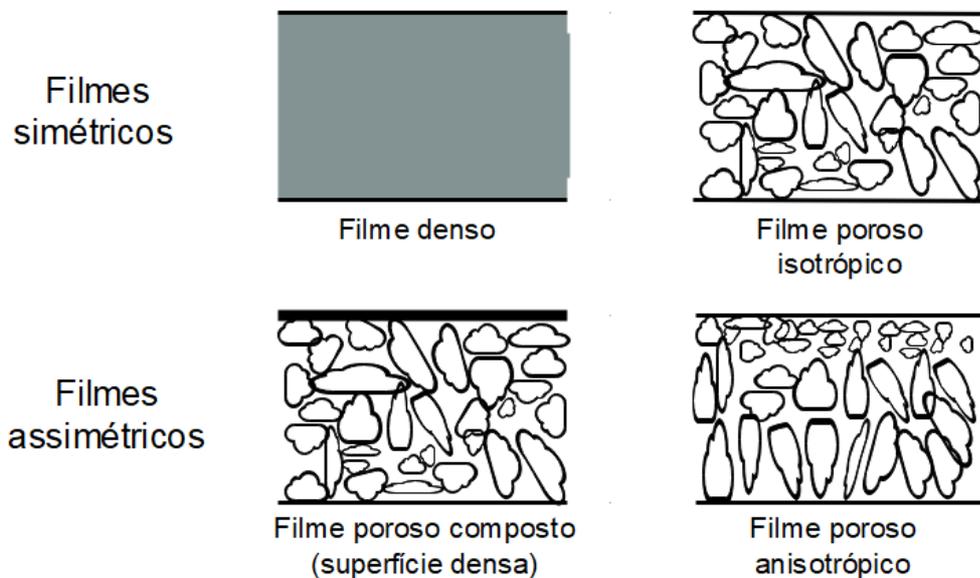


Figura 2-6 – Ilustração esquemática dos principais tipos de morfologias de filmes. Fonte: Adaptado de HABERT; BORGES; NOBREGA, 2006.

No processo de separação de fases ocorre a formação de pelo menos duas novas fases: uma rica e outra pobre em polímero. A transferência de massa entre as duas fases faz com que a nova fase dispersa cresça até que efeitos viscosos, característicos dos sistemas poliméricos, forcem esse processo a parar (DI LUCCIO; NOBREGA; BORGES, 2000). A técnica de inversão de fases consiste em dissolver um polímero com o uso de um solvente compatível e em seguida espalhar a solução formada em uma placa com o auxílio de uma faca de espalhamento com espessura previamente definida. O filme é formado pela perturbação desse sistema, que acontece com a inclusão de outro componente, que pode ser um não solvente para o

polímero ou pela mudança de temperatura do ambiente (HABERT; BORGES; NOBREGA, 2006; STRATHMANN; KOCK, 1977). A perturbação desestabiliza a solução, fazendo com que ela se separe em pelo menos duas fases (SMOLDERS *et al.*, 1992).

Durante o processo de formação do filme, interações físico-químicas podem acontecer entre as cadeias poliméricas, resultando em diferentes conformações, assim como, a gelificação ou regiões cristalinas sendo formadas, que aceleram a precipitação do polímero (REUVERS, 1987). Tais interações dependem fortemente do tipo de polímero escolhido. Nesse sentido, a necessidade de pesquisas que investiguem e prevejam de forma eficiente a morfologia e propriedades dos filmes obtidos por inversão de fases é de fundamental importância.

Diversas técnicas podem ser aplicadas na inversão de fases e esta seção tem como principal objetivo a discussão da técnica de imersão-precipitação, tendo em vista que a técnica será utilizada para a formação dos filmes assimétricos de quitosana neste trabalho. As outras técnicas de inversão de fases também serão brevemente apresentadas.

2.3.2.1. Separação de fases induzida por precipitação térmica

A separação de fases induzida por precipitação térmica é uma técnica amplamente empregada na fabricação de membranas poliméricas microporosas com características de poros controlados a partir de uma variedade de polímeros cristalinos e termoplásticos. Nesse processo, uma placa com a solução polimérica é resfriada a uma taxa pré-determinada, que define a morfologia da membrana. A redução da temperatura desestabiliza a solução, causando a separação de fases líquido-líquido e promovendo a formação do filme polimérico poroso (HABERT; BORGES; NOBREGA, 2006).

2.3.2.2. Separação de fases induzida por evaporação de solvente

A separação de fases induzida por evaporação de solvente consiste na evaporação do solvente da solução, em temperatura ambiente ou sob atmosfera controlada. Conforme o solvente é evaporado, a concentração do polímero aumenta, causando a precipitação. Esta técnica pode ser aplicada antes do espalhamento da

solução polimérica na placa, ocasionando uma maior viscosidade da solução de espalhamento. É aplicada em soluções de fácil escoamento, auxiliando o controle de espessura de filmes. A técnica também pode ser aplicada após o espalhamento da placa, utilizando do controle do tempo de evaporação para definição da morfologia resultante (HABERT; BORGES; NOBREGA, 2006).

2.3.2.3. Separação de fases induzida por difusão

Na separação de fases induzida por difusão, uma solução polimérica é colocada em contato com o vapor de um não solvente e a troca de massa por difusão leva a uma mudança na composição do sistema levando à precipitação do polímero (REN; WANG, 2011).

2.3.2.4. Separação de fases induzida por não solvente

Em meados de 1960, Loeb e Sourirajan desenvolveram os primeiros filmes utilizando a técnica hoje conhecida como inversão de fases por precipitação por imersão. Essa metodologia se mantém, até hoje, como o principal meio de obtenção de filmes poliméricos assimétricos (LOEB, 1981; REN; WANG, 2011). Os filmes produzidos por Loeb e Sourirajan apresentavam morfologia assimétrica, caracterizada por uma camada superior densa e parte inferior porosa, sendo possível empregá-los como membranas para dessalinização, uma vez que, essa morfologia facilitava a rejeição de sais, oferecendo estabilidade mecânica e um bom fluxo de água. Tais filmes foram produzidos primeiramente com o polímero acetato de celulose (HAN; NAM, 2002). Desde então, a técnica foi amplamente difundida, aumentando o interesse no aperfeiçoamento dessa metodologia e criando modificações a fim de melhorar as propriedades de transporte das espécies permeantes.

Na técnica de inversão de fases por precipitação por imersão, uma solução polimérica é espalhada em uma placa (suporte) com o auxílio de uma faca de espalhamento e posteriormente é imersa em um banho contendo um não solvente, o qual deve ser totalmente miscível com o solvente, conforme esquema representado na Figura 2-8. Após a imersão no banho de não solvente, a solução se separará em duas fases devido à difusão do solvente do filme polimérico para o banho de precipitação e à difusão do não solvente para o filme.

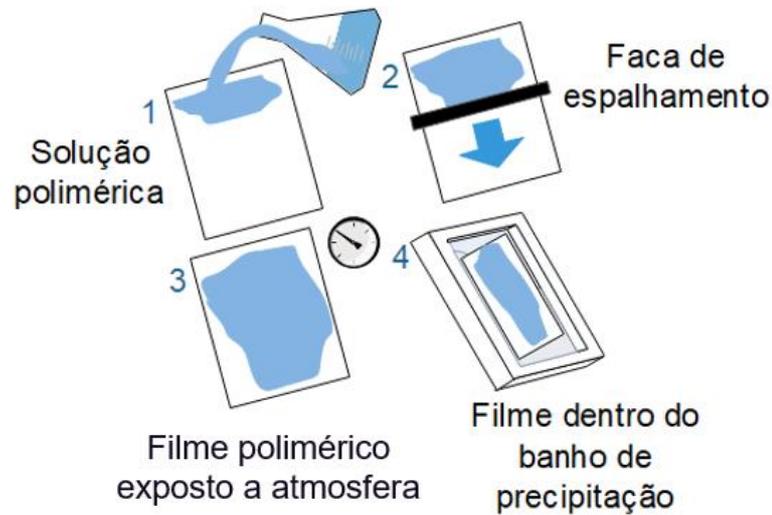


Figura 2-7 – Etapas do processo de inversão de fases por imersão-precipitação. Fonte: Adaptado de HABERT; BORGES; NOBREGA, 2006.

Essa técnica também é muito utilizada juntamente com a técnica de evaporação de solvente, podendo ser aplicada a etapa de evaporação antes ou depois do banho no não solvente (HABERT; BORGES; NOBREGA, 2006; REUVERS, 1987; SMOLDERS *et al.*, 1992). A morfologia do filme polimérico obtido por precipitação por imersão depende da escolha do polímero e sua concentração, natureza do solvente e do não solvente e da composição do banho de precipitação, além da temperatura (DI LUCCIO; NOBREGA; BORGES, 2000).

2.4. Filmes assimétricos de quitosana

Filmes de quitosana são amplamente estudados em diversas aplicações, no entanto, a grande maioria está na forma de filmes densos (ALTIOK; ALTIOK; TIHMINLIOGLU, 2010; BANO *et al.*, 2017; COLOBATIU *et al.*, 2019; LECETA *et al.*, 2013; QIAO *et al.*, 2019). Poucos trabalhos reportam a formação de filmes de quitosana pela técnica de precipitação por imersão. Dentre estes, a produção de *scaffolds* se destacam. *Scaffolds* são suportes que fornecem apoio estrutural ao crescimento de células, fornecendo sustentação mecânica e permitindo o transporte de nutrientes necessários para a regeneração óssea e/ou de tecidos.

Uma técnica constantemente utilizada para obtenção de *scaffolds* de quitosana é a precipitação por imersão seguida de secagem por liofilização. O filme ainda úmido é congelado e formam-se cristais de gelo que, após a sublimação, dão

origem aos poros. Ao final desse processo os *scaffolds* formados são neutralizados com o uso de solução de hidróxido de sódio e/ou etanol.

Essa técnica resulta em poros interconectados e seus diâmetros são diretamente afetados por seus parâmetros de produção, assim como, temperatura de congelamento, gradiente de temperatura e concentração do polímero. Por exemplo, o diâmetro dos poros pode ser diminuído combinando o condicionamento a temperaturas mais baixas e o aumento da taxa de congelamento dos *scaffolds* (HABERT; BORGES; NOBREGA, 2006).

Quando o gradiente de temperatura é unidirecional, a interconectividade dos poros diminui e isso se deve ao crescimento paralelo dos cristais de gelo. Quando são aplicados gradientes de temperatura radiais, as chances de haver uma maior interconectividade de poros é maior. Para a aplicação médica é desejável que os *scaffolds* tenham uniformidade na estrutura porosa, pois estes apresentam boa resistência mecânica e integridade estrutural (LEVENGOOD; ZHANG, 2014).

Diversos autores que aplicam essa técnica na obtenção de *scaffolds* de quitosana (CHHABRA *et al.*, 2016; JIANG *et al.*, 2021; ORYAN; SAHVIEH, 2017; SINHA *et al.*, 2013; VANDEVORD *et al.*, 2002; WANG *et al.*, 2020; YANG *et al.*, 2010), obtêm morfologias de poros interconectados em conformações lamelares, como ilustra a Figura 2-9. A estrutura lamelar se torna mais aparente conforme a diminuição da temperatura, devido a maior nucleação e o crescimento dos cristais de gelo (LI *et al.*, 2017; WANG *et al.*, 2020).

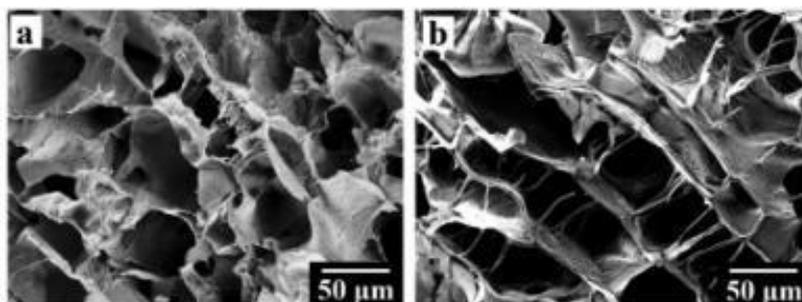


Figura 2-8 – Imagens de microscopia eletrônica de varredura de *scaffolds* de quitosana obtidos por inversão de fases induzida por não solvente e liofilização. Fonte: WANG *et al.*, 2020.

A aparência a olho nu dos *scaffolds* obtidos é comumente de cor branca e pálida e superfície altamente porosa. Porém, com o aumento da concentração do biopolímero há a formação de rachaduras na superfície dos *scaffolds*. Maiores concentrações de quitosana costumam produzir filmes com poros menores e maior

espessura da parede dos poros, aumentando a resistência mecânica (WANG et al., 2020).

Para um melhor entendimento do processo de inversão de fases, aspectos termodinâmicos e cinéticos serão abordados na próxima sessão.

2.5. Aspectos termodinâmicos e cinéticos na separação de fases

O conhecimento do equilíbrio líquido-líquido de um sistema ternário envolvendo polímero(P)/solvente(S)/não solvente(NS) é um fator importante na preparação de filmes porosos por indução da precipitação. A adição de não solventes à solução polimérica é uma alternativa para a promoção da solidificação do polímero devido à variação da composição do sistema e deslocamento do mesmo para uma região de imiscibilidade. O diagrama ternário de equilíbrio líquido-líquido auxilia na previsão e compreensão da formação de vários produtos de interesse, assim como filmes, membranas e fibras, por meio do processo de separação de fases. A base da separação de fases, processo que ocorre durante a formação de filmes e afins, é o conhecimento da termodinâmica desse equilíbrio (BULTE *et al.*, 1996).

2.5.1. Termodinâmica de soluções poliméricas

Na termodinâmica, o equilíbrio entre fases é atingido quando todas as propriedades macroscópicas do sistema, assim como, temperatura, pressão e potencial químico não se alteram com o tempo (SMITH; VAN NESS; ABBOTT, 2007). Portanto, para atingir o equilíbrio, deve-se obter um balanço de todos os fatores que podem causar algum tipo de variação no sistema (AFONSO, 2012).

O estudo do comportamento termodinâmico dos polímeros segue critérios de equilíbrio e estabilidade que podem ser definidos seguindo as limitações impostas ao sistema em questão (LUCAS; SOARES; MONTEIRO, 2001). A Equação 11 demonstra a variação da energia de Gibbs para a condição de miscibilidade da mistura.

$$\Delta G_m = \Delta H_m - T\Delta S_m \quad (11)$$

onde, ΔG_m é a energia de Gibbs de mistura, ΔH_m é a entalpia de mistura, T é a temperatura e ΔS_m representa a entropia de mistura.

A tendência de contribuições para a energia de Gibbs é negativa ($\Delta G_m \leq 0$) quando há a solubilização espontânea de um elemento em outro, considerando processos com temperatura e pressão constantes (LUCAS; SOARES; MONTEIRO, 2001; SANCHEZ; LACOMBE, 1978). No caso da solubilização espontânea, adota-se a determinação da diferença entre as funções termodinâmicas da solução e as mesmas funções dos componentes puros, antes da dissolução. Portanto, a energia de Gibbs é determinada pela diferença entre a energia de Gibbs da mistura e o somatório das energias de Gibbs dos seus componentes puros (LUCAS; SOARES; MONTEIRO, 2001).

2.5.2. Diagrama de fases para sistemas ternários

O estudo do sistema ternário contendo quitosana, ácido acético e hidróxido de sódio é de grande interesse, uma vez que suas aplicações em diferentes áreas como a médica, biológica, agrícola e estética, dependem diretamente do modo como o polímero se comportará nesse sistema e das características desejadas dos produtos formados (KOU; PETERS; MUCALO, 2021). O comportamento de cada produto pode ser definido pela termodinâmica deste sistema, uma vez que, sabe-se que a separação de fases apenas acontece em determinadas condições específicas (DANNER; HIGH, 1993).

Como já comentado anteriormente, os desenvolvimentos de filmes assimétricos de quitosana são de grande importância na área médica e podem ser desenvolvidos a partir da técnica de inversão de fases por precipitação em banho de não solvente. A técnica de inversão de fases consiste em separar uma solução polímero/solvente que estava em uma fase homogênea, em duas fases, uma rica e uma pobre em polímero (GHASEMI; ASGARPOUR KHANSARY; AROON, 2017; KARIMI *et al.*, 2005). A separação de fases acontece através de uma perturbação do sistema que ocorre devido a mudanças nas suas propriedades termodinâmicas e concentrações, as quais podem ocorrer por transferência de massa e/ou calor (DANNER; HIGH, 1993).

O fenômeno de separação de fases de um sistema binário, polímero/solvente, induzido por temperatura pode ser entendido a partir da representação do diagrama

esquemático da energia de Gibbs da mistura em função de temperaturas variadas, Figura 2-9. A partir do diagrama, observa-se que a temperatura do sistema é responsável pela determinação das concentrações poliméricas em diferentes regiões. A curva binodal é obtida no início da separação de fases, onde a energia de Gibbs de mistura (ΔG_m) é mínima e é calculada pela projeção das composições das fases rica e pobre em polímero. A curva espinodal está diretamente ligada à estabilidade instantânea da solução e está localizada no limite entre a região instável e a curva binodal (região metaestável). O ponto de encontro entre as curvas binodal e espinodal é denominado ponto crítico (KURADA; DE, 2017).

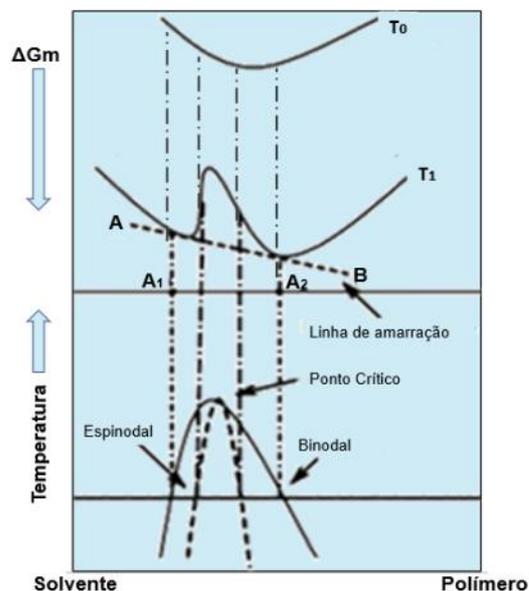


Figura 2-9 – Representação esquemática do diagrama de energia de Gibbs com a temperatura e composição. Fonte: Adaptado de BULTE et al., 1996.

Os pontos A e B apresentados na Figura 2-9 exemplificam as regiões de composição em que o sistema se apresenta em apenas uma fase. A linha de amarração que liga os pontos A1 e A2 representa a composição de duas fases em equilíbrio. Nas inflexões da curva de ΔG_m versus concentração localizam-se os pontos espinodais (DUARTE, 2013; MULDER, 1997-). Com o aumento da temperatura, a região de separação de fases decresce até atingir o ponto crítico e então a separação de fases cessa em toda a faixa de composição (SADEGHI *et al.*, 2018). A diminuição da temperatura (T_0 para T_1) induz a separação de fases na qual se baseia a técnica de separação de fases induzida termicamente (*Thermally Induced Phase Separation*, TIPS). Como resultado dessa técnica, uma estrutura microporosa de membrana é obtida sem a necessidade de uso de não solvente. Os poros advêm da separação de

fases induzida pelo resfriamento de uma mistura entre o polímero e o solvente (POCHIVALOV *et al.*, 2021).

O processo de inversão de fases por precipitação em um banho de não solvente pode ser compreendido com o auxílio de um diagrama de fases ternário, conforme apresentado na Figura 2-10. Neste diagrama, a curva binodal divide o triângulo em duas regiões: uma região monofásica, na qual todos os componentes são miscíveis, e uma região bifásica, na qual o sistema se separa em uma fase rica no polímero e uma fase rica no solvente (DUARTE, 2013).

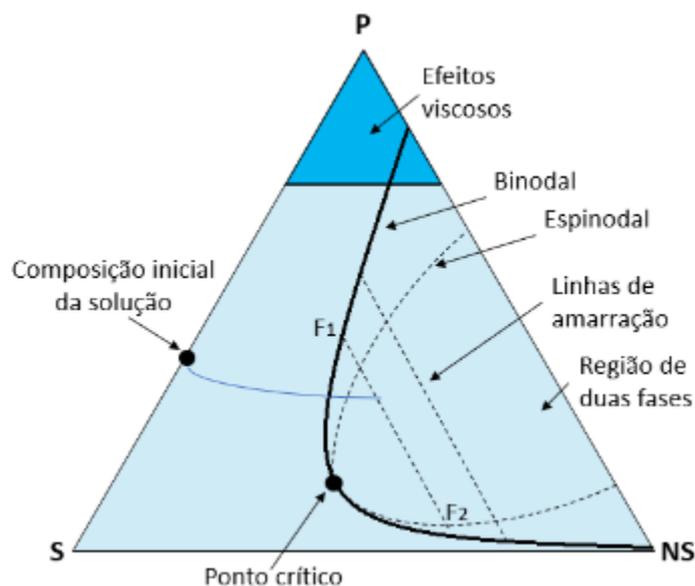


Figura 2-10 – Representação do que ocorre no sistema ternário durante a inversão de fases em um sistema polímero, solvente e não solvente. Fonte: Adaptado de MULDER, 1997.

Como já mencionado, a solução polímero/solvente quando entra em contato com um banho de não solvente muda a sua composição, devido à troca do solvente pelo não solvente. A Figura 2-10 representa as duas fases em equilíbrio: uma fase rica em polímero (F1), que é responsável pela formação da matriz do filme, e outra pobre em polímero (F2), responsável pela construção dos poros. Impulsionadas pela separação de fases, essas fases então, passam a ter a sua composição ligada por uma linha de amarração (BRAGA, 2011; DUARTE, 2013). O ponto crítico caracteriza-se pelo ponto onde a curva binodal e espinodal se encontram e neste ponto as composições das fases rica e pobre em polímero são iguais. O comportamento de equilíbrio metaestável ocorre na região entre a curva binodal e espinodal. Cada sistema ternário tem uma localização distinta para sua curva binodal, dependendo

diretamente das características físico-químicas dos componentes envolvidos e da interação entre as espécies.

A composição da curva binodal pode ser obtida matematicamente por meio do uso de modelos termodinâmicos. Dentre os mais utilizados, pode destacar o modelo de Flory-Huggins (DANNER; HIGH, 1993). Modelos termodinâmicos podem auxiliar na obtenção de informações acerca da estrutura do filme a ser formado pelo processo de inversão de fases, porém a sua maioria requer o conhecimento de parâmetros binários de interação entre as espécies envolvidas. No entanto, pode-se obter experimentalmente uma aproximação muito confiável da curva binodal por meio da construção da curva de ponto de nuvem (DANNER; HIGH, 1993; DUARTE, 2013; MULDER, 1997).

2.5.3. Curva de ponto de nuvem

O método mais utilizado para determinar o equilíbrio líquido-líquido de uma solução polimérica é a construção da curva do ponto de nuvem, que é a curva binodal experimental. Ela representa a composição onde a solução não é termodinamicamente estável na forma homogênea e ocorre a separação de duas fases líquidas.

A formação do filme é rastreada desde a solução inicial homogênea até a estrutura sólida final através do caminho da composição. O ponto de precipitação é o ponto em que a precipitação do polímero inicia. Na medida em que a precipitação continua, a viscosidade do polímero aumenta até se tornar suficientemente alta e ser considerada um sólido. Assim, o caminho formado entre a composição inicial da solução polimérica e a posição da linha binodal têm um efeito na morfologia do filme (MAZINANI *et al.*, 2017). O ponto de nuvem é constantemente utilizado para determinar o limite da separação de fases em um sistema polimérico (CADORE, 2019; XU; QIU, 2014). As duas formas mais usuais para a determinação do ponto de nuvem são através da variação da composição do sistema ou pela variação da temperatura da mistura. O método de titulação consiste em um processo onde uma solução homogênea, formada por solvente e polímero, é perturbada pela adição de um não solvente em temperatura e agitação constantes, até que se identifique o começo da turbidez da solução e a consequente separação de duas fases líquidas (BAKERI *et al.*, 2014). No outro método de determinação do ponto de nuvem, a mesma aparência

turva da solução é esperada, porém através do lento resfriamento da solução com concentrações pré-definidas de polímero e solvente, (KONINGSVELD; STAVERMAN, 1968; MANNELLA; LA CARRUBBA; BRUCATO, 2013). Logo, no primeiro método, a curva de ponto de nuvem é construída com as composições finais dos componentes da solução, e no segundo, apresenta-se o gráfico da temperatura *versus* composição. A detecção do ponto de nuvem pode ser feita visualmente se a viscosidade da solução for baixa, ou utilizando uma abordagem de detecção de transmissão de luz, onde pode ser detectada com a diminuição repentina do feixe de luz transmitido. A medição do ponto de nuvem via titulação pode ajudar a estabelecer a melhor concentração e a melhor razão solvente/não solvente, sendo possível prever as características resultantes de filmes e membranas (POLETTO *et al.*, 2010).

Uma curva de ponto de nuvem hipotética experimental de um diagrama ternário é mostrada na Figura 2-11. A obtenção da curva nesse sistema se dá pela titulação de pequenas quantidades de não solvente a soluções contendo polímero e solvente em concentrações pré-determinadas. Na Figura 2-11, as concentrações iniciais das misturas polímero/solvente estão representadas pelos pontos 1, 2 e 3. Assim, a titulação do não solvente na solução homogênea ocasiona a separação de fases. Dessa forma, os pontos de nuvem consistem na composição mássica de polímero/solvente/não solvente no equilíbrio, determinada como o ponto de turvação persistente, sendo estes pontos utilizados para construir a curva de ponto de nuvem.

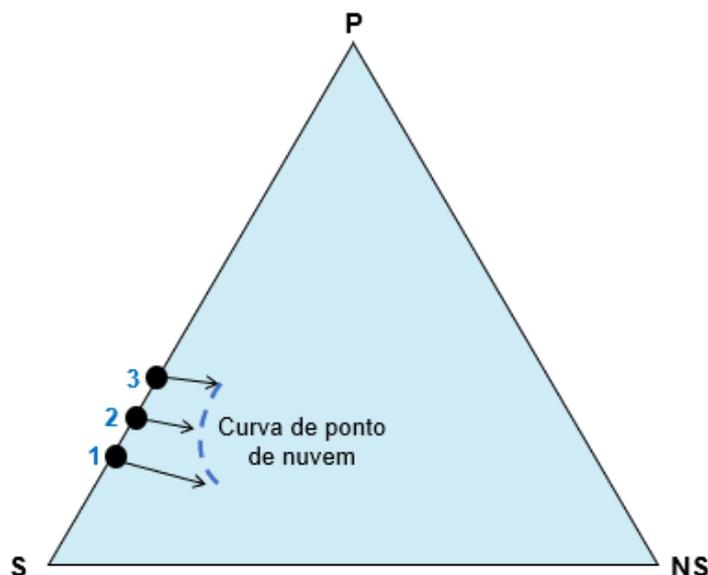


Figura 2-11 – Representação ilustrativa do diagrama ternário com a localização da curva de ponto de nuvem, obtida experimentalmente. Fonte: Adaptado de BULTE *et al.*, 1996.

O espaço existente entre a curva de ponto de nuvem e o eixo polímero/solvente é denominado de lacuna de miscibilidade (CADORE, 2019). Quanto menor for esse espaço, maior é a incompatibilidade entre o polímero e o não solvente, o que causa a instabilidade na solução polimérica (CADORE, 2019; HILLERT, 2007; TAN; PAN; PAN, 2008)(MANNELLA; LA CARRUBBA; BRUCATO, 2013).

Quando ocorre a separação em duas fases líquidas, na curva de ponto de nuvem, inicia-se a formação do filme, a composição da fase rica em polímero continua a aumentar até atingir a região de efeitos viscosos. Este processo é controlado pela cinética de difusão e pelas propriedades termodinâmicas do sistema (BOOM *et al.*, 1993; DI LUCCIO; NOBREGA; BORGES, 2000). Após a imersão da solução polimérica em um não solvente ou banho de coagulação, o não solvente se difundirá na solução de polímero, enquanto o solvente se difundirá no banho. O coeficiente de difusão do polímero é muito menor e, portanto, a mobilidade dessas moléculas poliméricas ficará reduzida (WIENK *et al.*, 1996).

2.5.4. Aspectos cinéticos na separação de fases

Segundo REUVERS, VAN DEN BERG, SMOLDERS (1987) os sistemas de formação de filmes dividem-se em duas classes: processos de separação instantânea e processos que apresentam atraso na separação. O primeiro caso ocorre quando quase imediatamente após a imersão o caminho da composição cruza a curva binodal. Já no segundo caso, a curva binodal só será cruzada após um determinado tempo.

A formação de filmes que ocorre pela separação de fases instantânea geralmente apresenta macro vazios em sua subestrutura e uma camada de pele fina (com poros menores). Para os filmes formados com separação com atraso, a subestrutura se apresenta menos porosa, sem a presença de macro vazios e com uma camada de pele mais espessa e densa (WIENK *et al.*, 1996). A classe que o sistema de polímero/solvente/não solvente irá seguir dependerá principalmente da interação entre o solvente e o não solvente e pela concentração de não solvente no banho. A formação de macro vazios é muitas vezes vista em filmes obtidos através da separação de fases induzida por difusão. Alguns autores atribuem a formação de macro vazios ao gradiente de tensão superficial (MATZ, 1972) e às tensões mecânicas (STRATHMANN *et al.*, 1975). BROENS *et al.* (1980) defendem que a formação de macro vazios ocorre devido a um crescimento anormal de núcleos, já que o não

solvente tem um contrafluxo baixo, permitindo que os macro vazios cresçam acompanhando a separação de fases induzida por ele. Em 1992, SMOLDERS relacionou esse mecanismo ao modelo de transferência de massa de REUVERS. Essa teoria se aportou no fato de que sob a camada superior, poderiam ser formados núcleos com alta concentração de solvente, o que induziria o atraso na separação de fases. Assim, durante o crescimento do núcleo a solução de polímero se manteria estável ao redor do mesmo. Ao mesmo tempo, nenhum novo núcleo mais profundo se formaria e o núcleo poderia crescer em forma de macro vazio. Esse modelo apresenta algumas restrições, porém se adequa para explicar os efeitos das variáveis do processo de forma qualitativa, assim como, concentração da solução, temperatura e interação entre os componentes. Desde então, vários outros mecanismos já foram propostos (GUILLEN *et al.*, 2013; KOSMA; BELTSIOS, 2012; PRAKASH; FRANCIS; SCRIVEN, 2008; REN; LI; WONG, 2004; TREE *et al.*, 2018; WANG; LAI, 2012) para descrever a formação de macro vazios, porém alguns estudos se mostraram inconsistentes, trazendo a possibilidade de que vários mecanismos ocorram simultaneamente (PENG; CHUNG; WANG, 2021) sendo necessários maiores estudos para elucidar e unificar as teorias em torno da formação de macro vazios em filmes poliméricos.

O aumento da concentração de não solvente no banho pode aproximar a composição inicial da solução polimérica do ponto de precipitação. Em outras palavras, a concentração do não solvente pode alterar o comportamento de separação de fases durante o processo de formação do filme. Dependendo das taxas de transferência de massa entre o solvente e o não solvente, a solução de polímero atingirá a região de duas fases ou entrará na região de efeito viscoso. Os perfis de concentração criados durante os processos de difusão podem induzir um perfil no tamanho dos poros: próximo a superfície do filme os poros serão muito pequenos ou inexistentes e em regiões do filme mais submersas, os poros formados serão normalmente maiores (BOOM *et al.*, 1993). Quando não solvente é adicionado à solução polimérica, a solidificação do polímero pode ocorrer rapidamente na superfície do filme e, como resultado, uma camada de pele mais fina e uma estrutura mais uniforme podem ser formadas (HABERT; BORGES; NOBREGA, 2006). Ainda, as propriedades do solvente afetam a morfologia e o desempenho do filme polimérico. Por exemplo, a adição de um solvente volátil em uma solução polimérica, juntamente com um não solvente, pode alterar o comportamento de separação líquido-líquido (L-

L) e, como resultado, pode causar uma mudança na morfologia e no desempenho do filme.

Além disso, a adição de um co-solvente à solução polimérica pode eliminar a formação de macro vazios durante a separação instantânea, alterando a morfologia dos filmes de uma estrutura semelhante a dedos (*fingerlike*) para uma do tipo esponja (*spongelike*), conforme Figura 2-12 (AROON *et al.*, 2010).

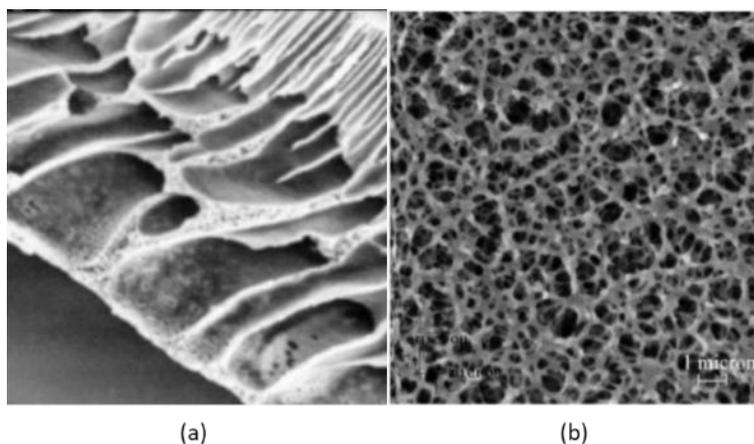


Figura 2-12 – Imagem de MEV na seção transversal de filmes de poliétersulfona. (a) morfologia tipo dedos; (b) morfologia tipo esponja. Fonte: HABERT; BORGES; NOBREGA, 2006.

Algumas modificações podem ser aplicadas à técnica de precipitação por imersão, assim como, a temperatura do banho de precipitação e a adição de não solvente na solução homogênea de polímero e solvente (REUVERS, 1987).

As modificações visam mudar e controlar características importantes do filme, como por exemplo, a porosidade e a espessura da camada de topo e a porosidade da camada do suporte. Diversos autores acreditam que a característica assimétrica dos filmes obtidos por precipitação por imersão ocorre no início da separação da fase rica e pobre em polímero, que apresenta uma distribuição assimétrica de polímero no filme imerso em solução (REUVERS, 1987; SZLEIFER, 1996). Porém, isso não é uma verdade absoluta na literatura. No momento, três teorias se dispõem a explicar a distribuição do polímero no início dessa separação, são elas:

- I. Autores sugerem que os efeitos da tensão superficial promovem o aumento da concentração do polímero na superfície, trazendo uma distribuição assimétrica do polímero para a solução dissolvida, (LI; XU; YANG, 2008; YABUNO *et al.*, 2020). Outros autores refutam essa tese (REUVERS, 1987) devido à teoria de

que após a imersão no banho, o polímero se adaptaria ao novo ambiente termodinâmico.

- II. A duração da etapa de evaporação do solvente na superfície do filme pode causar uma distribuição assimétrica do polímero, assim como influenciar as propriedades finais da membrana, conforme abordado por KIM et al. (2005), BINDAL, HANRA, MISRA (1996) e STRATHMANN, SCHEIBLE, BAKER (1971).
- III. O processo de difusão ternária a que o filme imerso em solução está sujeito, causaria uma maior concentração de polímero na camada superior do filme. Isto se deve ao fato de que há um esgotamento de solvente na camada superior do filme quando a difusão se inicia no contato com o banho, evitando que haja uma grande penetração de solvente na camada. A camada superior fica altamente concentrada na superfície do filme se opondo às moléculas de solvente mais fortemente do que as moléculas de não solvente, conforme STROPNIK, KAISER, (2002), REUVERS (1987) e RADOVANOVIC, THIEL, HWANG (1992^a e 1992b).

A teoria mencionada no item III é amplamente difundida atualmente na literatura, pois se trata de uma etapa inevitável para o processo.

Teorias também são aplicadas ao processo de separação da mistura após a imersão. Depois da imersão da solução no banho de não solvente ocorre uma troca de solvente e não solvente na solução polimérica, onde ΔG_m diminui e a solução se divide em duas, ou mais fases com diferentes composições. Quando as fases são líquidas, o processo é chamado de separação de fases líquido-líquido (REN; WANG, 2011).

Nesse contexto, esse trabalho tem por objetivo investigar os aspectos termodinâmicos na separação de fases por meio da construção de diagramas ternários de ponto de nuvem e produzir filmes com estrutura assimétrica com bom desempenho para a aplicação em curativos e outros materiais biomédicos.

3. METODOLOGIA

Neste capítulo estão descritos os materiais utilizados e as metodologias aplicadas para a preparação e caracterização da quitosana e de seus filmes assimétricos.

3.1. Materiais

A quitosana utilizada foi fornecida pela Sigma-Aldrich, advinda de cascas de caranguejo, com grau de desacetilação acima de 77 % e massa molar na faixa de 190 kDa a 310 kDa. Ácido acético glacial, fornecido pela Sigma-Aldrich, e ácido clorídrico 37 % P.A., fornecido pela Vetec, foram utilizados para solubilizar a quitosana. Hidróxido de sódio 99 %, fornecido pela NEON, foi utilizado para a precipitação da quitosana. A água utilizada no preparo de soluções e nas análises químicas foi obtida a partir de um destilador de água modelo 2008 da marca GLF.

3.2. Fluxograma experimental

A seguir, na Figura 3-1, é apresentado um fluxograma que resume a sequência dos procedimentos experimentais utilizados neste trabalho. Cada etapa será detalhada nas seções a seguir.

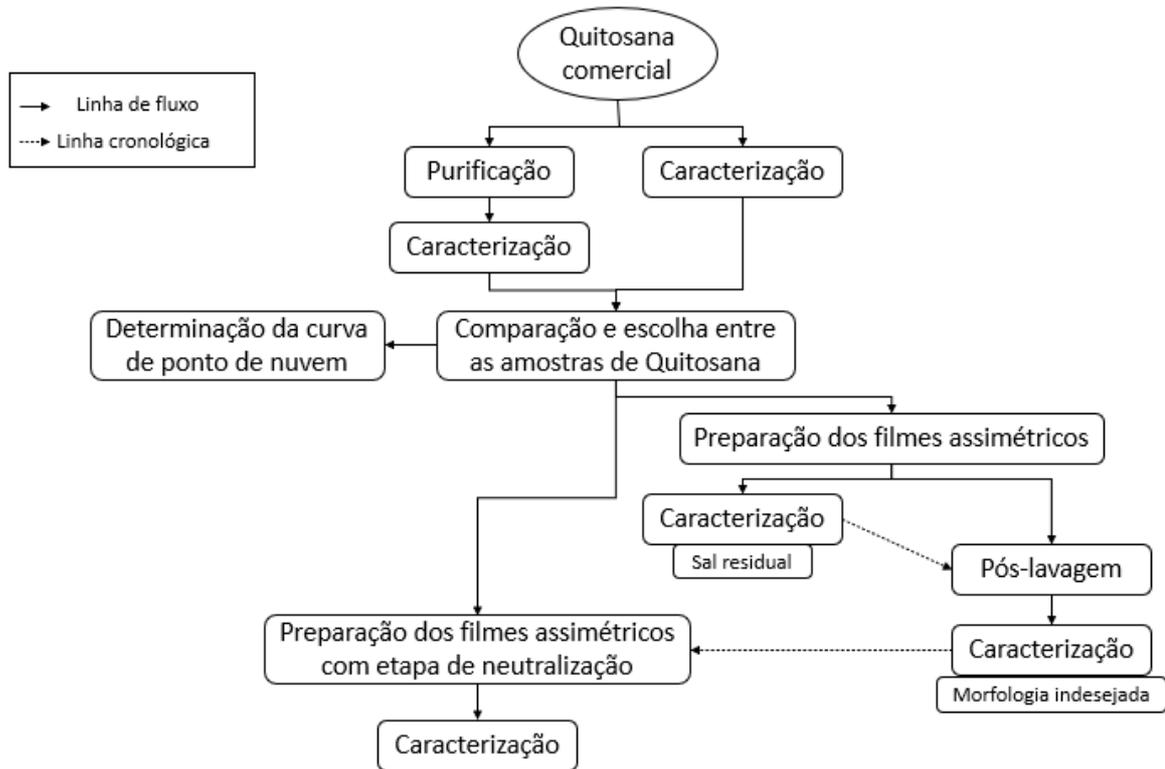


Figura 3-1 – Fluxograma experimental.

3.3. Caracterização da quitosana

3.3.1. Purificação da quitosana

A quitosana pode apresentar algumas possíveis impurezas, incluindo particularmente proteínas e/ou impurezas metálicas, devido ao seu material precursor ser de origem natural. Logo, nesse trabalho, processos de purificação da quitosana com distintas etapas de secagem do material foram investigados. Foram avaliadas a remoção de água por liofilização a $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$, conforme metodologia adaptada de NASTI *et al.*, 2009 e por aquecimento da amostra a $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ conforme PARDO-CASTAÑO; BOLAÑOS, 2019.

Na purificação, 5 g da quitosana comercial foram dissolvidas em 500 ml de uma solução de ácido acético (2 %, v/v) em água destilada. A solução foi agitada durante 24 horas e filtrada através de filtros com diâmetro de poros de $20\text{ }\mu\text{m}$ para a remoção de impurezas ácidas insolúveis. A mistura foi, então, centrifugada por 30 min a 4.000 rpm para a remoção de proteínas. Posteriormente, o pH da solução foi ajustado para 9,0 com solução de hidróxido de sódio 1 M, a fim de precipitar a quitosana da solução e remover quaisquer impurezas solúveis na solução. A

quitosana precipitada foi recuperada por centrifugação, lavada com água destilada e filtrada a vácuo (com filtro com diâmetro de poros de 14 μm) até que o pH da água de lavagem atingisse o valor de 7. As amostras de quitosana purificada e neutralizada foram liofilizadas (- 50 °C) por 24 horas ou aquecidas em estufa (50 °C) por 24 horas para posterior armazenamento em dessecador evacuado. As amostras de quitosana foram identificadas seguindo a Tabela 3-1.

Tabela 3-1 – Identificação das amostras de quitosana comercial e purificada.

Amostra	Sigla
Quitosana comercial	QtC
Quitosana purificada com liofilização	QtL
Quitosana purificada com temperatura em estufa	QtE

Para a avaliação da eficácia da purificação e a caracterização da composição química da quitosana foi utilizada a análise de espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR).

3.3.2. Caracterização estrutural da quitosana por FTIR

A investigação da estrutura química das amostras desse trabalho foi realizada em um equipamento Frontier™ MIR da marca PerkinElmer (Connecticut, Estados Unidos), no modo reflexão atenuada (UATR) utilizando 64 varreduras por amostra e resolução de 4 cm^{-1} , na faixa de 4000 a 400 cm^{-1} .

3.3.3. Grau de desacetilação (GD)

Para a determinação do GD foram aplicadas as técnicas de FTIR e titulação condutivimétrica.

Na determinação do GD pela análise de FTIR utilizaram-se os procedimentos descritos na Seção 2.2.2. Para obter as respectivas áreas e linha de base dos espectros da amostra de quitosana em pó foi utilizado o software OriginLab8. A Figura 3-1 apresenta a linha de base (linha pontilhada) do espectro FTIR, obtida conforme DOMSZY, ROBERTS (1985).

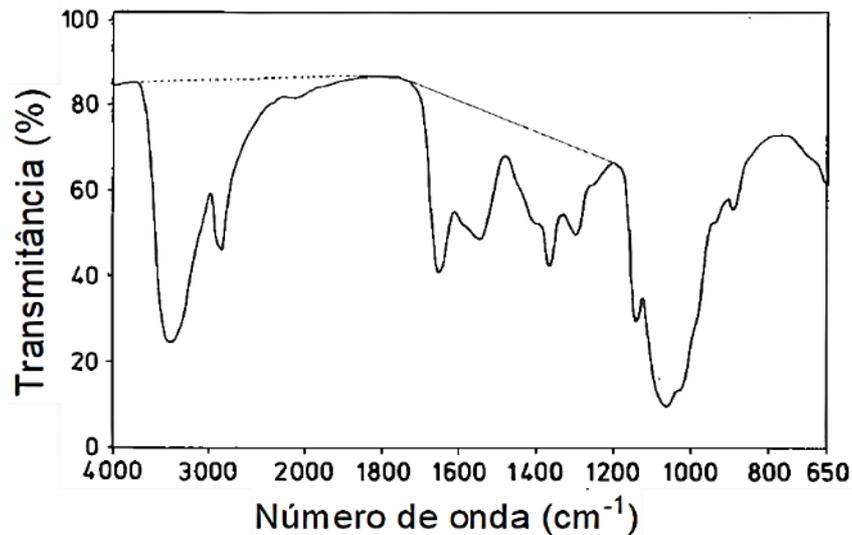


Figura 3-2 – Ilustração da obtenção de linha de base em um espectro de FTIR da quitosana.
Fonte: DOMSZY; ROBERTS, 1985.

Na determinação do grau de desacetilação da quitosana por titulação condutivimétrica, a metodologia empregada foi adaptada de DE ALVARENGA; PEREIRA DE OLIVEIRA; ROBERTO BELLATO, 2010. Para essa análise, 0,250 g de quitosana purificada foi dissolvida em 50 ml de ácido clorídrico (0,05 M). Esta solução foi mantida sob agitação constante durante 24 horas e dividida em 3 alíquotas. Cada alíquota foi titulada com uma solução de NaOH (0,1 M) na temperatura de $25,0 \pm 1$ °C. As variações de condutividade ($\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$) foram medidas em condutímetro da marca Digimed, modelo DM-32, Brasil. Os dados coletados foram utilizados para a construção das curvas de titulação de condutividade *versus* o volume gasto de titulante.

O cálculo do grau de desacetilação (GD) foi obtido a partir da Equação 12, onde: 161 é o valor correspondente à massa molar de um monômero de quitosana ($\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$); V_1 (ml) o volume de titulante necessário para a neutralização do ácido clorídrico; V_2 (ml) o volume de titulante gasto para neutralizar o NH_3^+ presente no polímero; $[\text{NaOH}]$ é a molaridade da solução de titulante e m é a massa em gramas de quitosana.

$$\%GD = \frac{[\text{NaOH}] \cdot (V_2 - V_1) \cdot 161}{m} * 100 \quad (12)$$

3.3.4. Grau de cristalinidade (Cr %)

A cristalinidade foi avaliada por análise de difração de Raios X (DRX). Os padrões de DRX da amostra de quitosana foram adquiridos em um difratômetro Siemens (Bruker) D-5000, com os parâmetros operacionais em 40 kV e 40 mA. As medições de varredura foram realizadas aplicando a radiação de 1,548 Å com espalhamento de luz variando o ângulo de $5^\circ < 2\theta < 50^\circ$ e taxa de varredura de 5° min^{-1} . O índice de cristalinidade foi estimado empregando-se o método de subtração amorfa em padrões de DRX, conforme descrito pela Equação 13.

$$Cr\% = \frac{A_{total} - A_{am}}{A_{total}} * 100 \quad (13)$$

Onde, A_{am} é a área de dispersão amorfa obtida ajustando-se uma linha de base, que foi subtraída da área total do padrão de difração, A_{total} . Este procedimento foi realizado utilizando o software OriginLab8.

3.3.5. Análise da estabilidade térmica

As análises térmicas foram conduzidas em um módulo calorimétrico DSC 6000 da marca PerkinElmer (Connecticut, Estados Unidos) com razão de aquecimento de $10^\circ \text{C min}^{-1}$ em atmosfera de N_2 na faixa de 25 a 600°C . As temperaturas dos picos característicos da quitosana foram definidas com o auxílio do software TA Universal Analysis.

3.4. Ponto de nuvem

Os valores de ponto de nuvem do sistema quitosana/solvente/não solvente foram medidos em uma célula de vidro encamisada. A temperatura da célula foi controlada com um banho termostático com precisão de $0,1^\circ \text{C}$, da marca SolidSteel. Diferentes composições homogêneas e transparentes de QtL (0,25; 0,5; 1; 2; 3; 4 e 5 %, m/m) em solução de ácido acético (2% v/v) foram preparadas com agitação e temperatura (25°C) constantes durante 24 horas. Em seguida, alíquotas das soluções foram aquecidas na célula termostática a duas temperaturas diferentes (30°C e 50°C) para determinação do ponto de nuvem. Assim que a mistura atingiu a temperatura desejada foi medido o pH da solução (pHmetro da marca Kasvi, com precisão de $\pm 0,01$ pH) e iniciou-se a titulação com solução de hidróxido de sódio (2

% m/m) utilizando uma micropipeta de 10 μ m de volume. O ponto de nuvem foi determinado observando a transição da mistura homogênea para uma mistura heterogênea através da mudança de turbidez. Neste ponto o pH foi novamente medido. Este procedimento foi realizado em triplicata para cada concentração de quitosana.

3.5. Preparação dos filmes assimétricos

Os filmes assimétricos de quitosana foram preparados pela técnica de inversão de fases por precipitação por imersão. Para a formação dos filmes de quitosana foram utilizadas três concentrações diferentes de soluções de QtL (3, 4 e 5 % m/m) em solução de ácido acético (2 % v/v), sob agitação magnética e temperatura constante (25 °C) por 24 horas. Esta solução foi vertida em uma placa de vidro e espalhada com o uso de uma faca de espalhamento com espessura controlada (0,3 μ m). A seguir, as placas foram imersas em banho de não solvente composto por solução aquosa de NaOH (2 % m/m), por 24 horas. Para a completa secagem dos filmes, estes foram submetidos ao processo de liofilização em um liofilizador LS6000 da marca Terroni a -50 °C durante 24 horas. O processo de liofilização leva à formação de filmes porosos, uma vez que a umidade congelada sublima durante a secagem.

Após a secagem, os filmes foram retirados das placas e armazenados em dessecador a vácuo. A Figura 3-2 apresenta um fluxograma das etapas envolvidas no processo de preparo dos filmes assimétricos de quitosana.

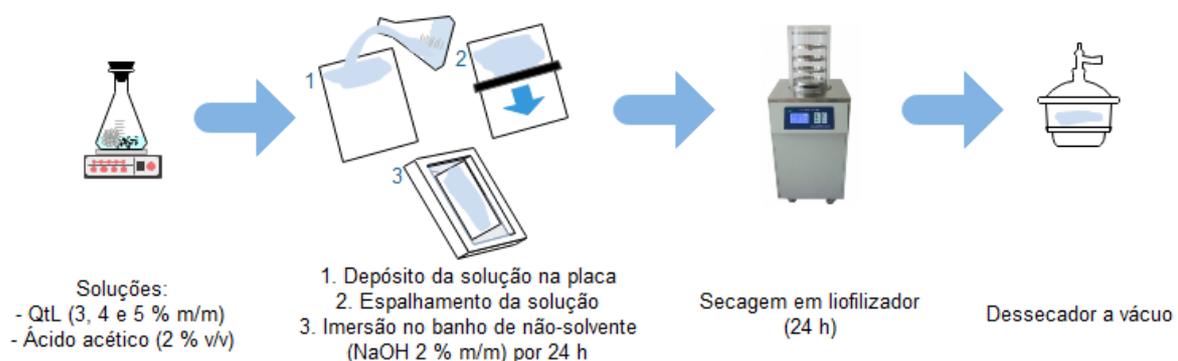


Figura 3-3 – Fluxograma simplificado das etapas envolvidas nos processos de fabricação dos filmes assimétricos de quitosana.

Os filmes assimétricos foram identificados conforme descrito na Tabela 3-2.

Tabela 3-2 – Identificação dos filmes assimétricos de quitosana.

Filme	Sigla
Filme de quitosana (3 % m/m)	Qt3
Filme de quitosana (4 % m/m)	Qt4
Filme de quitosana (5 % m/m)	Qt5

Também, foram utilizadas outras duas metodologias no preparo dos filmes de quitosana, como descrito a seguir.

3.5.1. Pós lavagem dos filmes assimétricos

Os filmes assimétricos após serem secos no liofilizador apresentaram resíduos do sal de quitosana na superfície. Estes filmes foram lavados com o auxílio de uma pisseta com água destilada e mergulhados em um banho de neutralização, também com água destilada, durante 2 horas. A seguir, a água do banho foi descartada e os filmes foram lavados novamente com o uso da pisseta. Os filmes lavados foram colocados em um suporte de silicone e submetidos à secagem durante 1 hora em estufa de convecção forçada a 30 °C. Após a secagem, os filmes foram retirados das placas e armazenados em dessecador a vácuo. Os filmes pós-lavados foram identificados conforme descrito na Tabela 3-3.

Tabela 3-3 – Identificação dos filmes pós-lavados de quitosana.

Filme	Sigla
Filme de quitosana (3 % m/m)	Qt3-lav
Filme de quitosana (4 % m/m)	Qt4-lav
Filme de quitosana (5 % m/m)	Qt5-lav

3.5.2. Preparação de filmes assimétricos com etapa de neutralização

Filmes assimétricos em duas concentrações de quitosana (5 e 6 %, m/m) em solução de ácido acético (2 %, v/v) foram preparados pela técnica de precipitação por imersão, conforme descrito anteriormente. Após a retirada do banho de não solvente,

o filme composto por 5 % m/m de quitosana foi lavado com auxílio de pisseta com água destilada e o filme a 6 % m/m de quitosana foi imerso em banho de água destilada durante 8 horas. Após, para completa secagem dos filmes, eles foram submetidos ao processo de liofilização, retirados das placas e armazenados em dessecador a vácuo. Os filmes neutralizados foram identificados seguindo a Tabela 3-4.

Tabela 3-4 – Identificação dos filmes neutralizados de quitosana.

Filme	Sigla
Filme de quitosana (5 % m/m)	Qt5-N
Filme de quitosana (6 % m/m)	Qt6-N

3.6. Caracterização dos filmes de quitosana

3.6.1. Análise da composição química

A composição química dos filmes preparados, assim como a interação da quitosana com o ácido acético, foram avaliadas por espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier. Os espectros de absorção na região do infravermelho foram obtidos pelo módulo de reflexão total atenuada (UATR) em um espectrômetro Perkin Elmer Frontier na faixa de número de onda entre 4000 e 400 cm^{-1} , com 64 varreduras por espectro e resolução de 4 cm^{-1} .

3.6.2. Grau de cristalinidade (Cr %)

A cristalinidade dos filmes foi avaliada por análise de difração de Raios X seguindo os parâmetros apresentados na Seção 3.2.4. A realização destas análises teve como objetivo avaliar possíveis alterações na cristalinidade dos filmes após a dissolução em meio levemente ácido e imersão em solução de hidróxido de sódio.

3.6.3. Análise da estabilidade térmica

A estabilidade térmica dos filmes de quitosana foi avaliada por análises de TGA, conforme o procedimento descrito na Seção 3.2.5.

3.6.4. Morfologia

A morfologia da seção transversal e da superfície dos filmes de quitosana foi analisada por microscopia eletrônica de Varredura (MEV). Para a avaliação da seção transversal, os filmes foram fraturados em nitrogênio líquido e os seus fragmentos foram depositados em *stubs* com uma fita de carbono e submetidos à metalização com ouro. A análise de MEV foi realizada em microscópio eletrônico de varredura Phenom World PRO X (Phenom World - Holanda) com tensão de trabalho de 15 kV, localizado no Centro de Microscopia e Microanálise (CMM) da UFRGS.

3.6.5. Propriedades mecânicas

As propriedades mecânicas dos filmes, previamente cortados em retângulos de 70 mm x 25 mm, foram avaliadas em um texturômetro (TA.TX Plus - Stable Micro Systems). Nesse equipamento, a força de tração e a elongação de ruptura foram medidas de acordo com o método padrão ASTM D882, com célula de carga de 50 N, velocidade de operação 0,8 mm/s e distância inicial entre as garras de 50 mm.

3.6.6. Grau de inchamento

O grau de inchamento dos filmes foi determinado a partir do seguinte procedimento: os filmes foram recortados nas medidas de 2 cm x 2 cm e pesados a fim de obter a massa inicial, denominada m_1 . Em seguida, as amostras foram imersas em água deionizada por 24 horas. Após esse período, os filmes foram retirados da água, secos cuidadosamente com papel toalha e pesados com o objetivo de obter a massa final, denominada m_2 . O grau de inchamento foi calculado pela Equação 14.

$$I = \frac{m_2 - m_1}{m_1} * 100 \quad (14)$$

4. RESULTADOS

Neste capítulo são apresentados e discutidos os resultados obtidos na caracterização e na purificação da quitosana, na determinação do ponto de nuvem do sistema quitosana/ácido acético/hidróxido de sódio e na preparação dos filmes assimétricos de quitosana.

4.1. Caracterização da quitosana

4.1.1. Purificação da quitosana

Mesmo que a quitosana já tenha se consolidado como um material adequado para muitas aplicações biomédicas, um dos pré-requisitos para o uso desses materiais é a sua obtenção na forma purificada, uma vez que impurezas podem causar reações imunológicas. Neste sentido, foram realizadas purificações da quitosana conforme metodologia descrita na seção 3.2.1.

A Figura 4-1 ilustra os espectros de FTIR para a quitosana sem purificação (QtC), purificada utilizando a liofilização como método de secagem (QtL) e purificada utilizando a evaporação em estufa como método de secagem (QtE).

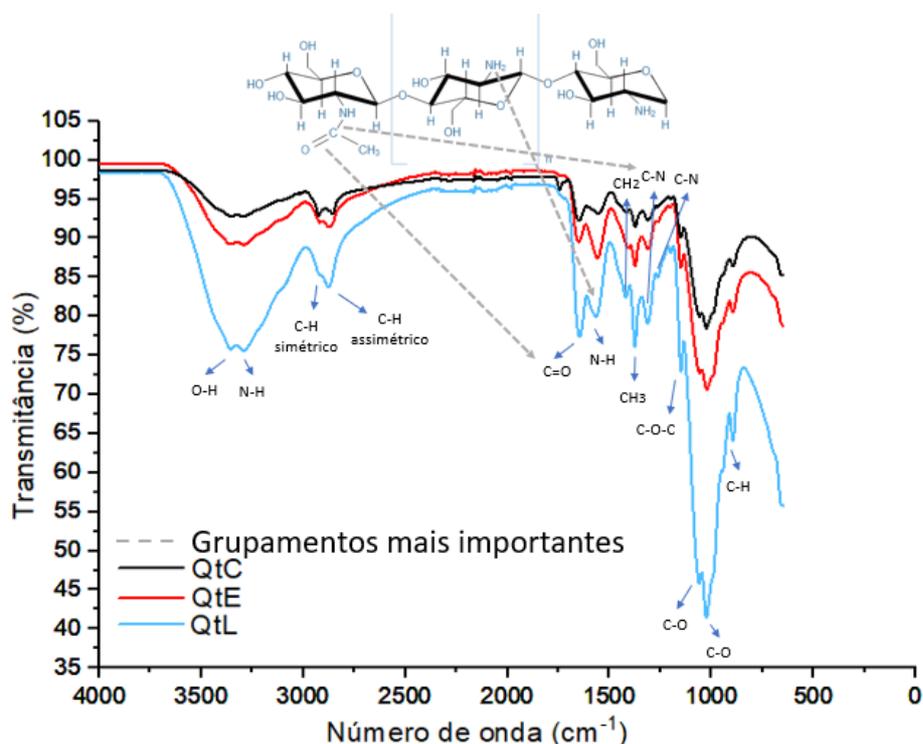


Figura 4-1 – Espectro de FTIR das amostras de quitosana comercial (QtC) e purificadas (QtL – liofilizada, QtE – em estufa).

As bandas principais da quitosana estão localizadas na região de 3280-3356 cm^{-1} , correspondentes ao alongamento sobreposto das ligações N-H e O-H; em 2870 e 2922 cm^{-1} atribuídas ao alongamento C-H assimétrico e simétrico, respectivamente, típicas de polissacarídeos.

As bandas que comprovam a presença de grupos N-acetil residuais, tendo em vista que a quitosana nunca é 100 % desacetilada, são encontradas em 1647 cm^{-1} , 1309 cm^{-1} e 1558 cm^{-1} e correspondem ao alongamento C=O da amida primária, alongamento CN da amida secundária e a curvatura N-H da amina primária, respectivamente (BRANCA *et al.*, 2016; DOMSZY; ROBERTS, 1985; KASAAI, 2009). As bandas localizadas em 1414 e 1370 cm^{-1} formam as deformações simétricas CH₂ e CH₃, respectivamente (KASAAI, 2009; PAVIA *et al.*, 2012; QIAO *et al.*, 2021; YATEENDRA *et al.*, 2012).

A banda em 1147 cm^{-1} é atribuída ao estiramento assimétrico da ligação C-O-C e as localizadas em 1071 e 1025 cm^{-1} correspondem ao estiramento C-O. As bandas referentes às ligações C-O-C e C-O são atribuídas às vibrações de estiramento da ligação glicosídica, presente em polissacarídeos (DOMSZY; ROBERTS, 1985; QIAO *et al.*, 2021). Em 1260 cm^{-1} está presente a banda referente à vibração de dobramento das ligações C-N e em 888 cm^{-1} à banda correspondente

ao C-H curvando-se para fora do plano do anel dos monossacarídeos (QIAO *et al.*, 2021).

Observando-se os espectros das três amostras é possível inferir que todas apresentaram as bandas características de uma amostra de quitosana (HAJJI *et al.*, 2014). Comparando os espectros da Figura 4-1, pode-se observar para a amostra de quitosana QtC, uma banda em torno de 1735 cm^{-1} , que pode, provavelmente, ser devido à presença da molécula lactona, um éster cíclico, que consiste em uma das impurezas presentes na quitina antes da purificação das cascas dos crustáceos, normalmente retirada na etapa de aquecimento (CHEREPANOV; BOTALOVA, 2020; COURY; DILLNER, 2008; DAHMANE *et al.*, 2014). Observa-se a diminuição da intensidade da referida banda após o processo de purificação, mais acentuada para a amostra que passou pelo aquecimento na etapa de secagem (QtE) (HAJJI *et al.*, 2014). Há a necessidade de lembrar que o nível de impurezas pode variar dependendo da fonte e do tratamento prévio da quitina. Também são difíceis de se detectar impurezas, tendo em vista que a maior parte delas é composta por proteínas, que apresentam grupos funcionais muito semelhantes aos da quitosana (NASTI *et al.*, 2009; PARDO-CASTAÑO; BOLAÑOS, 2019).

A metodologia de purificação com secagem por liofilização (QtL) foi a escolhida neste trabalho. A escolha se deve ao fato da amostra QtL ter apresentado um espectro com bandas mais definidas e também por não ter uma etapa de aquecimento que pode vir a degradar o polímero (EL-HEFIAN *et al.*, 2010; PARDO-CASTAÑO; BOLAÑOS, 2019).

4.1.2. Grau de desacetilação (GD)

Técnica de FTIR

A determinação do grau de desacetilação da quitosana pode ser realizada através da análise das bandas características no FTIR. Para padronizar as bandas do espectro da quitosana foi traçada uma linha de base seguindo metodologia descrita por DUARTE *et al.*, (2002), utilizando o *software* OriginLab8.

Para obter melhores resultados de GD utilizando esta técnica, é importante que a amostra esteja seca, uma vez que a presença de umidade pode influenciar na determinação da relação entre as áreas das bandas (THOMAS; PIUS; GOPI, 2020).

Os resultados para o grau de desacetilação da amostra QtL, utilizando as diferentes equações apresentadas na seção 2.2.2, bem como as relações das áreas de absorvância em frequências específicas, podem ser visualizados na Tabela 4-1.

Tabela 4-1 – Equações, relação das bandas e resultados para o grau de desacetilação da quitosana

Identificação	Equação	Relação de Áreas	GD (%)
1	$GD=100-(APB/ARB *100/1,33)$	A_{1663}/A_{3448}	$90,53 \pm 0,96$
2	$APB/ARB =0,0125*GA+0,2$	A_{1561}/A_{2877}	$77,54 \pm 0,67$
3	$GD=100-(APB/ARB *115)$	A_{1663}/A_{3448}	$89,52 \pm 0,81$
4	$GD=100-((APB+A_{1626})/ARB *100/1,33)$	$(A_{1663} + A_{1626})/A_{3448}$	$87,07 \pm 0,13$
5	$GD=100-((APB+A_{1626})/ARB *115)$	$(A_{1663} + A_{1626})/A_{3448}$	$82,04 \pm 0,77$

Como pode ser observado na Tabela 4-1, os valores encontrados para o GD são diferentes e dependem da Equação e da relação das bandas escolhidas. Além disso, a presença de bandas alargadas e sobreposições de dois ou mais picos, dificultam o cálculo da sua área. Dentre as relações de bandas utilizadas na literatura, as escolhidas por Moore e Roberts (1) e Baxter (3) apresentam resultados próximos aos obtidos por outras metodologias como: titulação potenciométrica, titulação condutivimétrica e ressonância magnética nuclear de prótons (DOS SANTOS *et al.*, 2009; KASAAI, 2009; WEISSPFLOG *et al.*, 2021). Porém, não existe um consenso na literatura sobre a existência de uma razão entre bandas que possa ser usada para toda a faixa de GD, pois a leitura do espectro de FTIR da quitosana muda em função do seu grau de desacetilação (KASAAI, 2008).

Nestes dois métodos, 1 e 3, a banda referente à ligação O-H, em 3448 cm^{-1} foi escolhida como banda de referência, pois não muda com o GD. No entanto, considerando a afinidade da quitosana com a água, a intensidade e/ou a largura desta banda pode sofrer variação, caso a amostra não esteja devidamente seca. Outro fator que pode influenciar na leitura da banda da hidroxila é o seu envolvimento em ligações intra e intermoleculares, como em grupos CH_2OH ou em anéis glicosídeos (DUARTE *et al.*, 2002; KASAAI, 2008; WEISSPFLOG *et al.*, 2021). Além disso, existe a possibilidade de sobreposição das bandas das ligações O-H e N-H, esta última em torno de 3270 cm^{-1} , tendo sua intensidade afetada pelo número de grupos acetil do material. Mesmo que estas bandas não sejam muito próximas, as ligações de hidrogênio e os efeitos da presença de água podem causar a sobreposição (BRANCA *et al.*, 2016).

A banda em 1663 cm^{-1} foi escolhida como banda sensível de modo a balancear a interferência causada pela absorção de água pelos grupos O-H, também presentes próximos a 1640 cm^{-1} . Deste modo, a umidade causaria um aumento da intensidade dessa banda e também na banda em 3350 cm^{-1} (DOMSZY; ROBERTS, 1985; MOORE; ROBERTS, 1980).

A equação proposta por Moore (1) (1980) é conhecida por ser mais adequada a leituras de GD entre 79-90 %, já a equação de Baxter (3) (1992) é indicada para leituras de $\text{GD} < 80\%$. Nesse sentido, baseado no grau de desacetilação médio da quitosana informado pelo fabricante, entre 75-85 %, estas duas equações podem ser consideradas adequadas para a obtenção do GD desta amostra.

Titulação condutivimétrica

O grau de desacetilação médio da amostra QtL foi também determinado utilizando a titulação condutivimétrica. A curva de titulação está apresentada na Figura 4.2.

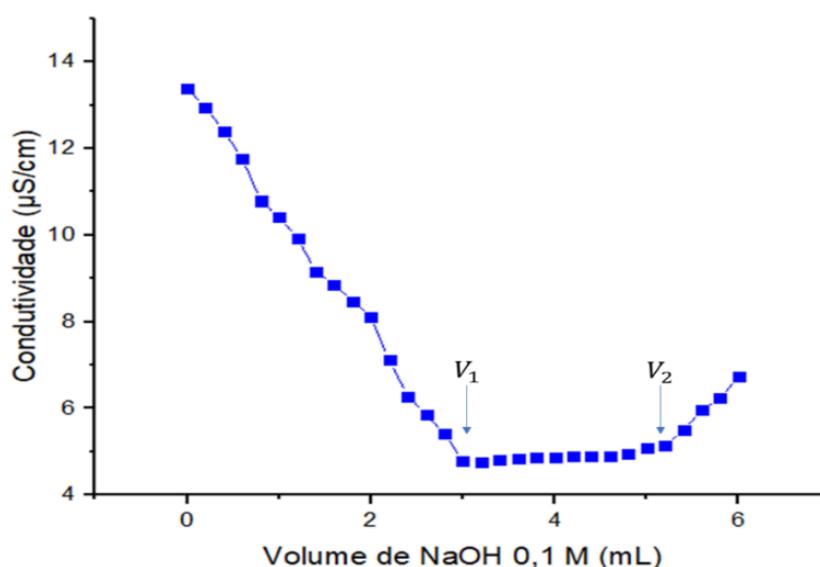


Figura 4-2 – Curva de titulação condutivimétrica para determinação do GD médio da quitosana QtL.

Na titulação condutivimétrica a mudança de condutividade da solução indica a substituição de íons, na medida em que a amostra de quitosana em solução aquosa ácida é titulada com uma solução de NaOH. Na primeira etapa da titulação percebe-se uma tendência linear de diminuição da condutividade da solução com o aumento do volume de titulante adicionado. Esta etapa acontece até a neutralização do ácido (V_1) presente em excesso na solução. Na segunda etapa da titulação ocorre a

neutralização dos grupos amina presentes na quitosana, até um volume de base adicionado V_2 . Por fim, a terceira etapa do processo apresenta um aumento da condutividade do meio, resultante do excesso de base e aumento da concentração do íon hidroxila (DE ALVARENGA; PEREIRA DE OLIVEIRA; ROBERTO BELLATO, 2010).

A titulação foi repetida três vezes para a amostra de quitosana purificada e os pontos de inflexão da curva de condutividade *versus* volume de NaOH gasto foram determinados pela interseção das retas. O GD médio da quitosana foi obtido pela média aritmética da triplicata, sendo encontrado um GD de $91,52 \pm 1,82$ %.

O resultado de grau de desacetilação obtido pela titulação condutivimétrica está em acordo com os valores encontrados pelo método de espectroscopia, calculado com as equações 1 e 3, apresentados na Tabela 4-1. Este valor é superior ao fornecido pelo fabricante, no entanto, este resultado é esperado uma vez que a quitosana, no processo de purificação, passa por um tratamento adicional com NaOH, que também é utilizado na desacetilação da quitina (KUMARI; KISHOR, 2020). Conseqüentemente, houve a diminuição do número de grupos acetil, aumentando o GD para a amostra QtL. Este resultado é satisfatório, pois quitosana com GD mais elevado apresenta uma maior proporção de grupos amina, que são considerados os responsáveis pela ação antimicrobiana deste material.

4.1.3. Grau de cristalinidade (Cr %)

O grau de cristalinidade das amostras de quitosana não purificada (QtC) e purificada (QtL) foi investigado por análise de DRX. Os difratogramas são apresentados na Figura 4-3.

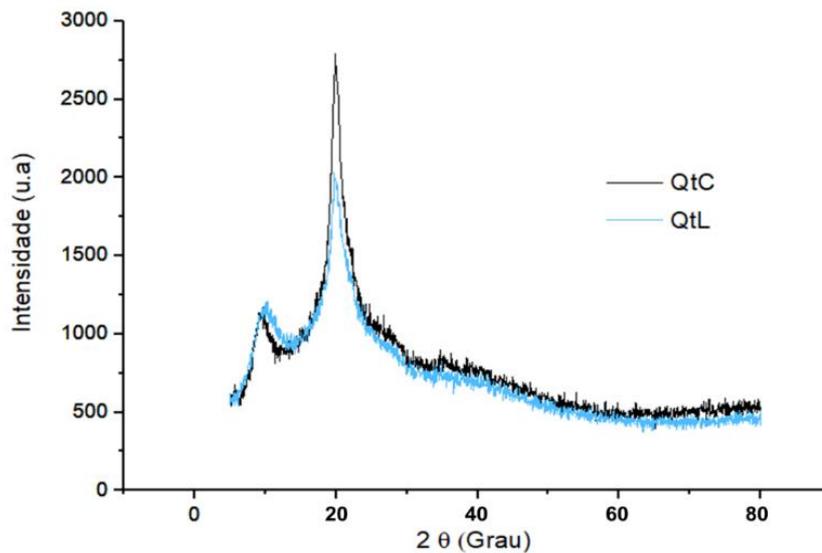


Figura 4-3 – Difratogramas da quitosana comercial (QtC) e quitosana purificada (QtL).

Analisando ambos difratogramas, é possível observar padrões semelhantes entre eles, revelando o padrão ordenado simétrico ortorrômbico $P2_12_12_1$, o grupo espacial mais frequentemente visto em cristais de proteínas (FACCHINATTO *et al.*, 2020). Segundo a literatura, este padrão está relacionado à estrutura do cristal de quitosana (MAZEAU; WINTER; CHANZY, 1994; OKUYAMA *et al.*, 1997, 2000). É possível identificar dois picos de difração com as intensidades mais altas entre 2θ aproximadamente igual a 9° - 10° e a aproximadamente igual a 20° . É reportado que tais picos podem ser atribuídos aos planos cristalinos hidratados da quitosana (FACCHINATTO *et al.*, 2020; IOELOVICH, 2014; RINAUDO, 2006).

Nota-se que as amostras apresentam leituras diferentes de intensidade. Tal comportamento é devido à temperatura a que a amostra é submetida, que causa uma mudança na intensidade dos picos (NAITO *et al.*, 2015). Sendo assim, as amostras de quitosana provenientes de uma mesma fonte devem apresentar intensidades semelhantes.

A cristalinidade foi medida como a razão da soma das áreas sob os picos de difração cristalina, com relação à área total sob a curva. Seguindo a equação apresentada na seção 3.2.4, podemos obter os valores de 46,58 % e 45,07 % para QtC e QtL, respectivamente, com desvio de 0,11 %. Este resultado está de acordo com o esperado, pois o processo de purificação da quitosana promoveu uma leve desacetilação do material, tendo uma relação direta com o grau de cristalinidade. A amostra purificada é ligeiramente menos cristalina que sua precursora e, portanto, mais solúvel, o que é benéfico para a formação dos filmes.

4.1.4. Análise da estabilidade térmica

As curvas da análise termogravimétrica (TGA) das três amostras são apresentadas na Figura 4-4.

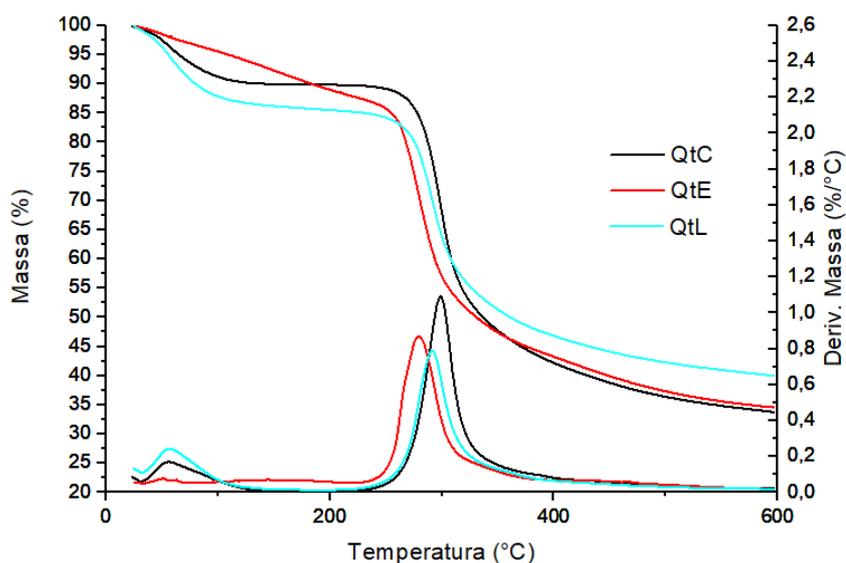


Figura 4-4 – Curvas de análise térmica (TGA) das amostras de quitosana.

Pode-se observar dois intervalos de temperatura característicos de perda de massa sob atmosfera de N_2 : o primeiro encontra-se abaixo de 100 °C e corresponde à evaporação da água fisicamente adsorvida no material; o segundo pico encontra-se próximo de 300 °C, característico da despolimerização/decomposição das cadeias poliméricas. A degradação do material acontece através da desacetilação e clivagem de ligações glicosídicas, que representam uma ligação entre um carboidrato e um álcool, ocorrendo após a condensação, levando à pirólise da matriz polimérica da quitosana. A temperatura de máxima degradação da amostra de quitosana comercial (QtC) ocorreu em 334,6 °C, permanecendo em concordância com resultados da literatura, que trazem valores aproximados por volta de 300 e 330 °C (ZAWADZKI; KACZMAREK, 2010). Esses resultados podem variar dependendo das características da quitosana, como o GD e a sua origem.

O primeiro aspecto visto na comparação das três amostras é que a amostra QtE não apresentou um pico significativo de perda de água (abaixo de 100 °C), sendo esse justificado pela secagem prévia da amostra na temperatura de 50 °C. Esta amostra também apresentou menor temperatura de degradação no evento principal,

o que pode indicar uma mudança da estrutura da quitosana causada pelo aquecimento da mesma, favorecendo a degradação térmica do material.

Para a amostra QtL, a degradação máxima ocorreu em 290,5 °C, como mostrado na Figura 4-5. Aqui novamente se evidencia o efeito do grau de desacetilação na propriedade do material. Estudos demonstram que a estabilidade térmica da quitina é levemente superior à da quitosana e está relacionada ao grau de desacetilação (MOUSSOUT *et al.*, 2016; ZAWADZKI; KACZMAREK, 2010).

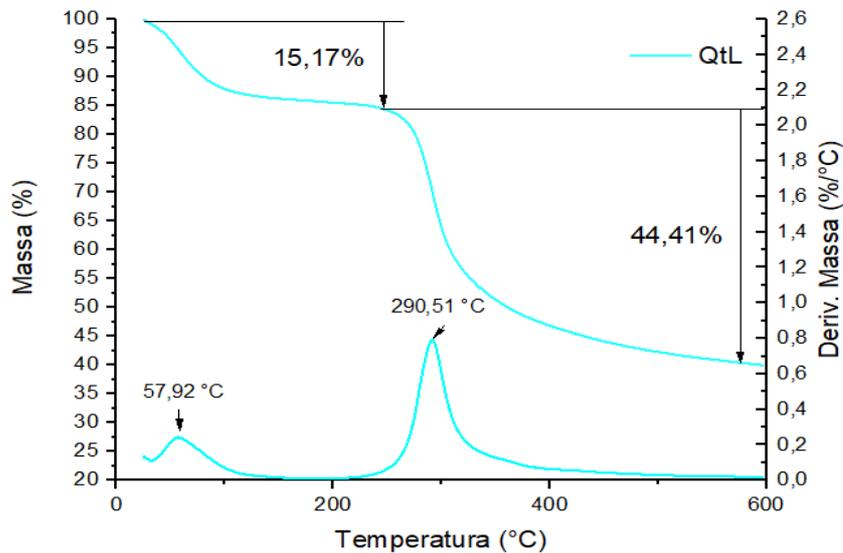


Figura 4-5 – Curvas de TGA da amostra QtL.

4.2. Ponto de nuvem

O diagrama de fases de um sistema ternário pode ser construído através do método de titulação de ponto de nuvem se a viscosidade da solução for relativamente baixa. Neste estudo, os componentes do sistema são: quitosana, solução aquosa de ácido acético (solvente) e solução aquosa de NaOH (não solvente). Uma vez que soluções de quitosana com concentrações maiores de polímero apresentam alta viscosidade, estas não puderam ser analisadas em função da dificuldade de visualização do ponto de turvação do sistema. Apesar disso, o método titulométrico revelou-se aplicável para a determinação da curva de ponto de nuvem em duas temperaturas diferentes (30 e 50 °C) das soluções preparadas com a amostra QtL, até uma concentração de polímero de 5 % (m/m). Na Figura 4-6 está apresentada uma imagem ilustrativa do comportamento de uma solução de quitosana na concentração de 0,5 % (m/m) com a titulação utilizando uma solução aquosa de

NaOH 2 % (m/m). O ponto de nuvem se caracteriza pela mudança de turbidez da solução que é observada no instante da separação de fases.

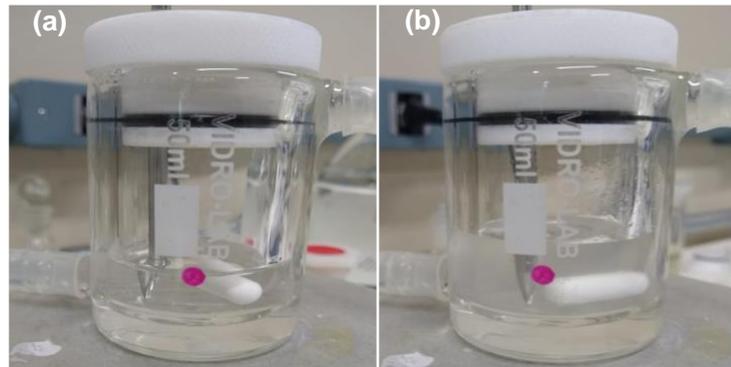


Figura 4-6 – Imagem ilustrativa do comportamento de uma solução de quitosana 0,5 % (m/m) (a) antes e (b) depois de atingir o ponto de nuvem.

As soluções homogêneas (transparentes) de quitosana quando em contato com um determinado volume de não solvente, ou seja, no ponto de separação de fases, apresentam uma coloração esbranquiçada e turva sem a formação de precipitados. Como visto na Figura 4-7, para soluções em concentração acima de 2 % (m/m) de quitosana, a visualização da turbidez da solução foi menos acentuada, uma vez que a quitosana é naturalmente de difícil solubilização. Esta característica é comum a todos os biopolímeros com cadeia semelhante à celulose (KASAAI, 2008).

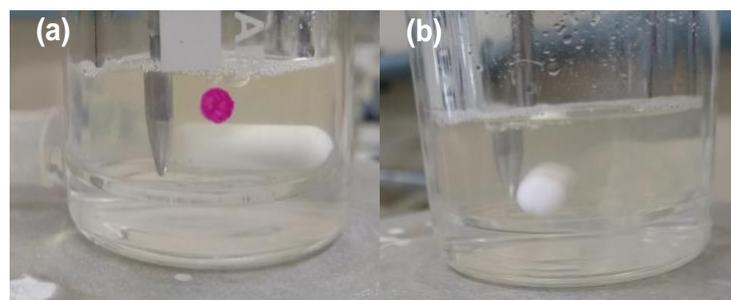


Figura 4-7 - Imagem ilustrativa do comportamento de uma solução de quitosana 3 % (m/m) (a) antes e (b) depois de chegar ao ponto de nuvem.

A quantidade de não solvente utilizada para atingir o ponto de nuvem, como esperado, diminui com o aumento da concentração do polímero. As quantidades em base mássica do polímero e do não solvente estão listadas na Tabela 4-2.

Tabela 4-2 – Composição dos pontos de nuvem na temperatura de 30 °C e 50 °C: % mássica de solução aquosa de NaOH e % de quitosana em solução de ácido acético 2 % (v/v).

Conc. QtL (m/m)	Quant. NaOH (m/m)	
	T = 30 °C	T = 50 °C
0,25%	40,04% ± 0,38	40,23% ± 0,23
0,50%	39,41% ± 0,59	39,90% ± 0,68
1,00%	36,85% ± 0,38	38,09% ± 0,66
2,00%	33,84% ± 0,17	34,60% ± 0,69
3,00%	26,65% ± 1,37	28,74% ± 1,35
4,00%	22,32% ± 1,23	23,79% ± 1,01
5,00%	15,53% ± 1,20	17,80% ± 0,89

Através da análise dos resultados reportados na Tabela 4-2, é possível verificar que a solubilidade do material aumenta levemente com a temperatura, tendo em vista a maior necessidade de adição de não solvente nos experimentos conduzidos a 50 °C. No entanto, o aumento da temperatura não modificou a tendência de diminuição da necessidade do não solvente com o aumento da concentração de quitosana, pois uma maior quantidade de polímero em solução diminui a concentração de íon H_3O^+ .

As curvas de ponto de nuvem apresentadas na Tabela 4-2 são mostradas na forma gráfica através do diagrama de equilíbrio líquido-líquido ternário da Figura 4-8.

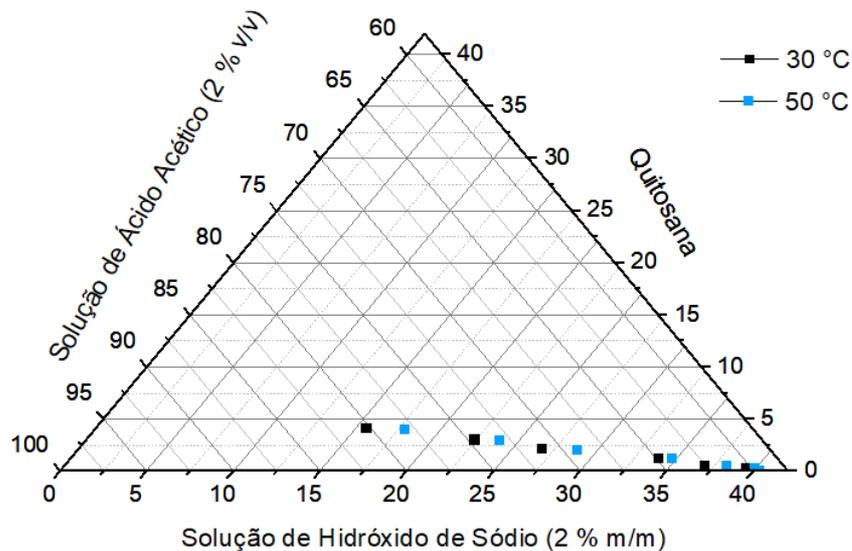


Figura 4-8 – Diagrama ternário para quitosana/solução de ácido acético/solução de hidróxido de sódio a 30 e 50 °C.

No diagrama de fases da Figura 4-8 temos uma região à esquerda da curva de ponto de nuvem e uma região à direita. A primeira indica a presença de uma fase

homogênea e estável e, à direita, a região de separação líquido-líquido. As curvas de ponto de nuvem tendem a se aproximar do eixo polímero/solvente na medida em que a concentração de quitosana na solução ácida aumenta.

Conforme observado nos experimentos mostrados na Figura 4-8, a região de equilíbrio líquido-líquido diminui com o aumento da temperatura e a região de uma fase homogênea torna-se maior. Este resultado é o esperado para a maioria dos sistemas poliméricos, pois o aumento da temperatura favorece a dissolução das regiões cristalinas dos materiais. Para uma mesma concentração de solução de quitosana e ácido acético, a variação de 20 graus na temperatura promoveu uma leve mudança na separação líquido-líquido. Um fenômeno semelhante para a curva binodal também foi observado por (CHENG, 1999) para água/Dimetilformamida/fluoreto de polivinilideno. Sendo assim, temperaturas mais altas causam a maior necessidade de não solvente para promover a precipitação do polímero, indicando melhor miscibilidade.

A temperatura consorciada à adição de solução de NaOH reduziu de maneira considerável o poder do solvente promovendo o processo de inversão de fases. Este fato é essencial para a fabricação de filmes porosos pelo método de precipitação por imersão em banho de não solvente.

O pH da solução é um dos parâmetros mais sensíveis para o cálculo do grau de protonação da quitosana, da qual depende sua solubilização. Nesse sentido, se faz necessária a investigação do comportamento do pH durante os experimentos de ponto de nuvem. A partir das medições de pH das soluções de quitosana e ácido acético antes da titulação, o grau de protonação (α) foi determinado com o uso de equações presentes na seção 2.2.2 e apresentado na Figura 4-9.

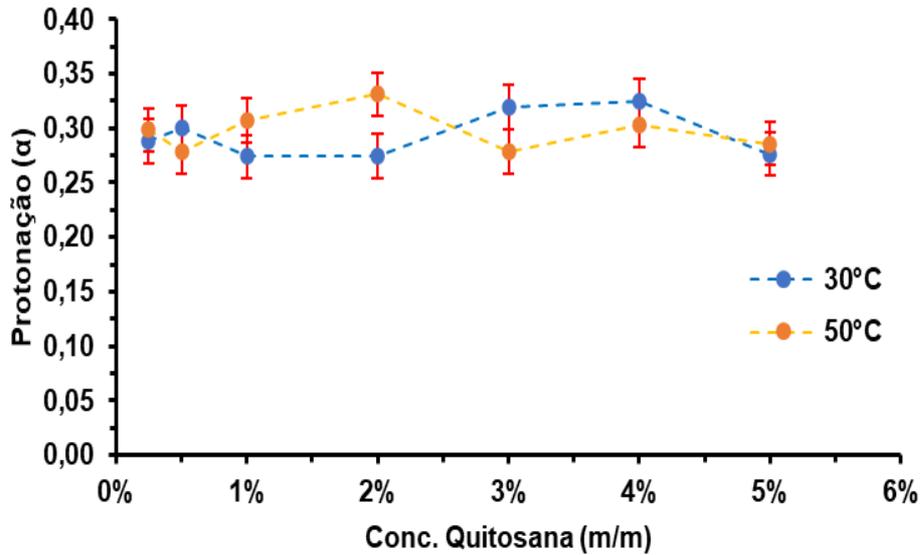


Figura 4-9 – Grau de protonação da quitosana para as diferentes soluções de quitosana utilizadas nos experimentos de ponto de nuvem.

A partir dessa análise, pode-se observar que a solubilização completa é obtida, para ambas as temperaturas, quando o grau de protonação está em torno de 0,3. Para o sistema quitosana/ácido acético, a influência da concentração de quitosana e da temperatura da solução no grau de protonação foi mínima ou nula.

Em se tratando do pH inicial das soluções, notou-se um aumento do pH com o aumento da concentração de quitosana. A Figura 4-10 apresenta o comportamento do pH das soluções ácidas de quitosana.

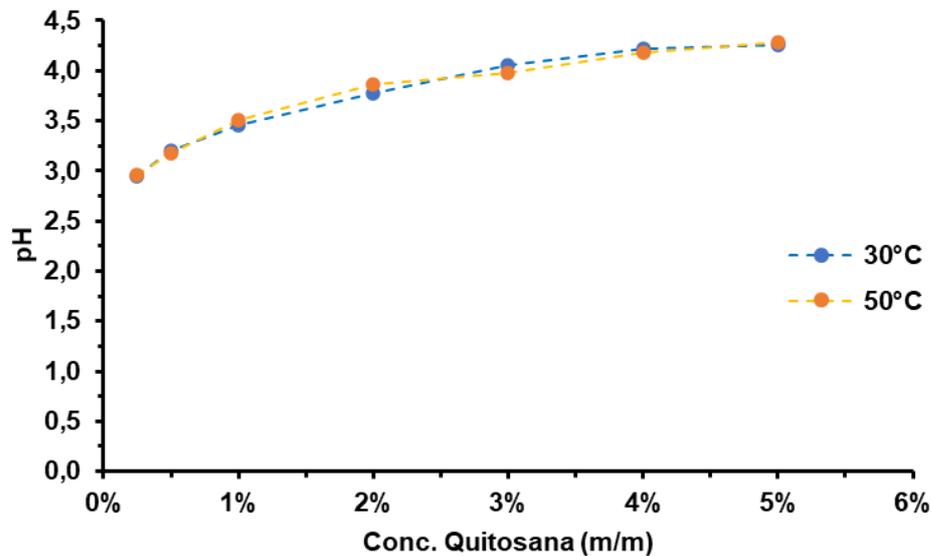


Figura 4-10 – pH das diferentes soluções ácidas de quitosana utilizadas nos experimentos de ponto de nuvem.

Através dos resultados de pH apresentados na Figura 4-10, percebe-se que para menores concentrações de quitosana o valor do pH da solução homogênea é menor. Este comportamento é devido à maior quantidade de ácido dissociado e ao menor consumo de íons para a protonação dos grupos amina ($-NH_2$) dos monômeros de quitosana. Da mesma forma, seguindo a Figura 4-10 observa-se um aumento nos valores de pH com o aumento da concentração de quitosana.

Em ambas as temperaturas o pH das soluções homogêneas estabiliza em valores aproximados de 3 a 4, em toda faixa de concentração analisada. Em contrapartida, a precipitação da quitosana e a separação em duas fases líquidas acontece em valores de pH mais altos. A Figura 4-11 apresenta os valores de pH da solução turva, quando o sistema atinge o ponto de nuvem.

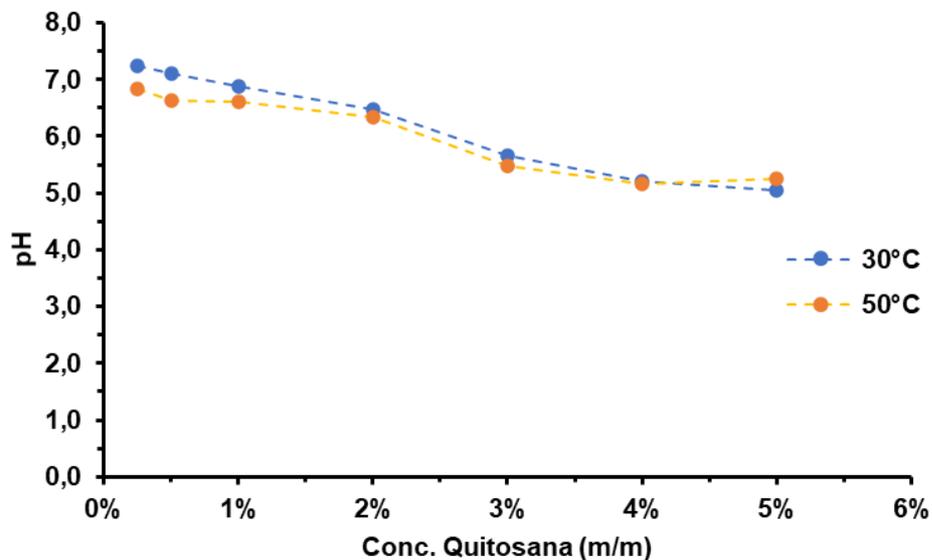


Figura 4-11 – pH das diferentes soluções de quitosana medido no ponto de nuvem, com as soluções turvas.

Como esperado, em todas as concentrações de quitosana, a precipitação do polímero foi induzida pelo aumento do pH do meio, causado pela neutralização dos íons H_3O^+ da solução e desprotonação dos grupos amina. Os menores valores de pH final para as maiores concentrações de quitosana, estão diretamente ligados à menor necessidade de adição de solução básica para que ocorra a separação líquido-líquido.

4.3. Caracterização dos filmes sem banho de neutralização

A Figura 4-12 traz as imagens dos filmes de quitosana obtidos após o processo de liofilização. Os filmes apresentam coloração branca e superfície rugosa e irregular.

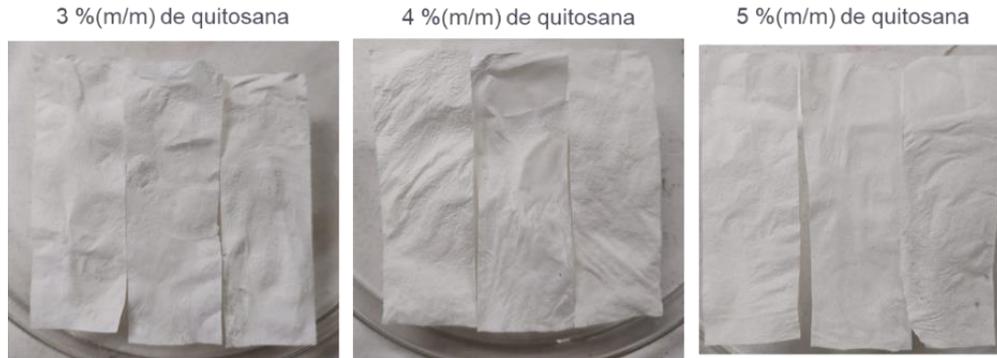


Figura 4-12 – Imagem dos filmes de quitosana em diferentes concentrações.

A elevada rugosidade apresentada na superfície do filme se deve, provavelmente, ao processo de secagem por liofilização, em que o não solvente (solução aquosa de NaOH) ao sublimar, promove o encolhimento dos poros presentes nos filmes (MANSOURIZADEH; ISMAIL, 2012). Além disso, a rugosidade é uma característica intrínseca de um material poroso e o grau de rugosidade é um fator a ser considerado e controlado para cada aplicação específica (THOMAS; PIUS; GOPI, 2020). Para curativos, a existência de poros de tamanhos diferentes ao longo da espessura do filme é desejada quando o objetivo é absorver exsudatos de uma ferida e proteger contra patógenos externos, por exemplo.

4.3.1. Caracterização físico-química por FTIR

A fim de observar a interação da amostra com a solução de ácido acético e de hidróxido de sódio, foram realizadas análises de FTIR nos filmes de quitosana em diferentes concentrações.

Os espectros de FTIR da quitosana purificada QtL e dos filmes preparados por precipitação por imersão estão apresentados na Figura 4-13. Em relação aos espectros dos filmes de quitosana, a ampla banda de absorção entre 3600 e 3000 cm^{-1} é atribuída às ligações O-H e C-H. A amplitude alongada é devido às vibrações de interferência entre moléculas do ácido ligadas ao hidrogênio das ligações O-H e N-H

da quitosana (BALAU *et al.*, 2004; BRANCA *et al.*, 2016; TAKARA; MARCHESE; OCHOA, 2015).

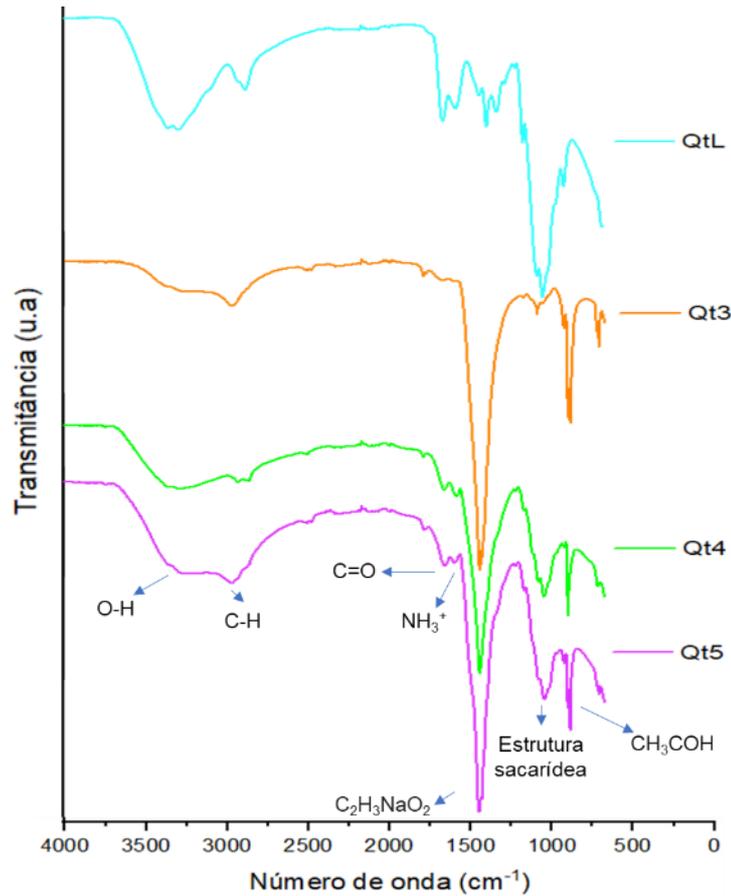


Figura 4-13 – Espectro de FTIR da amostra de quitosana QtL e dos filmes preparados em diferentes concentrações.

A banda em 1582 cm^{-1} corresponde à amina primária. A intensidade da banda se intensifica com o aumento da concentração de quitosana na solução precursora do filme, o que é esperado, uma vez que aumenta o número de grupos amina protonáveis.

A presença de grupos N-acetil foi confirmada pela banda em 1642 cm^{-1} , atribuída à ligação C=O da amida, que aumenta sua intensidade conforme a concentração de quitosana aumenta. A diminuição da intensidade desta banda nos filmes de quitosana pode ser atribuída à desacetilação dos grupos amida remanescentes da quitina quando os filmes entraram em contato com NaOH. A banda referente ao estiramento C-N de amida, em 1325 cm^{-1} , não foi observada possivelmente pela sobreposição das bandas nesta região.

Outra banda dominante pode ser observada em 1431 cm^{-1} , associada ao acetato de sódio ($\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$), formado durante o processo de desprotonação da quitosana na formação do filme (BECKINGHAM; LYND; MILLER, 2018). O aparecimento desta banda sugere que o sal ficou depositado sobre o filme após a troca de solventes. As bandas em torno de 1019 cm^{-1} , correspondentes às ligações C-O-C e C-O, apresentaram um aumento em sua intensidade com o aumento da concentração do biopolímero, isso se deve à presença da estrutura do polissacarídeo, evidenciando as vibrações de estiramento da ligação glicosídica (DOMSZY; ROBERTS, 1985).

A nítida banda em 866 cm^{-1} corresponde ao modo vibracional de dobramento CH_3COH do ácido carboxílico. Essa banda é comumente considerada parte da região da impressão digital para a identificação do ácido acético na leitura de espectros de FTIR, e está presente na maioria dos compostos orgânicos. A sua presença comprova que a troca de solventes não foi efetiva no processo de formação do filme de quitosana (DENG *et al.*, 2021; FERNANDEZ-SAIZ; OCIO; LAGARON, 2006).

4.3.2. Grau de cristalinidade dos filmes (Cr %)

A fim de investigar as mudanças estruturais dos filmes de quitosana em diferentes concentrações do biopolímero foram realizados e comparados difratogramas de Raios X dos filmes de quitosana e da quitosana purificada QtL (Figura 4-14). O difratograma da quitosana purificada em pó (QtL) apresenta dois picos principais de difração em torno de $2\theta = 16,3^\circ$ e $29,7^\circ$, associados à conformação hidratada da quitosana. Conforme o perfil dos difratogramas dos filmes, eles apresentam uma estrutura amorfa, como relatado em outros estudos de filmes de quitosana solubilizados em ácido acético (CHEN *et al.*, 2015; QIAO *et al.*, 2021; TAKARA; MARCHESI; OCHOA, 2015).

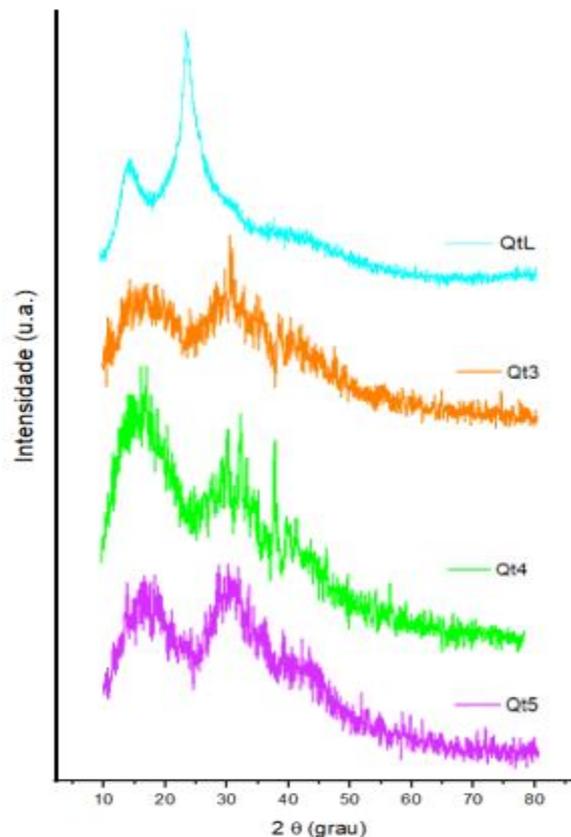


Figura 4-14 – Padrão de DRX para a amostra de quitosana QtL e dos filmes formados em diferentes concentrações.

Em comparação com a quitosana em pó, os filmes nas três concentrações avaliadas apresentam uma estrutura amorfa com sinais mais alargados e com deslocamento do sinal para ângulos maiores, revelando uma mudança na estrutura cristalina do biopolímero. Uma hipótese para este comportamento é a presença de cargas e de contra-íons, verificada na análise de FTIR, que dificulta as interações inter e intracadeias, diminuindo o empacotamento e, por consequência, a cristalinidade. Na formação do filme, a presença do ácido e da base promovem uma desestabilização e rearranjo das ligações de hidrogênio presentes nas cadeias da quitosana, causada pelas interações intramoleculares entre os grupos amina protonados e a hidroxila da quitosana, que limitam o movimento molecular da cadeia de quitosana, e a presença dos íons ácidos que dificulta as ligações de hidrogênio. Isso acaba por dificultar o empacotamento necessário para a cristalização da quitosana. A possível presença de algum excesso de ácido também pode contribuir para a diminuição da cristalinidade dos filmes (CHO *et al.*, 2000; QIAO *et al.*, 2021).

4.3.3. Análise da estabilidade térmica dos filmes

As curvas da análise termogravimétrica da amostra QtL de quitosana e dos filmes formados estão presentes na Figura 4-15. A quitosana em pó purificada, QtL, apresenta dois estágios de degradação térmica, sendo o primeiro em aproximadamente 70 °C, correspondente à perda de água, e o segundo estágio, com início em aproximadamente 215 °C, referente à decomposição térmica da cadeia principal da quitosana. A estabilidade térmica dos filmes de quitosana diminuiu e o termograma apresentou quatro estágios de degradação, iniciando em aproximadamente 70 °C e terminando entre 465 e 540 °C. Os eventos de perda de massa são semelhantes para os filmes nas diferentes concentrações, sendo que a maior perda de massa ocorreu em aproximadamente 70 °C, sendo essa entre 21 e 24 %, atribuída à perda da umidade do filme e também ao ácido remanescente, que apresenta ponto de ebulição em aproximadamente 118 °C, próximo ao fim desse pico de perda de massa (DIMIAN; A.KISS; BILDEA, 2019). A segunda etapa de perda de massa, em aproximadamente 180 °C, é devida à decomposição térmica e oxidativa da quitosana, também podendo estar relacionada à eliminação de produtos voláteis. A presença de residual da solução do ácido e do hidróxido de sódio utilizados no processo de formação da membrana, além da presença do sal de acetato, como observado na análise de FTIR, pode ter promovido a antecipação da degradação da cadeia principal do polímero (BALAU *et al.*, 2004).

Experimentos térmicos anteriores (EL-HEFIAN *et al.*, 2010; NUNTHANID *et al.*, 2001; QIAO *et al.*, 2021; TAKARA; MARCHESI; OCHOA, 2015; ZHANG *et al.*, 2021) mostraram que a degradação térmica de filmes de quitosana imersos em NaOH apresentam mais estágios de degradação devido à liberação de pequenos produtos de degradação molecular, tanto de quitosana quanto do hidróxido de sódio. Essa degradação ocorre em torno de 270 °C para os filmes Qt4 e Qt5, com perda de massa de 13 e 6,5 %, respectivamente. Para o filme Qt3 essa etapa pode ter acontecido junto à etapa anterior de decomposição glicosídea.

O último estágio de degradação pode ser atribuído, segundo a literatura, à uma pequena fração do grupo acetato que ainda pode estar presente no filme após a decomposição das ligações glicosídicas (cadeia principal da quitosana), que acaba por formar ácido acético e butírico e uma série de ácidos graxos de cadeia curta (NETO *et al.*, 2005; OSMAN, 2005).

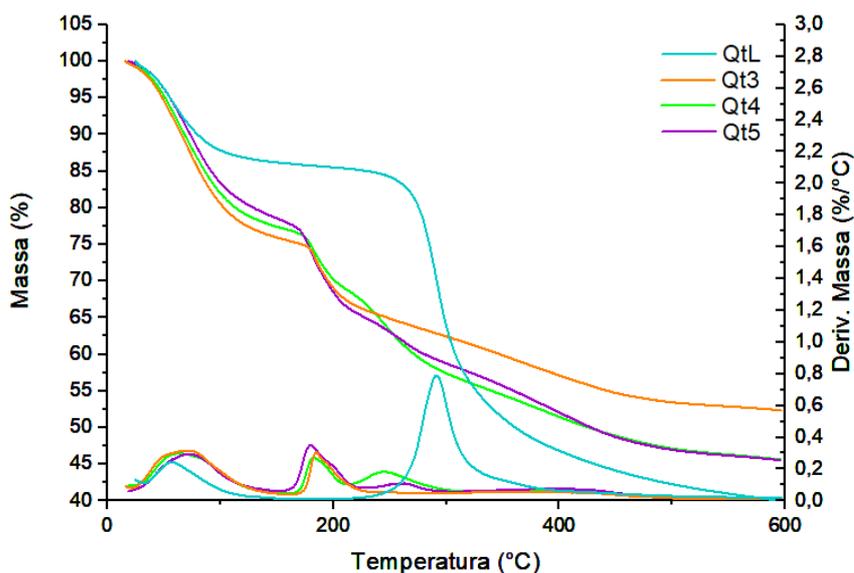


Figura 4-15 – Termogramas da amostra QtL de quitosana e dos filmes de quitosana em diferentes concentrações.

Os filmes apresentaram percentual de resíduo, na temperatura de 600 °C, consideravelmente superior (46 % a 50%) ao polímero puro QtL (40 %). Este comportamento está de acordo com a literatura e com os resultados de FTIR, que mostram a presença de acetato de sódio nos filmes, possíveis resíduos da neutralização após a imersão dos mesmos em solução de hidróxido de sódio (BECKINGHAM; LYND; MILLER, 2018; TAKARA; MARCHESI; OCHOA, 2015).

4.3.4. Morfologia dos filmes

A morfologia da superfície e da seção transversal dos filmes de quitosana está apresentada na Figura 4-16. Segundo as imagens da superfície (Figura 4-16 (a), (b) e (c)), observa-se que ela é irregular e não são observados poros nessa magnitude de ampliação. Porém, sabe-se que estruturas opacas apresentam poros em sua superfície. Uma das características da técnica de precipitação por imersão é a formação de estruturas assimétricas com variação de diâmetros de poros na seção transversal, e que estes podem apresentar tamanhos muito pequenos na superfície.

A partir das imagens da seção transversal (Figura 4-16 (d) e (e)) observa-se que os filmes possuem uma estrutura lamelar porosa para os filmes Qt3 e Qt4 com uma fina camada de topo. No entanto, o tamanho dos poros para Qt3 é consideravelmente maior. A estrutura lamelar se deve ao processo de secagem dos filmes por liofilização. Os filmes são primeiramente congelados onde a água e o residual do solvente (ácido acético) e o não solvente (hidróxido de sódio) passam pelo

processo de resfriamento, ocorrendo a nucleação e crescimento de cristais de gelo, formando uma microestrutura na forma de lamelas quando o solvente aquoso passa pelo processo de sublimação.

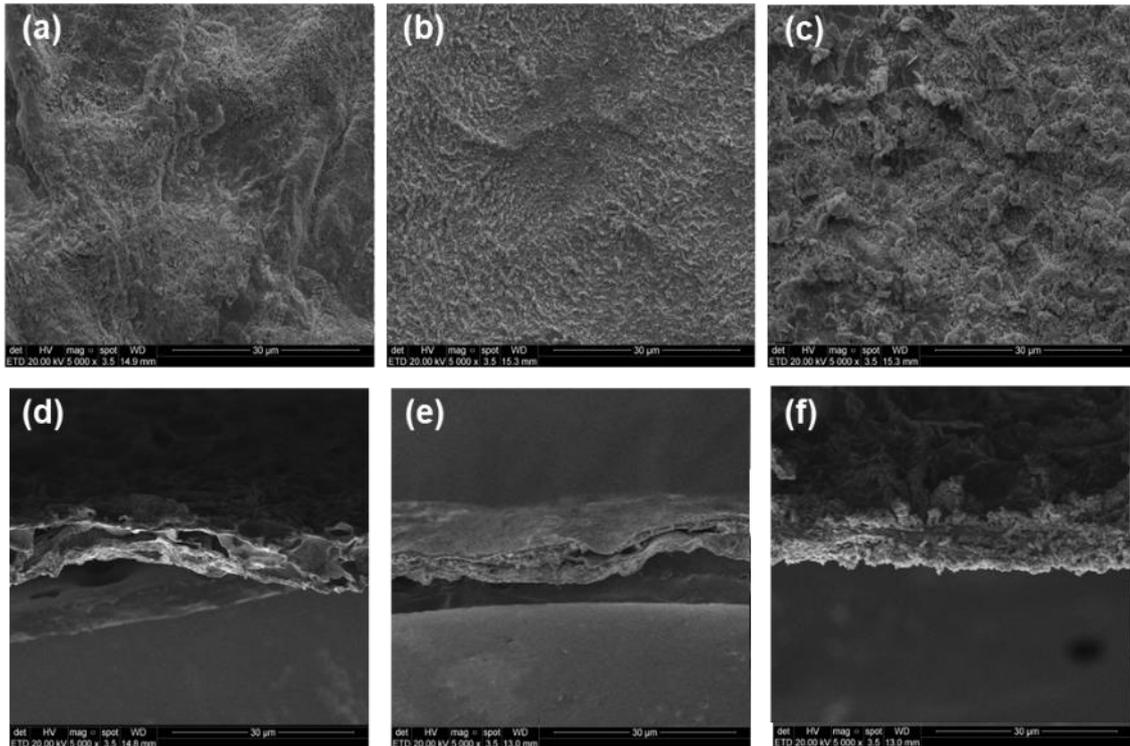


Figura 4-16 –Imagens de MEV dos filmes de quitosana na magnitude de 5000x: (a) superfície Qt3 (b) superfície Qt4 (c) superfície Qt5 (d) seção transversal Qt3 (e) seção transversal Qt4 (f) seção transversal Qt5.

Outro fato observado é a posição da curva do ponto de nuvem, sabe-se que quanto maior a lacuna entre o eixo polímero/solvente e a curva de ponto de nuvem maiores serão os poros formados (CADORE, 2019).

Para o filme Qt5 (Figura 4-16 (f)) é possível observar uma grande quantidade de sal na seção transversal, que dificulta a visualização de possíveis poros, resultando em uma aparência densa e granulosa. Nota-se a supressão do tamanho dos poros com o aumento da concentração de biopolímero nos filmes. Esse comportamento pode ser devido ao aumento da viscosidade da solução com o aumento da concentração de quitosana, dificultando a difusão mútua entre o solvente e o não solvente, promovendo a precipitação denominada “com atraso” que favorece a formação de filmes com estrutura mais fechada de poros (MANSOURIZADEH; ISMAIL, 2012).

4.3.5. Propriedades mecânicas dos filmes

As propriedades mecânicas de filmes porosos assimétricos são substancialmente mais baixas, quando comparadas às de filmes obtidos através de métodos evaporativos que promovem a formação de filmes densos (ALTIOK; ALTIOK; TIHMINLIOGLU, 2010; DEBONE *et al.*, 2019; LECETA *et al.*, 2013).

A Tabela 4-3 apresenta os resultados das propriedades mecânicas dos filmes de quitosana em diferentes concentrações.

Tabela 4-3 – Propriedades mecânicas dos filmes de quitosana.

Filmes	Elongação (%)	Módulo de Young (MPa)	Tensão de ruptura (MPa)
Qt3	3,05 ± 1,38	0,28 ± 0,07	0,90 ± 0,03
Qt4	2,80 ± 0,48	0,75 ± 0,26	2,23 ± 0,72
Qt5	4,23 ± 1,62	1,01 ± 0,34	3,57 ± 1,09

Os resultados mostram que os três filmes apresentam valores similares para a percentagem de alongação. O filme Qt3 apresenta menor elasticidade e tensão de ruptura que os demais filmes. Conforme observado pela análise de MEV, o filme Qt3 apresenta uma estrutura lamelar mais porosa, portanto, mais frágil.

Pode-se observar uma tendência de aumento das propriedades mecânicas dos filmes com o aumento da concentração de quitosana, que pode estar relacionada com o aumento da concentração dos grupos amina não protonados no filme, aumentando as interações entre cadeias do polímero, conduzindo a filmes mais compactados e mais resistentes (TAKARA; MARCHESE; OCHOA, 2015).

Todos os filmes produzidos, quando comparados com *scaffolds* de quitosana, são mais resistentes, conforme dados de tensão de ruptura reportados por diferentes autores: 0,31 ± 0,03 MPa (4 % QT) (JANA *et al.*, 2012), 0,058 ± 0,028 MPa (1,5 % QT) (ALBANNA *et al.*, 2012) e 0,013 ± 0,003 MPa (2 % QT) (ZAKHEM; BITAR, 2015).

4.3.6. Grau de inchamento dos filmes

Os filmes de quitosana em diferentes concentrações foram submetidos a testes de inchamento com água deionizada. Esse é um parâmetro importante para a aplicação desses filmes na área biomédica, já que a alta capacidade de absorção de água pode manter o ambiente úmido e remover o fluido de feridas, o que é uma

característica importante para promover a cicatrização (ZHANG *et al.*, 2021). A Tabela 4-4 mostra os resultados de grau de inchamento obtidos para os filmes de quitosana em diferentes concentrações.

Tabela 4-4 – Grau de inchamento dos filmes de quitosana.

Filme	I (%)
Qt3	176,42 ± 1,75
Qt4	179,88 ± 1,65
Qt5	183,73 ± 2,72

Sabe-se que, naturalmente, filmes de quitosana fabricados a partir de soluções diluídas de ácido acético com uso da técnica de evaporação de solvente tendem a quase dissolver-se em contato constante com a água (PAVONI, 2018; SENCADAS *et al.*, 2012; TASSELLI *et al.*, 2013; YANG *et al.*, 2010), devido à protonação das unidades de quitosana, formando o acetato de quitosana, um composto com maior inchamento em água. Porém, os filmes formados com o uso de solução de NaOH como não solvente causa a desprotonação do biopolímero fazendo com que ele mantenha sua estrutura em contato com a água. Para *scaffolds* de quitosana, o grau de inchamento pode ficar entre 400 e 1000 %, dependendo da temperatura de secagem e da concentração do banho de precipitação, que irá promover a formação de uma estrutura esponjosa que favorece a absorção de água (KARAKEÇILI *et al.*, 2019; REYS *et al.*, 2017; THEIN-HAN; KITIYANANT, 2007). Pelos resultados apresentados na Tabela 4-4, observa-se que há um leve aumento no grau de inchamento com o aumento da concentração de quitosana, que deve-se provavelmente, ao maior número de grupos amina no meio, promovendo maior hidrofiliabilidade ao filme.

4.4. Caracterização dos filmes após a lavagem com água

Devido ao residual do sal acetato de sódio observado na superfície dos filmes produzidos, optou-se por adicionar uma etapa de lavagem com água destilada após a secagem dos mesmos.

As imagens dos filmes após o processo de lavagem estão apresentadas na Figura 4-17. Os filmes tiveram sua integridade física mantida, sem que houvesse solubilização em água ou quebra no processo de secagem.

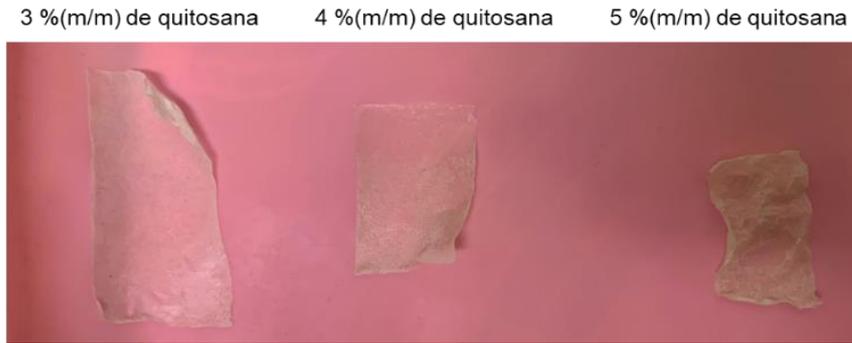


Figura 4-17 – Filmes de quitosana pós lavagem em diferentes concentrações.

A lavagem dos filmes liofilizados acarretou mudanças físicas visíveis, os filmes passaram a apresentar transparência e coloração esbranquiçada. O aspecto rugoso dos filmes foi mantido nas concentrações de 3 e 4 % (m/m) e intensificado no filme com 5 % (m/m) de quitosana. A secagem dos filmes em estufa de convecção causou a movimentação da água ligada ao filme, a qual pode provocar a deformação/encolhimento da matriz polimérica dependendo da quantidade de água a ser evaporada.

4.4.1. Caracterização físico-química dos filmes após a lavagem

A lavagem dos filmes liofilizados teve como principal finalidade a retirada de quaisquer resquícios de solvente/não solvente e sais presentes no material. A análise dos espectros de FTIR foi utilizada para investigar potenciais diferenças estruturais entre os filmes de quitosana. Os espectros de FTIR das amostras após a lavagem podem ser visualizados na Figura 4-18.

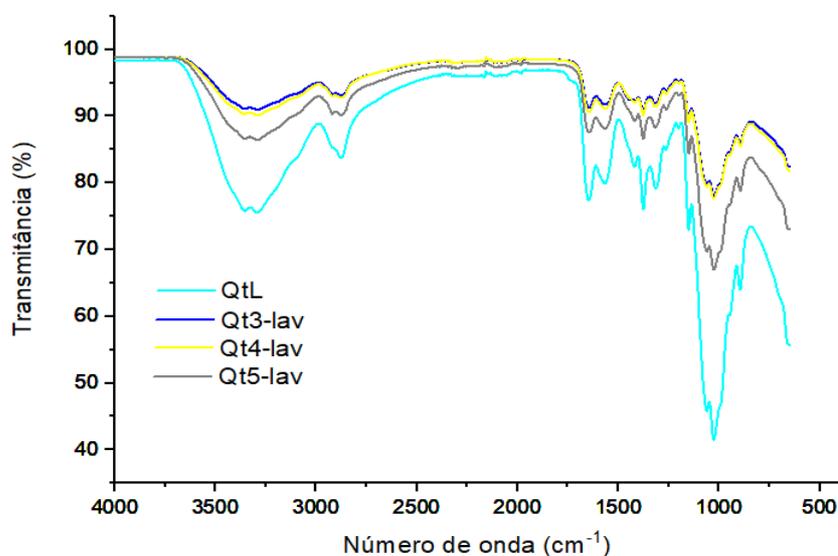


Figura 4-18 – Espectro de FTIR da amostra de quitosana QtL e dos filmes após a lavagem.

Os espectros exibiram os picos de absorção característicos da quitosana sem diferenças significativas. Quando comparados aos filmes não lavados (Figura 4-13) é possível observar a ausência dos picos referentes às bandas do ácido e do sal, demonstrando que o objetivo de remoção desses compostos foi atingido.

4.4.2. Grau de cristalinidade (Cr %) dos filmes após a lavagem

Os padrões de difração de raios X de todos os filmes foram semelhantes aos dos filmes sem a lavagem, apresentando estrutura amorfa, com picos de difração alargados e localizados em $2\theta = 16^\circ$ e 29° . Estes picos de difração são relatados para filmes de quitosana preparados com o solvente ácido acético e em filmes tratados com NaOH, assim como também podem ser detectados em *scaffolds* de quitosana (BALAU *et al.*, 2004; FACCHINATTO *et al.*, 2020; JANA *et al.*, 2012; LECETA *et al.*, 2013; NUNTHANID *et al.*, 2001; QIAO *et al.*, 2021; SINHA *et al.*, 2013; TAKARA; MARCHESE; OCHOA, 2015).

4.4.3. Análise da estabilidade térmica dos filmes após a lavagem

Conforme mostrado na Figura 4-19, os termogramas de todos os filmes de quitosana pós lavados exibiram picos semelhantes aos exibidos para a quitosana em pó. A primeira etapa de degradação entre 30 e 155 °C é atribuída à perda de água e a segunda etapa entre 207 e 390 °C, à decomposição da cadeia principal do polímero.

Observa-se que a lavagem dos filmes promoveu a remoção dos resíduos do ácido e da base, uma vez que os termogramas dos filmes se assemelham ao termograma da quitosana. Além disso, é possível observar um leve decréscimo no percentual de resíduo dos filmes em comparação à quitosana QtL e também aos filmes sem a etapa de lavagem.

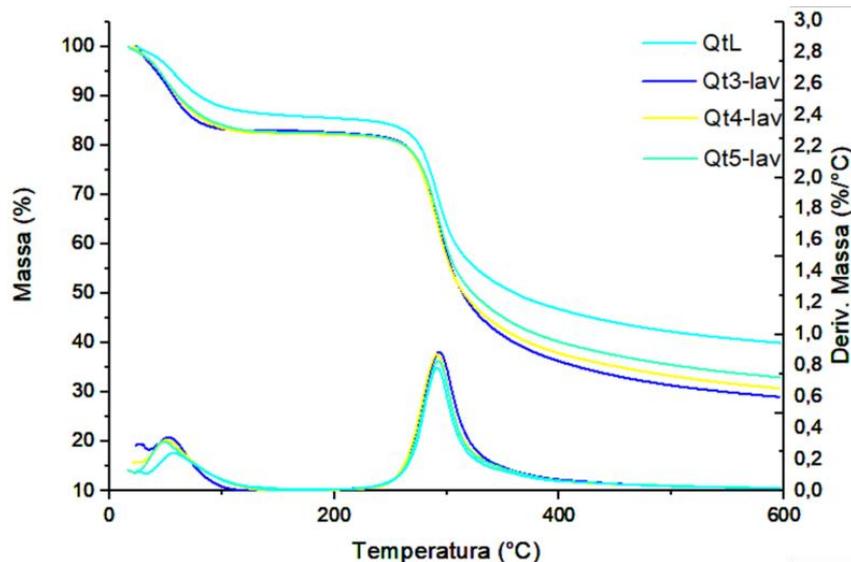


Figura 4-19 – Curvas de análise térmica (TGA) da amostra de quitosana QtL e dos filmes pós-lavados de diferentes concentrações.

4.4.4. Morfologia dos filmes após a lavagem

As micrografias de todos os filmes de quitosana após o processo de lavagem apresentaram a mesma estrutura (Apêndice A), conforme mostrado na Figura 4-20, correspondente ao filme Qt5-lav. Através da análise Figura 4-20(a) observa-se uma superfície mais homogênea, comparada à superfície do filme sem a lavagem, e ausência de poros, também verificada na seção transversal (Figura 4-20(b)). A densificação da estrutura pode ter ocorrido devido à etapa de secagem lenta em estufa, que promove a densificação dos filmes (TAKARA; MARCHESE; OCHOA, 2015).

Outra etapa determinante do processo de pós lavagem é a sua capacidade de causar a ressolubilização parcial dos filmes em sua forma de acetato de quitosana em contato com a água, resultando no fechamento dos poros que foram gerados durante a liofilização.

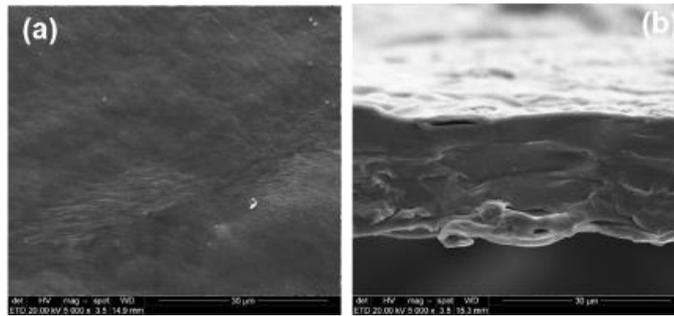


Figura 4-20 – Imagens de MEV do filme de quitosana 5 % (m/m) Qt5-lav com magnitude de 5000x: (a) superfície (b) seção transversal.

4.5. Caracterização dos filmes com etapa de neutralização

A morfologia assimétrica dos filmes é um dos requisitos essenciais para que o filme seja capaz de fazer a troca de gases e fluidos com o ambiente e proteger uma ferida de agentes nocivos. Neste contexto, sabendo que a etapa de liofilização é a principal causadora da formação de poros lamelares (ALIRAMAJI; ZAMANIAN; MOZAFARI, 2017), foi proposta uma alteração na metodologia, adicionando a etapa de lavagem dos filmes antes do processo de liofilização. Essa modificação visa manter as características físicas e químicas melhoradas do filme e manutenção da estrutura porosa. Para esta metodologia foram testadas duas concentrações de quitosana, 5 e 6 % (m/m). Uma maior concentração de quitosana foi testada para se obter filmes mais íntegros após a etapa de neutralização.

Os filmes neutralizados podem ser visualizados na Figura 4-21. O filme composto por 5 % m/m de quitosana foi lavado com auxílio de pisseta com água destilada. Já o filme a 6 % m/m de quitosana foi imerso em banho de água destilada durante 8 horas. A adição de uma etapa de neutralização antes do processo de secagem por liofilização parece ter conferido uma aparência plastificada aos filmes, provavelmente devido à secagem preferencial das camadas superficiais e maior quantidade de água no filme. Além disso, os filmes apresentaram áreas densificadas nas suas extremidades, essa característica possivelmente é devido à parcial ressolubilização dos filmes em sua forma de acetato de quitosana, promovida pelo contato com o banho de água e/ou pela evaporação parcial do solvente.

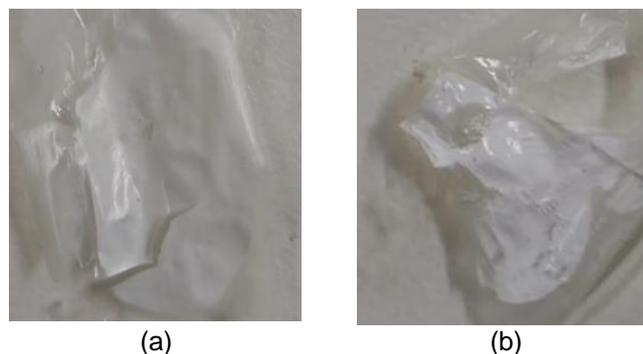


Figura 4-21 – Filmes de quitosana: (a) 5 % (m/m), lavado com água; (b) 6 % (m/m), imerso em banho de água destilada por 8 horas.

Os filmes neutralizados apresentaram superfície irregular e maior encolhimento foi observado para o filme com maior concentração de quitosana. O filme com 6 % (m/m) ficou imerso em água durante 8 horas e, portanto, apresenta maior quantidade de água, que pode ter favorecido o encolhimento da matriz durante o processo de liofilização.

4.5.1. Análise da composição química dos filmes com etapa de neutralização

Análises de FTIR foram realizadas com o intuito de verificar as mudanças estruturais dos filmes de quitosana que passaram pela etapa de neutralização. Conforme observado na Figura 4-22, o procedimento de submeter os filmes a um banho de neutralização antes do processo de liofilização, promoveu a retirada do excesso de solvente e do não solvente dos filmes, uma vez que o espectro do filme Qt6-N se assemelha ao espectro da quitosana QtL. A lavagem do filme com água, sem imersão (Qt5-N), não foi suficiente para a total retirada do NaOH (704 cm^{-1}), do ácido acético (866 cm^{-1}) e do sal de acetato de sódio (1431 cm^{-1}) formado pela reação do ácido com a base.

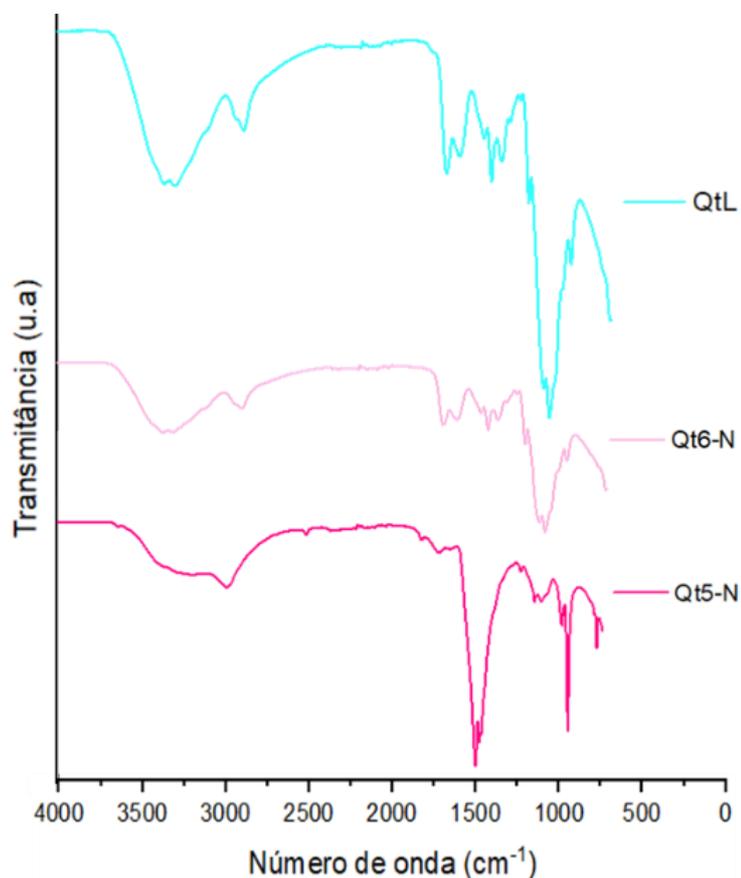


Figura 4-22 – Espectro de FTIR da amostra de quitosana QtL e dos filmes neutralizados: Qt5-N, lavado com água; Qt6-N imerso em banho de água destilada por 8 horas.

Como observado na Figura 4-23, o espectro do filme Qt5-N é muito semelhante ao dos filmes não neutralizados de quitosana (Figura 4-13). Em 1582 cm^{-1} observa-se a diminuição da banda referente à protonação dos grupos amina, possivelmente devido à sobreposição de bandas causada pelo excesso de NaOH no filme.

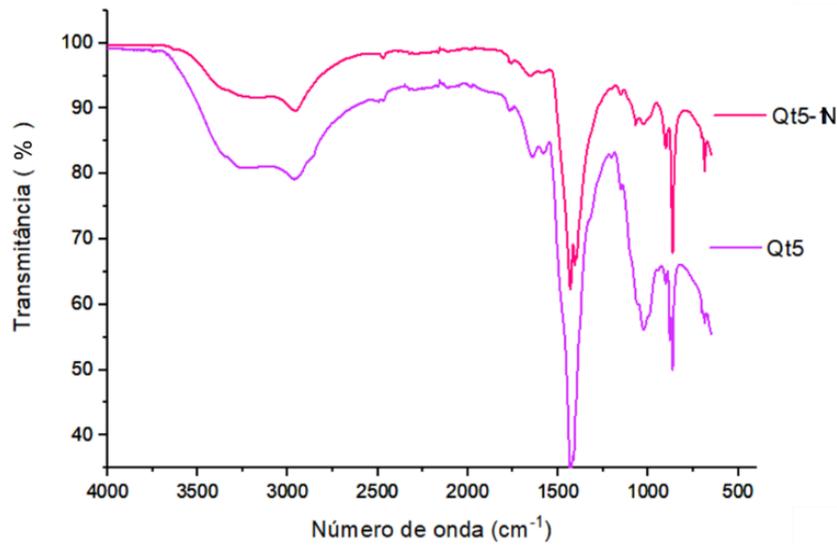


Figura 4-23 – Espectro de FTIR dos filmes 5 % (m/m) de quitosana com diferentes metodologias de obtenção: filme sem pré-tratamento Qt5 e filme lavado com água antes da liofilização.

4.5.2. Grau de cristalinidade (Cr %) dos filmes com etapa de neutralização

O padrão de difração de raios X dos filmes confirma a estrutura amorfa do material, independente da metodologia de preparo, como pode ser observado pelo difratograma do filme Qt6-N na Figura 4-24. O padrão de difração apresenta o mesmo comportamento para os filmes não lavados (Figura 4-14), indicando que as etapas de lavagem dos filmes não afetam as propriedades estruturais dos filmes de quitosana (TAKARA; MARCHESI; OCHOA, 2015).

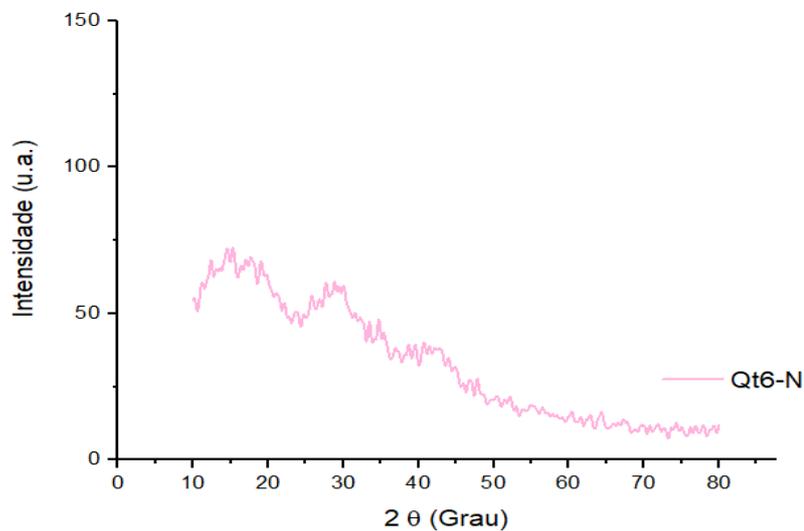


Figura 4-24 – Padrão de DRX para o filme de quitosana Qt6-N.

4.5.3. Análise da estabilidade térmica dos filmes com etapa de neutralização

Os termogramas dos filmes com etapa de neutralização podem ser observados na Figura 4-25. A estabilidade térmica do filme que foi imerso em água destilada (Qt6-N) é semelhante à da quitosana QtL, evidenciando que a remoção do excesso dos resíduos foi efetiva. Ao compararmos os picos do filme Qt5-N com os de quitosana, observam-se duas etapas na perda da umidade, provavelmente devido à saída de água e, na sequência, a remoção do resíduo de solução ácida. Nota-se também a influência dos resíduos no filme no processo de degradação térmica da ligação glicosídea, responsável pela máxima degradação da quitosana. Se comparado aos filmes sem a etapa de neutralização, Figura 4-15, observa-se que quanto maior a presença dos resíduos, menor é a estabilidade térmica dos filmes de quitosana, evidenciando que o ácido, a base e os sais formados durante a formação dos filmes aceleram a sua degradação térmica.

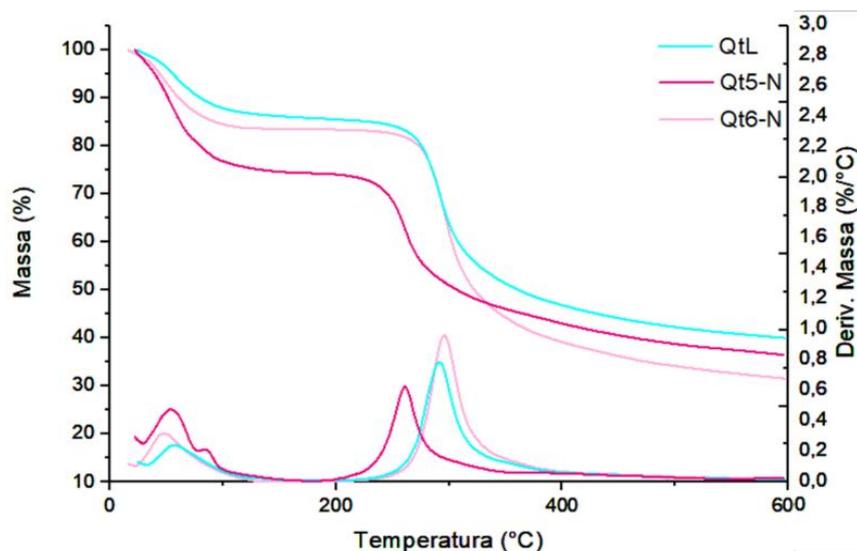


Figura 4-25 – Curvas de análise térmica (TGA) da amostra de quitosana QtL e dos filmes pós lavados de diferentes concentrações.

Os resultados corroboram o fato de que a lavagem é um fator crucial para obtenção de filmes mais resistentes, e que o método de lavagem influi na estabilidade dos filmes obtidos.

4.5.4. Morfologia dos filmes com etapa de neutralização

Os filmes com etapa de neutralização apresentaram morfologias semelhantes entre si, como demonstra a Figura 4-26. Pode ser observada uma morfologia assimétrica com uma fina camada de topo densa e estrutura lamelar, resultado semelhante ao obtido para os filmes sem a etapa de lavagem ou neutralização. Cabe lembrar, que esta estrutura é desejada para ser utilizada em curativos, pois é capaz de absorver os exsudatos pela presença de poros na superfície inferior, e evitar a entrada de microrganismos patogênicos por ter superfície superior mais fechada. Diferentemente dos filmes não lavados ou imersos em água destilada, os filmes Qt5-N e Qt6-N não apresentaram sal aderido na superfície e mantiveram a estrutura porosa lamelar na seção transversal. O filme Qt5-N apresentou superfície rugosa e heterogênea, promovida durante o processo de secagem por liofilização, principalmente se a composição da solução aquosa aderida à superfície não for homogênea. Na magnitude avaliada não são observados poros na superfície de ambos os filmes.

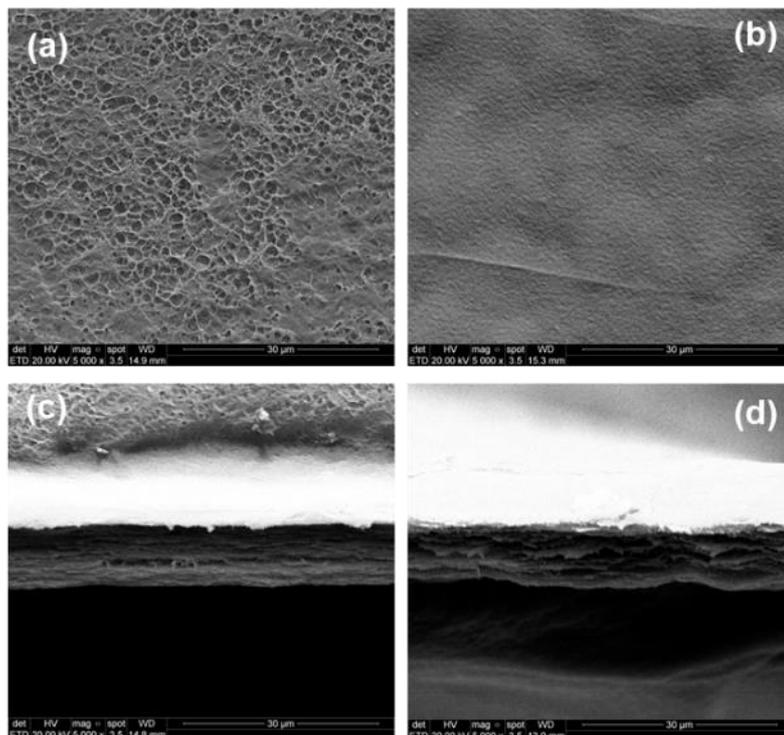


Figura 4-26 – Imagens de MEV dos filmes de quitosana com neutralização com magnitude de 5000x: (a) superfície Qt5-N (b) superfície Qt6-N (c) seção transversal Qt5-N (d) seção transversal Qt6-N.

A partir das imagens da seção transversal observa-se que a distância entre os poros lamelares para o filme Qt6-N é consideravelmente maior. Esta estrutura é

formada principalmente pelo processo de secagem por liofilização, que além de manter a morfologia porosa resultante do método de inversão de fases (precipitação por imersão), controla a saída do solvente por sublimação, fixando a geometria e o tamanho dos poros. Como o filme Qt6-N foi imerso em água por 8 horas, além de apresentar maior quantidade de água em sua estrutura, houve a saída do excesso de reagentes e remoção dos resíduos, o que pode ter ocasionado maior espaçamento entre as lamelas. Se comparado aos filmes sem a etapa de neutralização (Figura 4-16), pode-se perceber a formação de uma estrutura mais ordenada (HABERT; BORGES; NOBREGA, 2006; REUVERS; VAN DEN BERG; SMOLDERS, 1987), evidenciando o fato de que a presença de solvente/não solvente e sais durante a liofilização dos filmes pode ter influenciado no processo de formação de poros, afetando o tamanho e a geometria dos mesmos (ALIRAMAJI; ZAMANIAN; MOZAFARI, 2017).

5. CONCLUSÃO E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Esta seção se destina às conclusões decorrentes dos estudos realizados neste trabalho e algumas sugestões para trabalhos futuros.

5.1. Conclusão

Filmes assimétricos de quitosana utilizando a técnica de inversão de fases induzida por não solvente, para o sistema quitosana/ácido acético/hidróxido de sódio, foram produzidos com sucesso.

A etapa de purificação foi de grande importância para a solubilização total da quitosana. Através da caracterização da estrutura química, da estabilidade térmica e do grau de desacetilação da quitosana purificada, foi possível definir que a metodologia utilizando a secagem por liofilização foi a mais adequada.

O estudo do comportamento termodinâmico do sistema quitosana/solução de ácido acético/solução de hidróxido de sódio foi realizado pelo método titulométrico. Foi obtido o diagrama de fases ternário através das curvas de ponto de nuvem em duas temperaturas, demonstrando o aumento da distância entre o eixo polímero/solvente e a região de duas fases com o aumento da temperatura. Assim, foi possível determinar as condições experimentais mais adequadas para a formação de filmes assimétricos pela técnica de precipitação por imersão.

As características físico-químicas e morfologia dos filmes obtidos dependem fortemente da presença residual do ácido acético, do hidróxido de sódio e do acetato de sódio na sua estrutura. Os filmes obtidos sem as etapas de lavagem e banho de imersão em água apresentaram resíduos que afetaram as suas propriedades térmicas. A resistência mecânica aumentou com a concentração polimérica do filme estando em concordância com os valores para filmes porosos de quitosana encontrados na literatura. O grau de inchamento também apresentou esse comportamento frente ao aumento de concentração de quitosana, ficando abaixo dos valores encontrados para filmes de quitosana preparados por outros métodos. Este comportamento é desejado, pois filmes que apresentam grau de inchamento muito

elevado, podem perder a sua integridade física durante o contato com ambientes muito úmidos, como é o caso de algumas aplicações médicas.

O aumento da concentração do polímero de 3 para 5 % m/m favoreceu a formação de poros lamelares mais estreitos, possivelmente devido ao aumento de viscosidade da solução polimérica, dificultando a transferência de massa entre o solvente e o não solvente durante a etapa de formação do filme.

A etapa de pós lavagem dos filmes liofilizados e posterior secagem em estufa de convecção, com o objetivo de retirar o excesso de solvente e não solvente e remover o sal formado, alterou significativamente a morfologia dos filmes, que passou de porosa assimétrica para densa simétrica, tornando os filmes inadequados aos objetivos do presente trabalho. O processo de secagem dos filmes por liofilização se mostra essencial para a manutenção da estrutura porosa assimétrica dos filmes e a etapa de retirada de excesso de reagentes e produtos deve ser realizada anteriormente.

Os filmes imersos em água, Qt6-N, apresentaram características térmicas e físico-químicas semelhantes às da quitosana purificada QtL, evidenciando a necessidade desta etapa de neutralização antes do processo de liofilização. A morfologia dos filmes traz uma estrutura assimétrica lamelar com fina camada densa de topo, e com ausência de sais aderidos a sua superfície.

Sendo assim, neste trabalho foi possível definir uma metodologia para a obtenção de filmes porosos assimétricos de quitosana, adicionando uma etapa de imersão em água após o processo de formação dos filmes para a retirada do solvente e não solvente em excesso e remoção dos sais que são formados. Os filmes assimétricos obtidos apresentam camada de topo mais fechada, importante para evitar a entrada de microrganismos patogênicos, e seção transversal contendo poros de estrutura lamelar, importantes para absorver exsudatos e manter a umidade da pele. Estas características são essenciais para filmes a serem utilizados em aplicações biomédicas.

5.2. Sugestões para trabalhos futuros

Com base nos resultados obtidos foram sugeridos alguns estudos futuros:

- estudo sistemático da influência da concentração do polímero e do tempo de banho de imersão em água, na etapa de neutralização dos filmes, antes do processo de secagem por liofilização;
- estudo da influência da utilização de diferentes soluções ácidas na formação dos filmes e de suas propriedades;
- caracterização dos filmes quanto às propriedades antimicrobianas, adesividade, irritabilidade e citotóxicas.

6. REFERÊNCIAS

- ABD EL-HACK, M. E. *et al.* Antimicrobial and antioxidant properties of chitosan and its derivatives and their applications: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 164, n. 1, p. 2726–2744, 2020.
- AFONSO, C. **Termodinâmica para Engenharia**. 2. ed. Porto, Portugal: Engebook, 2012.
- ALBANNA, M. Z. *et al.* Improving the mechanical properties of chitosan-based heart valve scaffolds using chitosan fibers. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, v. 5, n. 1, p. 171–180, 2012.
- ALIRAMAJI, S.; ZAMANIAN, A.; MOZAFARI, M. Super-paramagnetic responsive silk fibroin/chitosan/magnetite scaffolds with tunable pore structures for bone tissue engineering applications. **Materials Science and Engineering: C**, v. 70, p. 736–744, 2017.
- ALTIOK, D.; ALTIOK, E.; TIHMINGLIOGLU, F. Physical, antibacterial and antioxidant properties of chitosan films incorporated with thyme oil for potential wound healing applications. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 21, n. 7, p. 2227–2236, 2010.
- AMBAYE, T. G. *et al.* Preparation and applications of chitosan and cellulose composite materials. **Journal of Environmental Management**, v. 301, n. 1, p. 113850, 2022.
- ARANAZ, I. *et al.* Functional Characterization of Chitin and Chitosan. **Current Chemical Biology**, v. 3, n. 2, p. 203–230, 2012.
- AROON, M. A. *et al.* Morphology and permeation properties of polysulfone membranes for gas separation: Effects of non-solvent additives and co-solvent. **Separation and Purification Technology**, v. 72, n. 2, p. 194–202, 2010.
- ARSHAD, M.; ZUBAIR, M.; ULLAH, A. Miscibility, properties, and biodegradability of chitin and chitosan. *In*: GOPI, S.; THOMAS, S.; PIUS, A. (org.). **Handbook of Chitin and Chitosan: Volume 1: Preparation and Properties**. 1. ed. Kerala, India: Elsevier, 2020. p. 377–399.
- ASPINALL, G. O. **Polysaccharides II Nature, Occurrence and Classification of Polysaccharides**. 1. ed. Brno, Tchêquia: Pergamon, 1970.
- ATKIN, L.; STEPHENSON, J.; BATEMAN, S. D. Foam dressings: A review of the literature and evaluation of fluid-handling capacity of four leading foam dressings. **Wounds UK**, Queensgate, Huddersfield HD1 3DH, UK, v. 11, n. 1, p. 1–8, 2015.
- BAKERI, G. *et al.* Analysis of Polyetherimide/N-Methyl-2-Pyrrolidone/nonsolvent phase separation behavior. **Journal of Polymer Research**, v. 21, n. 386, 2014.
- BALAU, L. *et al.* Physico-chemical properties of Chitosan films. **Central European Journal of Chemistry**, v. 2, n. 4, p. 638–647, 2004.

BASTIAENS, L. *et al.* Sources of Chitin and Chitosan and their Isolation. *In*: BROEK, L. A. M. van den; BOERIU, C. G. (org.). **Chitin and Chitosan**. 1. ed. Wageningen, Holanda: Wiley, 2019. p. 1–34.

BAXTER, A. *et al.* Improved method for i.r. determination of the degree of N-acetylation of chitosan. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 14, n. 3, p. 166–169, 1992.

BECKINGHAM, B. S.; LYND, N. A.; MILLER, D. J. Monitoring multicomponent transport using in situ ATR FTIR spectroscopy. **Journal of Membrane Science**, v. 550, p. 348–356, 2018.

BINDAL, R. C.; HANRA, M. S.; MISRA, B. M. Novel solvent exchange cum immersion precipitation technique for the preparation of asymmetric polymeric membrane. **Journal of Membrane Science**, v. 118, n. 1, p. 23–29, 1996.

BOOM, R. M. *et al.* Linearized cloudpoint curve correlation for ternary systems consisting of one polymer, one solvent and one non-solvent. **Polymer**, v. 34, n. 11, p. 2348–2356, 1993.

BRAGA, W. B. **Desenvolvimento de Membranas Anisotrópicas Compostas de Poliuretano/Poli(éter sulfona) para Recuperação de Hidrocarbonetos Voláteis**. 2011. 135 f. - UFRJ, 2011.

BRANCA, C. *et al.* Role of the OH and NH vibrational groups in polysaccharide-nanocomposite interactions: A FTIR-ATR study on chitosan and chitosan/clay films. **Polymer**, v. 99, p. 614–622, 2016.

BROENS, L. *et al.* Asymmetric membrane structures as a result of phase separation phenomena. **Desalination**, v. 32, n. 1, p. 33–45, 1980.

BULTE, A. M. W. *et al.* Equilibrium thermodynamics of the ternary membrane-forming system nylon, formic acid and water. **Polymer**, v. 37, n. 9, p. 1647–1655, 1996.

BYUN, S. M. *et al.* Comparison of physicochemical, binding, antioxidant and antibacterial properties of chitosans prepared from ground and entire crab leg shells. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 48, n. 1, p. 136–142, 2013.

CADORE, Í. R. **Preparação de membranas de poli(tereftalato de etileno) (PET) pela técnica de inversão de fases**. 2019. 130 f. - UFRGS, 2019.

CHEN, F. *et al.* Unusual effects of monocarboxylic acids on the structure and on the transport and mechanical properties of chitosan films. **Carbohydrate Polymers**, v. 132, n. 1, p. 419–429, 2015.

CHENG, L. P. Effect of Temperature on the Formation of Microporous PVDF Membranes by Precipitation from 1-Octanol/DMF/PVDF and Water/DMF/PVDF Systems. **Macromolecules**, v. 32, n. 20, p. 6668–6674, 1999.

CHERPANOV, I. S.; BOTALOVA, O. O. Lactones formation during monosaccharide's caramelization in ethanolic-aqueous solutions. **AIP Conference Proceedings**, v. 2280, n. 1, p. 050016, 2020.

CHHABRA, P. *et al.* Optimization, characterization, and efficacy evaluation of 2% chitosan scaffold for tissue engineering and wound healing. **Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences**, v. 8, n. 4, p. 300, 2016.

CHIAULA, V. *et al.* Glycerol-silicone adhesives with excellent fluid handling and mechanical properties for advanced wound care applications. **International Journal of Adhesion and Adhesives**, v. 102, n. 1, p. 102667, 2020.

CHIU, H. T. *et al.* A Study on the Effects of the Degree of Deacetylation of Chitosan Films on Physical and Antibacterial Properties. <https://doi.org/10.1080/03602550600916209>, v. 46, n. 12, p. 1121–1127, 2007.

CHO, Y. W. *et al.* Preparation and solubility in acid and water of partially deacetylated chitins. **Biomacromolecules**, v. 1, n. 4, p. 609–614, 2000.

CHUNG, Y. C.; CHEN, C. Y. Antibacterial characteristics and activity of acid-soluble chitosan. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 8, p. 2806–2814, 2008.

COURY, C.; DILLNER, A. M. A method to quantify organic functional groups and inorganic compounds in ambient aerosols using attenuated total reflectance FTIR spectroscopy and multivariate chemometric techniques. **Atmospheric Environment**, v. 42, n. 23, p. 5923–5932, 2008.

CRINI, G.; LICHTFOUSE, E. **Sustainable Agriculture Reviews 35**. 1st ed. 20ed. Besançon, France: Springer, 2019. v. 35

DAHMANE, E. M. *et al.* Extraction and Characterization of Chitin and Chitosan from *Parapanaeus longirostris* from Moroccan Local Sources. **International Journal of Polymer Analysis and Characterization**, v. 19, n. 4, p. 342–351, 2014.

DANNER, R. P.; HIGH, M. S. **Fundamentals of Polymer Solution Thermodynamics**. 1. ed. New York, USA: Department of chemical engineering, 1993. v. 1

DE ALVARENGA, E. S.; PEREIRA DE OLIVEIRA, C.; ROBERTO BELLATO, C. An approach to understanding the deacetylation degree of chitosan. **Carbohydrate Polymers**, v. 80, n. 4, p. 1155–1160, 2010.

DEBONE, H. S. *et al.* Chitosan/Copaiba oleoresin films for wound dressing application. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 555, n. 1, p. 146–152, 2019.

DENG, Y. *et al.* Enhancing the solubility of α -chitin in NaOH/urea aqueous solution by synergistic pretreatment of mechanical activation and metal salt. **Journal of Molecular Liquids**, v. 339, n. 1, p. 116756, 2021.

DI LUCCIO, M.; NOBREGA, R.; BORGES, C. P. Microporous anisotropic phase inversion membranes from bisphenol-A polycarbonate: study of a ternary system. **Polymer**, v. 41, n. 11, p. 4309–4315, 2000.

DIMIAN, A. C.; A.KISS, C. S.; BILDEA, A. Acetic acid. *In*: DIMIAN, A. C.; BILDEA, C. S.; KISS, A. A. (org.). **Applications in Design and Simulation of Sustainable Chemical**

Processes. 1. ed. Bucureste, Romênia: Elsevier, 2019. v. 74, p. 483–519.

DOMARD, A. A perspective on 30 years research on chitin and chitosan. **Carbohydrate Polymers**, v. 84, n. 2, p. 696–703, 2011.

DOMSZY, J. G.; ROBERTS, G. A. F. Evaluation of infrared spectroscopic techniques for analysing chitosan. **Die Makromolekulare Chemie**, v. 186, n. 8, p. 1671–1677, 1985.

DONG, Y. *et al.* Influence of degree of deacetylation on critical concentration of chitosan/dichloroacetic acid liquid-crystalline solution. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 83, n. 6, p. 1204–1208, 2002.

DOS SANTOS, Z. M. *et al.* Determination of deacetylation degree of chitosan: a comparison between conductometric titration and CHN elemental analysis. **Carbohydrate Research**, v. 344, n. 18, p. 2591–2595, 2009.

DRESVYANINA, E. N. *et al.* Thermal Properties of Salt and Base Forms of Chitosan. **Polymer Science - Series A**, v. 60, n. 2, p. 179–183, 2018.

DUARTE, M. L. *et al.* An optimised method to determine the degree of acetylation of chitin and chitosan by FTIR spectroscopy. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 31, n. 1–3, p. 1–8, 2002.

DUARTE, J. **Análise Termodinâmica do Sistema Ternário Água/PA66/HCl**. 2013. 134 f. - UCS, 2013.

EL-HEFIAN, E. A. *et al.* Characterization of chitosan in acetic acid: Rheological and thermal studies. **Turkish Journal of Chemistry**, v. 34, n. 1, p. 47–56, 2010.

EL KNIDRI, H. *et al.* Extraction, chemical modification and characterization of chitin and chitosan. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 120, n. 1, p. 1181–1189, 2018.

EL KNIDRI, H. *et al.* Rapid and efficient extraction of chitin and chitosan for scale-up production: Effect of process parameters on deacetylation degree and molecular weight. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 139, n. 1, p. 1092–1102, 2019.

EL KNIDRI, H.; LAAJEB, A.; LAHSINI, A. Chitin and chitosan: chemistry, solubility, fiber formation, and their potential applications. *In*: GOPI, S.; THOMAS, S.; PIUS, A. (org.). **Handbook of Chitin and Chitosan: Volume 1: Preparation and Properties**. 1. ed. Kerala, India: Elsevier, 2020. v. 1, p. 35–57.

FACCHINATTO, W. M. *et al.* Evaluation of chitosan crystallinity: A high-resolution solid-state NMR spectroscopy approach. **Carbohydrate Polymers**, v. 250, n. 1, p. 116891, 2020.

FEI LIU, X. *et al.* Antibacterial Action of Chitosan and Carboxymethylated Chitosan. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 79, n. 7, p. 1324–1335, 2000.

FELTON, L. A. Mechanisms of polymeric film formation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 457, n. 2, p. 423–427, 2013.

FERNANDEZ-SAIZ, P.; OCIO, M. J.; LAGARON, J. M. Film-forming process and biocide

assessment of high-molecular-weight chitosan as determined by combined ATR-FTIR spectroscopy and antimicrobial assays. **Biopolymers**, v. 83, n. 6, p. 577–583, 2006.

FERREIRA, R. S. B. *et al.* Coagulation bath in the production of membranes of nanocomposites polyamide 6/Clay. *In:* , 2017. **Materials Research**. 2017.

FOSTER, L. J. R. *et al.* Chitosan as a Biomaterial: Influence of Degree of Deacetylation on Its Physiochemical, Material and Biological Properties. **PLOS ONE**, v. 10, n. 8, p. e0135153, 2015.

GENEVRO, G. M. *et al.* Glucomannan asymmetric membranes for wound dressing. **Journal of Materials Research**, v. 34, n. 4, p. 481–489, 2019.

GHASEMI, A.; ASGARPOUR KHANSARY, M.; AROON, M. A. A comparative theoretical and experimental study on liquid-liquid equilibria of membrane forming polymeric solutions. **Fluid Phase Equilibria**, v. 435, n. 1, p. 60–72, 2017.

GOY, R. C.; DE BRITTO, D.; ASSIS, O. B. G. A review of the antimicrobial activity of chitosan. **Polímeros**, v. 19, n. 3, p. 241–247, 2009.

GUILLEN, G. R. *et al.* Direct microscopic observation of membrane formation by nonsolvent induced phase separation. **Journal of Membrane Science**, v. 431, p. 212–220, 2013.

HABERT, A.; BORGES, C.; NOBREGA, R. **Processos de Separação por Membranas**. 1. ed. Rio de Janeiro, Brasil: E-papers Serviços Editoriais Ltda., 2006., 2006.

HAJJI, S. *et al.* Structural differences between chitin and chitosan extracted from three different marine sources. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 65, n. 1, p. 298–306, 2014.

HAMEDI, H. *et al.* Chitosan based bioadhesives for biomedical applications: A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 282, n. 1, p. 119100, 2022.

HILLERT, M. **Phase Equilibria, Phase Diagrams and Phase Transformations: Their Thermodynamics**. 2. ed. Cambridge, Reino Unido: Cambridge University Press, 2007. v. 1

HISHAM, F. *et al.* Facile extraction of chitin and chitosan from shrimp shell. **Materials Today: Proceedings**, v. 42, n. 5, p. 2369–2373, 2021.

HONG, H.; WEI, J.; LIU, C. Development of asymmetric gradational-changed porous chitosan membrane for guided periodontal tissue regeneration. **Composites Part B: Engineering**, v. 38, n. 3, p. 311–316, 2007.

IOELOVICH, M. Crystallinity and Hydrophilicity of Chitin and Chitosan. **Research and Reviews: Journal of Chemistry**, v. 3, n. 3, p. 7–14, 2014.

ISLAM, S.; BHUIYAN, M. A. R.; ISLAM, M. N. Chitin and Chitosan: Structure, Properties and Applications in Biomedical Engineering. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 25, n. 3, p. 854–866, 2017.

JANA, S. *et al.* High-strength pristine porous chitosan scaffolds for tissue engineering. **Journal of Materials Chemistry**, v. 22, n. 13, p. 6291–6299, 2012.

-
- JIANG, Z. *et al.* Construction of chitosan scaffolds with controllable microchannel for tissue engineering and regenerative medicine. **Materials Science and Engineering: C**, v. 126, n. 1, p. 112178, 2021.
- KAMALI, M. *et al.* Sustainability considerations in membrane-based technologies for industrial effluents treatment. **Chemical Engineering Journal**, v. 368, n. 1, p. 474–494, 2019.
- KARAKEÇILI, A. *et al.* Metal-organic frameworks for on-demand pH controlled delivery of vancomycin from chitosan scaffolds. **Materials Science and Engineering: C**, v. 105, p. 110098, 2019.
- KARIMI, M. *et al.* Determination of water/polymer interaction parameter for membrane-forming systems by sorption measurement and a fitting technique. **Journal of Membrane Science**, v. 265, n. 1–2, p. 1–12, 2005.
- KARTIK, A. *et al.* A critical review on production of biopolymers from algae biomass and their applications. **Bioresource Technology**, v. 329, n. 1, p. 124868, 2021.
- KASAAI, M. R. A review of several reported procedures to determine the degree of N-acetylation for chitin and chitosan using infrared spectroscopy. **Carbohydrate Polymers**, v. 71, n. 4, p. 497–508, 2008.
- KASAAI, M. R. Various methods for determination of the degree of N-acetylation of chitin and chitosan: A review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 5, p. 1667–1676, 2009.
- KAVYA, K. C. *et al.* Fabrication and characterization of chitosan/gelatin/nSiO₂ composite scaffold for bone tissue engineering. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 59, p. 255–263, 2013.
- KHAYROVA, A.; LOPATIN, S.; VARLAMOV, V. Obtaining chitin, chitosan and their melanin complexes from insects. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 167, n. 1, p. 1319–1328, 2021.
- KIM, I. W. *et al.* Effect of evaporation on surface morphology of epitaxial ZnO films during postdeposition annealing. **Applied Surface Science**, v. 241, n. 1–2, p. 179–182, 2005.
- KITTUR, F. S.; KUMAR, K. R.; THARANATHAN, R. N. Functional packaging properties of chitosan films. **Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung A** 1998 206:1, v. 206, n. 1, p. 44–47, 1998.
- KONG, M. *et al.* Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 144, n. 1, p. 51–63, 2010.
- KONINGSVELD, R.; STAVERMAN, A. J. Liquid–liquid phase separation in multicomponent polymer solutions. III. Cloud-point curves. **Journal of Polymer Science Part A-2: Polymer Physics**, v. 6, n. 2, p. 349–366, 1968.
- KOSMA, V. A.; BELTSIOS, K. G. Macrovoids in solution-cast membranes: Direct probing of systems exhibiting horizontal macrovoid growth. **Journal of Membrane Science**, v. 407–408,

p. 93–107, 2012.

KOU, S. (Gabriel); PETERS, L.; MUCALO, M. Chitosan: A review of molecular structure, bioactivities and interactions with the human body and micro-organisms. **Carbohydrate Polymers**, v. 282, n. 1, p. 119132, 2022.

KOU, S. (Gabriel); PETERS, L. M.; MUCALO, M. R. Chitosan: A review of sources and preparation methods. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 169, n. 1, p. 85–94, 2021.

KUCHARSKA, M. *et al.* Antimicrobial Properties of Chitin and Chitosan. *In*: BROEK, L. A. M. van den; BOERIU, C. G. (org.). **Chitin and Chitosan**. 1. ed. Hoboken, Nova Jersey, EUA: Wiley, 2019. p. 169–187.

KUMARI, S.; KISHOR, R. Chitin and chitosan: origin, properties, and applications. *In*: GOPI, S.; THOMAS, S.; PIUS, A. (org.). **Handbook of Chitin and Chitosan: Volume 1: Preparation and Properties**. 1. ed. Kerala, India: Elsevier, 2020. p. 1–33.

KURADA, K. V.; DE, S. Modeling of solution thermodynamics: A method for tuning the properties of blend polymeric membranes. **Journal of Membrane Science**, v. 540, n. June, p. 485–495, 2017.

LECETA, I. *et al.* Characterization and antimicrobial analysis of chitosan-based films. **Journal of Food Engineering**, v. 116, n. 4, p. 889–899, 2013.

LEVENGOD, S. K. L.; ZHANG, M. Chitosan-based scaffolds for bone tissue engineering. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 2, n. 21, p. 3161–3184, 2014.

LI, D. W. *et al.* Silk fibroin/chitosan scaffold with tunable properties and low inflammatory response assists the differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 105, n. 1, p. 584–597, 2017.

LI, J. F.; XU, Z. L.; YANG, H. Microporous polyethersulfone membranes prepared under the combined precipitation conditions with non-solvent additives. **Polymers for Advanced Technologies**, v. 19, n. 4, p. 251–257, 2008.

LI, J.; ZHUANG, S. Antibacterial activity of chitosan and its derivatives and their interaction mechanism with bacteria: Current state and perspectives. **European Polymer Journal**, v. 138, n. August, p. 109984, 2020.

LIM, C.; HWANG, D. S.; LEE, D. W. Intermolecular interactions of chitosan: Degree of acetylation and molecular weight. **Carbohydrate Polymers**, v. 259, n. February, p. 117782, 2021.

LOEB, S. LOEB-SOURIRAJAN MEMBRANE: HOW IT CAME ABOUT. **ACS Symposium Series**, v. 153, n. 1, p. 1–9, 1981.

LUCAS, E. F.; SOARES, B. G.; MONTEIRO, E. **Determinação de Peso Molecular e Análise Térmica**. 1. ed. Rio de Janeiro.: E-papers Serviços Editoriais Ltda., 2001.

LUKMAN HEKIEM, N. L. *et al.* Effect of chitosan dissolved in different acetic acid

concentration towards VOC sensing performance of quartz crystal microbalance overlay with chitosan. **Materials Letters**, v. 291, n. 1, p. 129524, 2021.

LUTZ, J. B. *et al.* A new in vivo test method to compare wound dressing fluid handling characteristics and wear time. **Ostomy Wound Management**, v. 57, n. 8, p. 28–36, 2011.

MANNELLA, G. A.; LA CARRUBBA, V.; BRUCATO, V. Measurement of cloud point temperature in polymer solutions. **Review of Scientific Instruments**, v. 84, n. 7, p. 075118, 2013.

MANSOURIZADEH, A.; ISMAIL, A. F. Influence of membrane morphology on characteristics of porous hydrophobic PVDF hollow fiber contactors for CO₂ stripping from water. **Desalination**, v. 287, p. 220–227, 2012.

MAO, J. S. *et al.* The properties of chitosan–gelatin membranes and scaffolds modified with hyaluronic acid by different methods. **Biomaterials**, v. 24, n. 9, p. 1621–1629, 2003.

MATZ, R. The structure of cellulose acetate membranes 1. The development of porous structures in anisotropic membranes. **Desalination**, v. 10, n. 1, p. 1–15, 1972.

MAZEAU, K.; WINTER, W. T.; CHANZY, H. Molecular and Crystal Structure of a High-Temperature Polymorph of Chitosan from Electron Diffraction Data. **Macromolecules**, v. 27, n. 26, p. 7606–7612, 1994.

MAZINANI, S. *et al.* Phase separation analysis of Extem/solvent/non-solvent systems and relation with membrane morphology. **Journal of Membrane Science**, v. 526, n. 1, p. 301–314, 2017.

MILLER-CHOU, B. A.; KOENIG, J. L. A review of polymer dissolution. **Progress in Polymer Science**, v. 28, n. 8, p. 1223–1270, 2003.

MOORE, G. K.; ROBERTS, G. A. F. Determination of the degree of N-acetylation of chitosan. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 2, n. 2, p. 1–3, 1980.

MOUSSOUT, H. *et al.* Kinetics and mechanism of the thermal degradation of biopolymers chitin and chitosan using thermogravimetric analysis. **Polymer Degradation and Stability**, v. 130, p. 1–9, 2016.

MULDER, M. **Basic Principles of Membrane Technology**. 2. ed. Netherland: Kluwer academic publishers, 1997-. ISSN 03767388.

MUXIKA, A. *et al.* Chitosan as a bioactive polymer: Processing, properties and applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 105, n. 1, p. 1358–1368, 2017.

NAITO, P. K. *et al.* Crystal transition from hydrated chitosan and chitosan/monocarboxylic acid complex to anhydrous chitosan investigated by X-ray diffraction. **Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics**, v. 53, n. 15, p. 1065–1069, 2015.

NASTI, A. *et al.* Chitosan/TPP and chitosan/TPP-hyaluronic acid nanoparticles: Systematic optimisation of the preparative process and preliminary biological evaluation. **Pharmaceutical Research**, v. 26, n. 8, p. 1918–1930, 2009.

NETO, C. G. T. *et al.* Thermal Analysis of Chitosan Based Networks. **Carbohydrate Polymers**, v. 62, n. 2, p. 97–103, 2005.

NIAOUNAKIS, M. **Definitions of Terms and Types of Biopolymers**. 1. ed. New York, USA: Elsevier, 2015.

NIAOUNAKIS, M. Introduction. *In*: ANDREW, W. (org.). **Biopolymers: Processing and Products**. 1. ed. New York, USA: William Andrew, 2015. p. 1–77.

NO, H. K. *et al.* Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights. **International Journal of Food Microbiology**, v. 74, n. 1–2, p. 65–72, 2002.

NUNTHANID, J. *et al.* Physical properties and molecular behavior of chitosan films. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 27, n. 2, p. 143–157, 2001.

OKUYAMA, K. *et al.* Molecular and crystal structure of hydrated chitosan. **Macromolecules**, v. 30, n. 19, p. 5849–5855, 1997.

OKUYAMA, K. *et al.* Structural diversity of chitosan and its complexes. **Carbohydrate Polymers**, v. 41, n. 3, p. 237–247, 2000.

OMURA, Y. *et al.* Antimicrobial Activity of Chitosan with Different Degrees of Acetylation and Molecular Weights. **Biocontrol Science**, v. 8, n. 1, p. 25–30, 2003.

ORYAN, A.; SAHVIEH, S. Effectiveness of chitosan scaffold in skin, bone and cartilage healing. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 104, n. 1, p. 1003–1011, 2017.

OSMAN, Z. Thermal and conductivity studies of chitosan acetate-based polymer electrolytes. **Ionics**, v. 11, n. 5–6, p. 397–401, 2005.

PARDO-CASTAÑO, C.; BOLAÑOS, G. Solubility of chitosan in aqueous acetic acid and pressurized carbon dioxide-water: Experimental equilibrium and solubilization kinetics. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 151, n. 1, p. 63–74, 2019.

PAVIA, D. *et al.* Introdução à espectroscopia. **Cengage Learning**, 2012.

PAVONI, J. M. F. **Desenvolvimento de filmes densos de quitosana para aplicações como membranas e embalagens**. 2018. 159 f. - UFRGS, 2018.

PENG, N.; CHUNG, T.-S.; WANG, K. Y. Macrovoid evolution and critical factors to form macrovoid-free hollow fiber membranes. **Hollow Fiber Membranes**, p. 141–161, 2021.

PILLAI, C. K. S.; PAUL, W.; SHARMA, C. P. Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation. **Progress in Polymer Science**, v. 34, n. 7, p. 641–678, 2009.

POCHIVALOV, K. V. *et al.* Thermally induced phase separation in semicrystalline polymer solutions: How does the porous structure actually arise?. **Materials Today Communications**, v. 28, n. May, p. 102558, 2021.

POLETTI, P. *et al.* Estudo de membranas de poliamida preparadas pelo método de inversão de fases a partir do sistema ternário água/ácido clorídrico/poliamida 66. **Revista**

Iberoamericana de polímeros, v. 11, n. 7, p. 550–557, 2010.

PRAKASH, S. S.; FRANCIS, L. F.; SCRIVEN, L. E. Microstructure evolution in dry–wet cast polysulfone membranes by cryo-SEM: A hypothesis on macrovoid formation. **Journal of Membrane Science**, v. 313, n. 1–2, p. 135–157, 2008.

QIAO, C. *et al.* Effect of water on the thermal transition in chitosan films. **Polymer Crystallization**, v. 2, n. 6, p. 1–7, 2019.

QIAO, C. *et al.* Structure and properties of chitosan films: Effect of the type of solvent acid. **Lwt**, v. 135, n. August 2020, p. 109984, 2021.

QIN, C. *et al.* Water-solubility of chitosan and its antimicrobial activity. **Carbohydrate Polymers**, v. 63, n. 3, p. 367–374, 2006.

RADOVANOVIC, P.; THIEL, S. W.; HWANG, S. T. Formation of asymmetric polysulfone membranes by immersion precipitation. Part I. Modelling mass transport during gelation. **Journal of Membrane Science**, v. 65, n. 3, p. 213–229, 1992.

RADOVANOVIC, P.; THIEL, S. W.; HWANG, S. T. Formation of asymmetric polysulfone membranes by immersion precipitation. Part II. The effects of casting solution and gelation bath compositions on membrane structure and skin formation. **Journal of Membrane Science**, v. 65, n. 3, p. 231–246, 1992.

RASHKI, S. *et al.* Chitosan-based nanoparticles against bacterial infections. **Carbohydrate Polymers**, v. 251, n. August 2020, p. 117108, 2021.

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

REN, J.; LI, Z.; WONG, F. S. Membrane structure control of BTDA-TDI/MDI (P84) copolyimide asymmetric membranes by wet-phase inversion process. **Journal of Membrane Science**, v. 241, n. 2, p. 305–314, 2004.

REN, J.; WANG, R. Preparation of Polymeric Membranes. **Membrane and Desalination Technologies**, v. 13, n. 1, p. 47–100, 2011.

REUVERS, A. J. **Membrane formation: diffusion induced demixing processes in ternary polymeric systems**. 1987. 196 f. - college Van Dekanen, 1987.

REUVERS, A. J.; VAN DEN BERG, J. W. A.; SMOLDERS, C. A. Formation of membranes by means of immersion precipitation. Part I. A model to describe mass transfer during immersion precipitation. **Journal of Membrane Science**, v. 34, n. 1, p. 45–65, 1987.

REYS, L. L. *et al.* Influence of freezing temperature and deacetylation degree on the performance of freeze-dried chitosan scaffolds towards cartilage tissue engineering. **European Polymer Journal**, v. 95, p. 232–240, 2017.

RINAUDO, M. Chitin and chitosan: Properties and applications. **Progress in Polymer Science**, v. 31, n. 7, p. 603–632, 2006.

RINAUDO, M.; PAVLOV, G.; DESBRIERES, J. Influence of acetic acid concentration on the

solubilization of chitosan *International Journal of Polymer*. **Polymer**, v. 40, n. 25, p. 7029–7032, 1999.

SADEGHI, A. *et al.* Predictive construction of phase diagram of ternary solutions containing polymer/solvent/nonsolvent using modified Flory-Huggins model. **Journal of Molecular Liquids**, v. 263, n. 1, p. 282–287, 2018.

SAHARIAH, P.; MÁSSON, M. Antimicrobial Chitosan and Chitosan Derivatives: A Review of the Structure-Activity Relationship. **Biomacromolecules**, v. 18, n. 11, p. 3846–3868, 2017.

SANCHEZ, I. C.; LACOMBE, R. H. Statistical Thermodynamics of Polymer Solutions. **Macromolecules**, v. 11, n. 6, p. 1145–1156, 1978.

SENCADAS, V. *et al.* Physical-chemical properties of cross-linked chitosan electrospun fiber mats. **Polymer Testing**, v. 31, n. 8, p. 1062–1069, 2012.

SINHA, M. *et al.* Development of ciprofloxacin hydrochloride loaded poly(ethylene glycol)/chitosan scaffold as wound dressing. **Journal of Porous Materials**, v. 20, n. 4, p. 799–807, 2013.

SMITH, J. M.; VAN NESS, H. C.; ABBOTT, M. M. **Introdução à Termodinâmica da Engenharia Química**. 7^a edição. Rio de Janeiro.: LTC, 2007.

SMOLDERS, C. A. *et al.* Microstructures in phase-inversion membranes. Part 1. Formation of macrovoids. **Journal of Membrane Science**, v. 73, n. 2–3, p. 259–275, 1992.

STRATHMANN, H. *et al.* The formation mechanism of asymmetric membranes. **Desalination**, v. 16, n. 2, p. 179–203, 1975.

STRATHMANN, H.; KOCK, K. The formation mechanism of phase inversion membranes. **Desalination**, v. 21, n. 3, p. 241–255, 1977.

STRATHMANN, H.; SCHEIBLE, P.; BAKER, R. W. A rationale for the preparation of Loeb-Sourirajan-type cellulose acetate membranes. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 15, n. 4, p. 811–828, 1971.

STROPNIK, R.; KAISER, V. Polymeric membranes preparation by wet phase separation: mechanisms and elementary processes. **Desalination**, v. 145, n. 1–3, p. 1–10, 2002.

SZLEIFER, I. Statistical thermodynamics of polymers near surfaces. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 1, n. 3, p. 416–423, 1996.

TAKAHASHI, T. *et al.* Growth inhibitory effect on bacteria of chitosan membranes regulated with deacetylation degree. **Biochemical Engineering Journal**, v. 40, n. 3, p. 485–491, 2008.

TAKARA, E. A.; MARCHESE, J.; OCHOA, N. A. NaOH treatment of chitosan films: Impact on macromolecular structure and film properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 132, n. 1, p. 25–30, 2015.

TAN, L.; PAN, D.; PAN, N. Thermodynamic study of a water–dimethylformamide–polyacrylonitrile ternary system. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 110, n. 6, p. 3439–3447, 2008.

TASSELLI, F. *et al.* Mechanical, swelling and adsorptive properties of dry–wet spun chitosan hollow fibers crosslinked with glutaraldehyde. **Reactive and Functional Polymers**, v. 73, n. 1, p. 218–223, 2013.

THEIN-HAN, W. W.; KITTYANANT, Y. Chitosan scaffolds for in vitro buffalo embryonic stem-like cell culture: An approach to tissue engineering. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 80B, n. 1, p. 92–101, 2007.

THEVARAJAH, J. J. *et al.* Towards a less biased dissolution of chitosan. **Analytica Chimica Acta**, v. 935, n. 1, p. 258–268, 2016.

THOMAS, S. Fluid handling properties of Allevyn dressing. **Wound Management Communications**, v. 1, n. 1, p. 1–8, 2007.

THOMAS, S. Laboratory findings on the exudate-handling capabilities of cavity foam and foam-film dressings. **Journal of Wound Care**, v. 19, n. 5, p. 1, 2010.

THOMAS, S. *et al.* The effect of temperature and humidity on the permeability of film dressings. **Journal of Wound Care**, v. 20, n. 10, p. 484–489, 2011.

THOMAS, S.; PIUS, A.; GOPI, S. **Handbook of Chitin and Chitosan: Volume 1: Preparation and Properties**. 2020.

THOMAS, S.; YOUNG, S. Exudate-handling mechanisms of two foam-film dressings. **Journal of wound care**, v. 17, n. 7, p. 1, 2008.

TREE, D. R. *et al.* Marangoni Flows during Nonsolvent Induced Phase Separation. **ACS Macro Letters**, v. 7, n. 5, p. 582–586, 2018.

UDAYAKUMAR, G. P. *et al.* Biopolymers and composites: Properties, characterization and their applications in food, medical and pharmaceutical industries. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, Coimbatore, India, v. 9, n. 4, p. 105322, 2021.

VADODARIA, K. *et al.* Design and fabrication of an instrument to evaluate characteristics of fluid handling capacity of wound care dressings. **Indian Journal of Fibre and Textile Research**, v. 45, n. 2, p. 169–176, 2020.

VAN DE VELDE, K.; KIEKENS, P. Biopolymers: overview of several properties and consequences on their applications. **Polymer Testing**, v. 21, n. 4, p. 433–442, 2002.

VANDEVORD, P. J. *et al.* Evaluation of the biocompatibility of a chitosan scaffold in mice. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 59, n. 3, p. 585–590, 2002.

VINSOVA, J.; VAVRIKOVA, E. Chitosan Derivatives with Antimicrobial, Antitumour and Antioxidant Activities - a Review. **Current Pharmaceutical Design**, v. 17, n. 32, p. 3596–3607, 2011.

WANG, F. *et al.* Enhanced physical and biological properties of chitosan scaffold by silk proteins cross-linking. **Carbohydrate Polymers**, v. 229, n. 1, p. 115529, 2020.

WANG, B.; LAI, Z. Finger-like voids induced by viscous fingering during phase inversion of alumina/PES/NMP suspensions. **Journal of Membrane Science**, v. 405–406, p. 275–283,

2012.

WEISSPFLOG, J. *et al.* Characterization of chitosan with different degree of deacetylation and equal viscosity in dissolved and solid state – Insights by various complimentary methods. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 171, p. 242–261, 2021.

WHITE, R.; HARTWELL, S.; BROWN, S. Interim report on a study to assesses the effectiveness and improved fluid uptake of new Allevyn. **WOUNDS UK**, v. 3, n. 4, p. 121–126, 2007.

WIENK, I. M. *et al.* Recent advances in the formation of phase inversion membranes made from amorphous or semi-crystalline polymers. **Journal of Membrane Science**, v. 113, n. 2, p. 361–371, 1996.

XU, L.; QIU, F. Simultaneous determination of three Flory–Huggins interaction parameters in polymer/solvent/nonsolvent systems by viscosity and cloud point measurements. **Polymer**, v. 55, n. 26, p. 6795–6802, 2014.

YAASHIKAA, P. R.; SENTHIL KUMAR, P.; KARISHMA, S. Review on biopolymers and composites – Evolving material as adsorbents in removal of environmental pollutants. **Environmental Research**, v. 212, n. 1, p. 113114, 2022.

YABUNO, Y. *et al.* Preparation of polyamide–PVDF composite hollow fiber membranes with well-developed interconnected bicontinuous structure using high-temperature rapid NIPS for forward osmosis. **Journal of Membrane Science**, v. 612, n. 1, p. 118468, 2020.

YANG, B. *et al.* Preparation and characterization of a novel chitosan scaffold. **Carbohydrate Polymers**, v. 80, n. 3, p. 860–865, 2010.

YATEENDRA, * *et al.* Extraction of chitin from chitosan from exoskeleton of shrimp for application in the pharmaceutical industry. **International Current Pharmaceutical Journal**, v. 1, n. 9, p. 258–263, 2012.

YIP, J. *et al.* Chitosan/Clotrimazole microcapsules for Tinea pedis treatment: in-vitro antifungal and cytotoxicity study. <http://dx.doi.org/10.1080/00405000.2014.933513>, v. 106, n. 6, p. 641–647, 2014.

YOUNES, I. *et al.* Influence of acetylation degree and molecular weight of homogeneous chitosans on antibacterial and antifungal activities. **International Journal of Food Microbiology**, v. 185, n. 1, p. 57–63, 2014.

ZAKHEM, E.; BITAR, K. N. Development of Chitosan Scaffolds with Enhanced Mechanical Properties for Intestinal Tissue Engineering Applications. **Journal of Functional Biomaterials** **2015, Vol. 6, Pages 999-1011**, v. 6, n. 4, p. 999–1011, 2015.

ZAWADZKI, J.; KACZMAREK, H. Thermal treatment of chitosan in various conditions. **Carbohydrate Polymers**, v. 80, n. 2, p. 394–400, 2010.

ZEHRER, C. L. *et al.* A comparison of the in vitro moisture vapour transmission rate and in vivo fluid-handling capacity of six adhesive foam dressings to a newly reformulated adhesive

foam dressing. **International Wound Journal**, v. 11, n. 6, p. 681–690, 2014.

ZHANG, H. *et al.* Chitosan membranes from acetic acid and imidazolium ionic liquids: Effect of imidazolium structure on membrane properties. **Journal of Molecular Liquids**, v. 340, n. 1, p. 117209, 2021.

7. APÊNDICE A

Figura 7-1 – Imagens de MEV dos filmes pós lavagem: (a) superfície QT 3 % (m/m) (b) superfície QT 4 % (m/m) (c) seção transversal QT 3 % (m/m) e (d) seção transversal QT 4 % (m/m).

