



Hugo Miguel Lisboa Oliveira

Licenciado

**Produção de Quitosano e
Desenvolvimento de Novos Materiais a
partir de Resíduos Alimentares**

Dissertação para obtenção do Grau de Doutor em
Ciência e Engenharia dos Materiais

Orientador: João Paulo Borges, Prof.º Auxiliar, UNL
Co-orientador: Ana Maria Ramos, Prof.ª Associada, UNL
Co-orientador: Eduardo Pires, Ph.D., CERAMED

Júri:

Presidente: Prof. Doutora Ana Maria Félix Lobo
Arguente(s): Prof. Doutora Maria Helena Mendes Gil

Vogais: Prof. Doutor João Carlos Moura Bordado
Prof. Doutora Maria Pilar Figueiroa Gonçalves
Prof. Doutora Amélia Pilar Grases Santos Silva Rauter

FCT FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Dezembro de 2012

A presente dissertação com o título “Produção De Quitosano E Desenvolvimento De Novos Materiais A Partir De Resíduos Alimentares”, possui o “copyright” em nome de Hugo Miguel Lisboa Oliveira, da FCT/UNL e UNL. A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplars impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositories científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor’.

He who has a why to live can bear almost any how.

Friedrich Nietzsche

Agradecimentos

A presente dissertação de doutoramento é a conclusão de um longo processo de aprendizagens, não só técnicas mas sobretudo humanas. Face a tão rico processo faz todo o sentido manifestar a minha profunda gratidão por todos aqueles que fizeram parte deste processo.

Agradeço primeiramente aos meus orientadores, tanto ao Professor João Paulo quanto à Professora Ana Ramos. Agradeço todo o acompanhamento ao longo destes anos que estiveram sempre pacientemente presentes para me ensinar, guiar e aconselhar não só profissionalmente mas também pessoalmente.

Agradeço ainda ao Professor Eduardo Pires pela oportunidade que me deu, e também por tudo o que me ensinou.

Agradeço a todos aqueles que trabalharam comigo na CERAMED, em particular à Ana Espiga, à Sofia Prata, ao Henrique Vazão de Almeida, à Patrícia Mansos, à Ana Celina, ao Sérgio Rosa e à Susana Faria. De uma forma especial agradeço à Andreia V. Dos Santos e à Ana Teresa Salgueiro. A todos eles agradeço a amizade e companheirismo.

Agradeço também a todos os que trabalharam comigo na Universidade, ao Pedro Almeida, ao Luís Pinto, à Augusta, à Ana Baptista, ao Gonçalo Pereira, ao João Canejo, à Ana Catarina e às Professoras Maria Teresa Cidade e Helena Godinho. O meu obrigado ainda ao Karimbi Mahesh e ao Professor Braz Fernandes por tudo o que me ensinaram nos últimos tempos.

Num plano mais pessoal, agradeço a todos os meus amigos, pelo incansável apoio e por toda a saudável preocupação.

Por último, presto homenagem à minha família, aos meus Pais e ao Filipe e à Sofia, por todo o amor e segurança que me dão.

Grato a todos por fazerem parte da minha vida.

Sumário

O quitosano é actualmente um dos biomateriais com maior potencial de resposta às exigências do mercado biomédico. O facto de existir uma panóplia de aplicações para a quitina e seus derivados leva a considerar este polímero como aspirante a biomaterial do século XXI. A quitina e o seu derivado desacetilado, quitosano, são polímeros naturais compostos por unidades monoméricas de β -(1-4)-D-glucosamina (unidade desacetilada) e por N-acetil-D-glucosamina (unidade acetilada). A quitina é insolúvel em meio ácido enquanto o quitosano é solúvel nessas condições devido aos grupos amina protonados livres presentes nas unidades D-glucosamina. A procura desta matéria prima tem crescido substancialmente principalmente pelo seu potencial no desenvolvimento de dispositivos médicos.

No presente trabalho procurou-se desenvolver novos materiais com este fim, aproveitando o facto de o quitosano poder formar estruturas líquidas cristalinas e assim mimetizar a organização peculiar do colagénio, um dos principais componentes do tecido humano. A aplicação destas soluções originou o desenvolvimento de um cimento ósseo totalmente biocompatível. A formação de nanofibrilas de quitina, constituiu ainda alvo de estudo pelo seu potencial de reforço de estruturas compósitas com polímeros termoplásticos.

Palavras Chave: Quitina; Quitosano; Nanofibrilas

Abstract

Chitosan is currently one of biomaterials with the greatest potential to respond to the biomedical market requirements. The fact that there is a range of applications for chitin and their derivatives, transforms this polymer in an aspirant biomaterial of the 21st century. Chitin and its deacetylated derivative chitosan are natural polymers composed of randomly copolymer formed by β -(1-4)- linked D-glucosamine (deacetylated units) and N-acetyl Dglucosamine (acetylated units). Chitin (composed of less than 50% deacetylated units) is insoluble in aqueous media while chitosan (with more than 50% deacetylated units) is soluble in acidic conditions due to the free protonable amino groups present in the D-glucosamine comonomers. A great demand is emerging for this feed-stock mostly because of it's potential to develop medical devices.

In the present work we developed new materials for this purpose, taking advantage from the fact that chitosan can form liquid crystals phases and thus mimic the peculiar organization of collagen, one of the main components of our human tissues. From the application of these liquid crystalline solutions, successful biocompatible bone cement was created. Also, the formation of chitin nanowhiskers was studied for their potential to reinforce composite structures with thermoplastic polymers.

Keywords: Chitin; Chitosan; Chitin

Índice	
Agradecimentos	VII
Sumário.....	IX
CAPÍTULO I	27
1. Estudo da Extração de Quitina e da Produção de Quitosano à Escala	29
Laboratorial	29
1.1 Introdução	29
• Pré-tratamento.....	39
1.2. Procedimento Experimental.....	49
1.3. Resultados e Discussão	58
1.3.1 Estudo da reacção de desmineralização	58
1.3.2 Grau de Desacetilação	64
1.3.3 Peso Molecular e Polidispersão.....	66
1.3.4. Coloração.....	69
1.3.5 Rendimento Global	70
1.4 Conclusão	72
1.5. Referências	73
Capítulo II.....	81
2. Instalação Piloto.....	82
2.1. Projecto da Instalação Piloto para a Produção de Quitosano Grau Médico...82	
2.1.1 Descrição do Processo	82
2.1.2 Diagrama de Blocos.....	83
2.1.3 Balanços de Massa.....	88
2.1.4 Balanços de Energia.....	92
2.1.5 Diagrama de Tubagens e Processo	93
2.1.6 Diagrama de Ocupação	94
2.1.7 Dimensionamento e Características do Equipamento.....	97
2.1.8 Instrumentação, Automação e Controlo	102
2.1.9 Planta das Instalações	105
Capítulo III.....	107
3. Caracterização Morfológica e Reológica de Soluções e Géis de Quitosano	109
3.1. Introdução	109
3.2. Parte Experimental	111
3.2.1 Preparação de soluções de Quitosano	111

3.2.2	Microscopia óptica de luz polarizada (POM)	111
3.2.3	Reologia	111
3.3	Resultados e discussão	112
3.3.1	Microscopia Óptica de Luz Polarizada (POM)	112
3.3.2	Caracterização reológica	116
3.4	Conclusão	127
3.5	Referências	128
Capítulo IV	135
4.	Estudo da Aplicação de Soluções de Quitosano em Cimentos Ósseos	137
4.1	Introdução	137
4.2	Parte Experimental	143
4.2.1	Materiais	143
4.2.2	Preparação dos cimentos ósseos	143
4.2.3	Tempo de Presa ou solidificação, tS	144
4.2.4	Teste de Compressão.....	144
4.2.5	Injectabilidade	144
4.2.6	Difracção de Raios-X (DRX)	145
4.2.6	Microscopia Electrónica de Varrimento (SEM)	145
4.2.7	Medição da Temperatura	145
4.2.8	Testes de Citotoxicidade.....	145
4.3	Resultados e discussão	147
4.4	Conclusão	158
4.5	Referências	160
Capítulo V	167
5.	Produção de Nanofibrilas de Quitina à Escala Laboratorial	169
5.1	Introdução	169
5.1.1	Produção de Nanofibrilas de Quitina	169
5.1.2	Modificação Química	171
5.1.3	Fases Líquido-Cristalinas	172
5.1.4	Aplicações.....	173
5.2	Produção e caracterização de nanofibrilas de quitina	174
5.2.1	Procedimento de produção de nanofibrilas de quitina.....	174
5.2.3	Caracterização	175
5.3	Resultados e discussão	176
5.4	Conclusão	181
5.5	Referências	182

Capítulo VI	186
6. Estudo da aplicação de nanofibrilas de quitina no reforço de filmes de PVA.....	187
6.1 Introdução	187
6.2 Parte Experimental	194
6.2.1 Produção de filmes de PVA reforçados com nanofibrilas de quitina	194
6.2.2 Caracterização	194
6.3 Resultados e Discussão	195
6.4 Conclusão	204
6.5 Referências	205
Capítulo VII	211
7. Perspectivas Futuras	213

Índice de Tabelas

Tabela 1.1 - Fontes de quitina: conteúdo em quitina e em CaCO ₃ (Kurita, 2006).....	34
Tabela 1.2 - Aplicações do quitosano.....	36
Tabela 1.3 - Relação entre as propriedades do quitosano e as suas possíveis aplicações biomédicas (Rinaudo, 2006)	36
Tabela 1.4 – Especificações de quitosano com grau médico PROTASAN CL113 (fonte: NOVAMATRIX)	37
Tabela 1.5 – Resumo das condições utilizadas no processo de desmineralização de casca de camarão por outros autores.	42
Tabela 1.6 - Resumo das condições usadas no processo de desproteinização da casca de camarão por outros autores.	43
Tabela 1.7 - Métodos de descoloração (Youn et al., 2006)	45
Tabela 1.8 - Resumo das condições usadas no processo de desacetilação por outros autores.	46
Tabela 1.9 – Aferição das condições experimentais do processo desmineralização.....	50
Tabela 1.10 - Condições experimentais do processo de desmineralização.....	50
Tabela 1.11 - Condições experimentais do estudo cinético da reacção de desmineralização, Amostras X _i (X = F, G, H, I, J, K; i = 5, 22 e 30 °C).....	52
Tabela 1.12 - Valores em percentagem da quantidade de cálcio presente em cada amostra.....	59
Tabela 1.13 - Valores de quantidade de íões cálcio e cloro presentes na reacção de desmineralização.....	59
Tabela 1.15 - Graus de desacetilação das amostras de quitosano.....	64
Tabela 1.16 - Valores de Peso Molecular Mw e Polidispersão das amostras de quitosano.....	67
Tabela 1.17 - Composição Experimental da Casca de Camarão <i>Pandalus borealis</i>	70
Tabela 1.18 - Resumo da caracterização das amostras de quitosano obtidas.....	72
Tabela 2.1 - Constituição das Correntes de Processo.....	85
Tabela 2.2 - Descrição do local onde cada operação decorre.....	85

Tabela 2.3 - Balanço de Massa referente ao processo de desmineralização.	89
Tabela 2.4 - Balanço de Massa referente ao processo de desproteínização..	90
Tabela 2.5 - Balanço de Massa referente ao processo de Desacetilação.....	91
Tabela 2.6 - Especificações de tempo do RF1.....	94
Tabela 2.7 - Especificações de tempo do RF2.....	95
Tabela 2.8 - Características do Reactor Filtro 1 – RF1.....	98
Tabela 2.9 - Características do Reactor Filtro 2 – RF2.....	99
Tabela 2.10 - Características do Tanque de Mistura – TM.....	99
Tabela 3.1 – Resumo da concentração, frequência de cross-over e tempo de relaxamento para os dois sistemas de quitosano.....	122
Tabela 4.1 - Resumo das Características Óptimas de um Cimento Ósseo....	142
Tabela 4.2 – Preparação de Cimentos Ósseos.....	143
Tabela 4.3 – Efeito da concentração de polímero no tempo de presa.....	147
Tabela 4.4 - Resultados do teste de citotoxicidade (% de viabilidade celular) dos 3 CPC em função da razão L/S.....	158
Tabela 4.5 - Designação e condições a que cada amostra foi mantida antes dos testes de citotoxicidade.....	158
Tabela 4.6 - Resumo dos parâmetros obtidos em comparação com os de referência.....	158
Tabela 5.1 - Resumo das dimensões de nanofibrilas de quitina obtidas de diferentes fontes (adaptado de Dufresne, 2008).....	170
Tabela 5.2 - Condições reaccionais usadas para produção de nanofibrilas de quitina.....	174
Tabela 5.3 – Dimensões das nanofibrilas produzidas.....	178
Tabela 5.4 – Grau de desacetilação das nanofibrilas produzidas.....	179
Tabela 5.5 – Sumário das características das nanofibrilas produzidas.....	180
Tabela 6.1 - Propriedades térmicas dos filmes de PVA/NFCH.....	198
Tabela 6.2 - Parâmetros mecânicos dos filmes compósitos PVA/Nanofibrilas de Quitina.....	200
Tabela 6.3 – Valores utilizados no modelo série-paralelo para estimar o módulo de Young.....	200
Tabela 6.4 – Valores dos parâmetros utilizados no modelo Halpin-Tsai(tal como modificado por Nielsen) para estimar o módulo de Young.....	202

Índice de Figuras

Figura 1.1 - Comparação das macromoléculas de quitina e celulose.....	29
Figura 1.2 – Representação da estrutura da α -quitina (à esquerda) da β -quitina, à direita (adaptado de Kurita, 2001).....	31
Figura 1.3 - Representação esquemática do copolímero quitina e quitosano (Khor et al., 2003).	33
Figura 1.4 – Composição em percentagem de peso seco de minerais, proteínas e quitina extraídos em condições industriais no ano 2000 de casca de camarão (adaptado de Rodde et al., 2008)	38
Figura 1.5 - Diagrama esquemático do processo de extracção de quitina e produção de quitosano.....	39
Figura 1.6 - Molécula do Carotenóide Astaxantina.....	44
Figura 1.7 - Desacetilação de α -quitina e β -quitina com NaOH a 30% (p/v) a 100°C (adaptado Kurita, 2001).....	48
Figura 1.8 - Espectro de infravermelho típico de quitina/quitosano.....	54
Figura 1.9 - Avaliação da evolução do valor de pH ao longo da reacção de desmineralização.....	58
Figura 1.10 - Evolução da % Cálcio restante na casca em função do tempo, para as temperaturas de 5°C, 22°C e 30°C.....	61
Figura 1.11 – Representação da linearização dos pontos iniciais da reacção de desmineralização às temperaturas de 5°C, 22°C e 30°C.....	62
Figura 1.12 - Representação de Arrhenius para a reacção de desmineralização.....	63
Figura 1.13 - Espectros de FTIR das 5 amostras de quitosano.....	64
Figura 1.14 - Cromatogramas de SEC das 5 amostras de quitosano.....	66
Figura 1.15 – Relação entre o tempo de desmineralização e os valores de peso molecular das amostras de quitosano.....	67
Figura 1.16 - Relação entre o tempo de desmineralização e a polidispersão nas amostras de quitosano.....	68
Figura 1.17 - Amostras de quitosano com diferentes tempos de desmineralização.....	76
Figura 2.1 - Diagrama de blocos do processo de extracção de quitina e produção de quitosano.....	88
Figura 2.2 - Diagrama esquemático do processo de desmineralização.....	90
Figura 2.3 - Diagrama esquemático da desproteínização.....	91
Figura 2.4 - Diagrama esquemático do processo de desacetilação.....	92

Figura 2.5 - Diagrama de Ocupação.....	96
Figura 2.6 - Planta da Instalação.....	
Figura 3.1 – Observações por POM de texturas de quitosano; bifase apresentada por uma solução de quitosano em a) ácido clorídrico (4,4 % p/p de quitosano) e b) em ácido málico (3,8 % p/p de quitosano).....	113
Figura 3.2 - Variação do passo da hélice da fase colestérica com a fracção volumica de quitosano, em soluções diluídas de ácido málico (a) e ácido clorídrico (b).....	115
Figura 3.3 - Efeito da taxa de corte e da concentração de quitosano na viscosidade de soluções de ácido málico (a) e ácido clorídrico (b).....	117
Figura 3.4 - Efeito da concentração de quitosano no módulo de armazenamento e no módulo dissipativo em função da frequência angular para soluções de ácido málico (a) e de ácido clorídrico (b).....	119
Figura 3.5 - Efeito da concentração de quitosano na tangente de perdas em função da frequência angular, para as soluções de ácido málico (a) e de ácido clorídrico (b).....	121
Figura 3.6 – Influência da concentração de quitosano na tangente de perdas em função da frequência angular, para soluções de ácido málico (a) e de ácido clorídrico (b).....	124
Figura 4.1 – Esquema explicativo da ordem dos tempos na reacção do cimento.....	142
Figura 4.2 - Resistência à compressão de diferentes CPCs.....	143
Figura 4.3 – Injectabilidade dos cimentos com 1% (a), 3% (b) e 5% (p/v) (c) de quitosano e diferentes razões L/S.....	150
Figura 4.4 – Difractograma do cimento após 24h (a) e 3 semanas (b) ● β -TCP □ DCPD.....	152
Figura 4.5 – Imagem SEM da superfície do CPC B: L/S=1 (a) e L/S=0,75 (b)....	153
Figura 4.6 – Variação da temperatura ao longo da preparação do cimento.....	154
Figura 4.7 – Avaliação da viabilidade celular.....	156
Figura 4.8 - Evolução do pH para o CPC B, L/S=0,75.....	157
Figura 5.1 – Representação esquemática da dupla camada eléctrica em redor das nanofibrilas (Revol et al., 1993).....	172
Figura 5.2 - Imagem TEM das nanofibrilas de quitina obtidas após 90min de hidrólise ácida.....	176
Figura 5.3 – Histogramas referentes à distribuição do diâmetro (a) e do comprimento (b) das nanofibrilas.....	177

Figura 5.4 - Espectro de infravermelho das nanofibrilas produzidas.....	178
Figura 6.1 – Representação esquemática do modelo série-paralelo, em que R é a fase composta por nanofibrilas e S a fase composta pelo polímero.....	190
Figura 6.2 - Esquema reaccional de formação de poli(álcool vinílico).....	193
Figura 6.3 – Termograma de DSC do Filme de PVA.....	196
Figura 6.4 – Curvas de tracção típicas dos filmes compósitos PVA/Nanofibrilas de Quitina.....	198
Figura 6.5 - Representação do módulo de Young em função da concentração de nanofibrilas de quitina.....	199
Figura 6.6 - Comparação entre os valores do módulo de Young obtidos experimentalmente e através do modelo fenomenológico série-paralelo.....	201
Figura 6.7 - Comparação entre os valores do módulo de Young obtidos experimentalmente e através do modelo Halpin-Tsai-Nielsen.....	203

Acronimos

Reagentes

H₂O – Água

HCl – Ácido clorídrico

H₃PO₄ – Ácido Fosfórico

Ca₃(PO₄) ou β-TCP – Beta fostato tricalcico

CaCO₃ – Carbonato de cálcio

CaCl₂ – Cloreto de Cálcio

CO₂ - Dióxido de Carbono

DCPD ou Bruxite – Fosfato dicalcico dihidratado

OH – Grupo Hidróxilo

NH₂ – Grupo Amina II

NH₃⁺ – Grupo Amina III

NaOH – Hidróxido de sódio

NaOCl – Hipoclorito de sódio

Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂ HA – Hidroxiapatite

MCPM – Fosfato monocalcico monohidratado

NFCH – Nanofibrilas de Quitina

PVDF – Poli vinil

PP – Poli propileno

PVA- Poli Vinil Alcool

CS – Quitosano

CH – Quitina

Técnicas Experimentais

SEC – Cromatografia de Exclusão Molécular (Size Exclusion Chromatography)

DSC – Calorimetria de Varrimento Diferencial (Differential Scanning Calorimetry)

FTIR – Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (Fourier Transform Infrared Spectroscopy)

TEM – Microscopia Eléctronica de Transmissão (Transmission Electron Microscopy)

POM – Microscopia óptica de luz polarizada (Polarized Optical Microscopy)

SEM – Microscopia Electrónica de Varrimento (Scanning Electronic Microscopy)

UV – Ultravioleta

Termos Técnicos

K - Constante cinética

R - Constante dos Gases Perfeitos

DM – Desmineralização

DC – Descoloração

DP – Desproteínização

DS – Desacetilação

DA – Grau de Acetilação

DD – Grau de Desacetilação

Ea - Energia de Activação

E – Módulo de Young

G' – Módulo dissipativo

G'' – Módulo de armazenamento

Tan δ - Tangente

Mw – Peso moléculas médio em peso (weight average moléculas weight)

Mn - Peso moléculas médio em número (number average moléculas weight)

PD – Polidispersão (polydispersity)

%(p/v) – percentagem peso por volume

%(p/p) – percentagem peso por peso

%(v/v) –percentagem volume por volume

RF1 – Reactor Filtro 1

RF2 – Reactor Filtro 2

SNx – Sensor de Nível

SPx – Sensor de pH

TM – Tanque de Mistura

T_g – Temperatura de Transição Vitrea

T_f – Temperatura de Fusão

Unidades

cal – Calorias

cps -Centipoise

cm – centímetro

dm² – decímetro quadrado

dm³ – decímetro cúbico

g – grama

°C – Graus centigrados

°K - graus Kelvin

mol – mole

M – Molar

m-metro

m² – metro quadrado

µm – micrómetro

mm - milímetro

mL – mililitro

nm - nanometro

ppm – parte por milhão

MPa – MegaPascal

Pa – Pascal

(s) - segundos

EU/g – unidades de endotoxinas por grama (endotoxin units per gram)

Cfu/g – unidades de colónias formadas por grama (colony forming units per grams)

Objectivos e Enquadramento do Trabalho

Face ao carácter empresarial da presente tese de doutoramento é importante o adequado enquadramento em relação às especificações do trabalho proposto. A presente tese de doutoramento tem por base o trabalho de I&D feito para a empresa CERAMED.

A CERAMED, é uma empresa dedicada à prestação de serviços de revestimento de próteses metálicas, nomeadamente, revestimentos de Titânio e Hidroxiapatite em próteses de ligas de Titânio-Vanádio-Alumínio ou Cobalto-Crómio. Com o objective de diversificar a sua gama de produtos, existia a intenção de criar uma nova area dedicada à produção de dispositivos médicos de terceira geração, ou seja, que tivessem a capacidade de integração no corpo humano e pudessem promover a sua regeneração de tecidos.

A primeira etapa seria o desenvolvimento da matéria prima para tal, tendo a escolha recaído na quitina e quitosano. Estes polissacarídeos são óptimos candidatos para a inclusão em dispositivos médicos uma vez que têm características comprovadas de biocompatibilidade, biodegradabilidade e bioactividade. Possuem ainda amplo estudo académico e dão ainda os primeiros passos na constituição de dispositivos médicos. Face a isto, uma das estratégias seria produzir quitosano de grau médico, não só para futuras aplicações desenvolvidas pela CERAMED, mas também para comercialização para outras empresas. O estudo realizado da extracção de quitina e produção de quitosano deram origem a um processo inovador e ao projecto e instalação de uma instalação piloto nas instalações da CERAMED, no campus do antigo INETI. Devido a questões de propriedade industrial, são apenas apresentados os resultados da optimização da desmineralização bem como o impacto que esta etapa possui nas características do produto final. Deste modo é somente apresentado um método de produção de quitosano de grau comercial.

Um dos principais objectivos do presente trabalho passa pelo aproveitamento das características da mesofase nemática quirial (colestérica) no desenvolvimento de novos dispositivos médicos. O facto dos tecidos humanos serem constituídos por colagénio, que apresenta fases nemáticas quirais, tal como a quitina ou o quitosano. Estas fases apresentam uma organização própria que lhes confere características ópticas e mecânicas específicas. Desta forma, torna-se pertinente estudar a potencialidade do quitosano na formação deste tipo de estruturas de forma a ser possível produzir dispositivos médicos implantáveis capazes de mimetizar a

organização do colagénio na matriz extracelular. A compreensão dos mecanismos de formação de estruturas líquidas cristalinas com o quitosano permitiu pensar-se em constituir materiais compósitos para regeneração óssea. Tal facto, traduziu-se na investigação de um cimento ósseo que combinasse as características das soluções anteriormente estudadas e que pudesse fornecer uma base mineral que induzisse a regeneração de tecido ósseo. Este trabalho encontrase protegido por propriedade intelectual.

Do trabalho realizado da extracção da quitina resultou outra matéria prima que se considera de grande potencial de aplicação, as nanofibrilas de quitina. O desenvolvimento desta matéria prima, traduz a aposta de apresentar soluções inovadoras dentro do campo biomédico através do aproveitamento dos polissacarídeos quitina e quitosano. Deste modo, e aproveitando a baixa solubilidade da quitina, considerou-se que esta seria um bom candidato para uma modificação morfológica de forma a apresentar-se sobre a forma de nanofibrilas. As excelentes propriedades mecânicas associadas a um carácter biocompatível e biodegradável levam à consideração do seu uso em materiais amigos do ambiente (“eco-friendly” composites: eco-compósitos) estudo este que foi realizado e é apresentado neste trabalho.

Concluindo, o presente trabalho teve como resultados:

- o desenvolvimento à escala laboratorial de três matérias primas, a quitina, o quitosano e as nanofibrilas de quitina;
- a projecção e instalação de uma unidade piloto de produção de quitina e quitosano;
- o estudo de soluções de quitosano para futura aplicação em dispositivos médicos;
- o desenvolvimento de um dispositivo médico;
- o estudo do reforço de estruturas poliméricas de PVA com nanofibrilas de quitina

O trabalho iniciado originou ainda a criação de uma nova empresa, a ALTAKITIN, dedicada à produção de quitina, quitosano e derivados, bem como de dispositivos médicos.

CAPÍTULO I

Estudo da Extração de Quitina e Produção de Quitosano à Escala Laboratorial

1. Estudo da Extração de Quitina e da Produção de Quitosano à Escala Laboratorial.

1.1 Introdução

A Quitina, é um polissacarídeo natural presente em diversos organismos vivos e que consiste em unidades repetitivas de N-acetil-glucosamina unidas por uma ligação covalente β -1,4. A sua estrutura é muito semelhante à da celulose com um grupo hidróxilo na posição C-2 a ser substituído por um grupo acetilamina, se for considerada um homopolímero, o que na realidade não acontece, como é explicado na Figura 1.1.

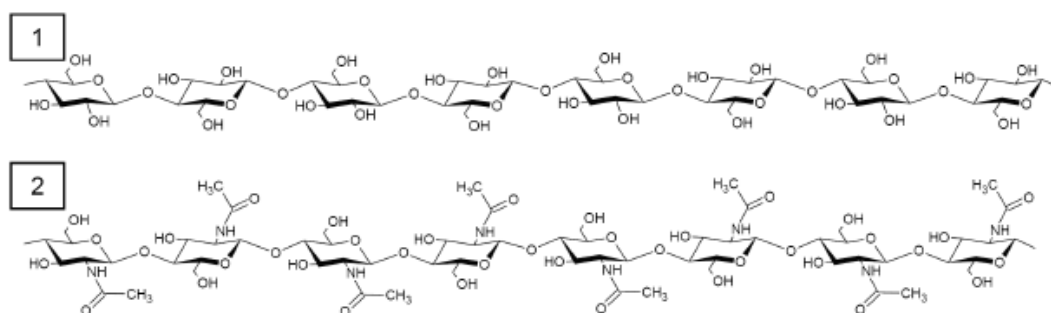


Figura 1.1 - Comparação das macromoléculas de celulose e quitina

O número elevado de organismos que produzem anualmente este biopolímero faz dele o segundo mais abundante na natureza a seguir à celulose, sendo de notar que a taxa de reposição da quitina é duas vezes mais elevada que a celulose (Campana-Filho, 2007). Para tal contribui o facto de este polímero ser um dos principais constituintes de exoesqueletos de artrópodes, como os crustáceos e insectos. Está presente ainda em moluscos, cefalópodes e nas paredes celulares de fungos. (Rinaudo, 2006). Foi isolado pela primeira vez pelo francês Braconnot em 1811, a

partir de fungos, 30 anos antes de descoberta da celulose. Foi-lhe atribuído o nome “fungine” que veio a ser substituído por “chitin”, derivado de “chiton” do grego que significa armadura de malha ou túnica, após a separação de um composto semelhante a partir da cutícula de crustáceos (Khor, 2001, Rinaudo, 2006).

A quitina pode ser encontrada em três formas cristalinas diferentes: a α -quitina, a β -quitina e a γ -quitina. A α -quitina é a que se encontra com mais facilidade na natureza, ocorrendo, por exemplo, em cascas de ovos de nematóides e rotíferos, em moluscos, em cutículas de artrópodes, nas paredes celulares de fungos, em tendões e casca de lagosta e camarão. Pode também ser encontrada e produzida por vários organismos marinhos menos comuns, apresentando esta α -quitina mais exótica uma maior cristalinidade e pureza, por ser produzida na ausência de pigmentos, proteínas e calcite. Esta α -quitina é obtida a partir da recristalização de soluções, de biossíntese *in-vitro* ou de polimerização enzimática (Kumar *et al.*, 2004; Rinaudo, 2006).

A β -quitina é rara aparece como parte constituinte das cascas de braquiópodes e moluscos, em algumas larvas e em partes específicas de cefalópodes. Nos cefalópodes aparece associada com proteínas num constituinte específico do sistema digestivo das lulas. Este tipo de quitina aparece na sua forma mais pura em filamentos monocristalinos excretados por alguns seres, como por exemplo na *Thalassiosira fluviatilis*. A β -quitina ainda não foi produzida através de soluções ou por biossíntese *in-vitro*. É possível encontrar uma outra forma, a γ -quitina, que se veio a verificar ser uma variante da α -quitina e também pode ser encontrada nas lulas (Rinaudo, 2006; Campana-Filho *et al.*, 2007).

Estes tipos de estruturas podem ser identificados e diferenciados recorrendo a técnicas de caracterização como a espectroscopia de infra-vermelhos e ressonância magnética nuclear do estado sólido, em conjunto com difracção de raios X (Kumar *et al.*, 2004; Kurita, 2006; Rudall, 1969; Rinaudo, 2006).

A α -quitina é a forma mais estável, tendo sido realizados estudos detalhados da sua estrutura que indicaram que as moléculas de α -quitina estão arranjadas com uma conformação anti-paralela, permitindo uma máxima ligação entre moléculas por ligações de hidrogénio. A forma β -quitina apresenta cadeias paralelas, uma por célula unitária, o que leva a uma força inter-moléculas menor. Este arranjo espacial não favorece a ligação de hidrogénio entre cadeias ao grupo hidróxilo (ligado a C-6), como observado para a α -quitina (Khor, 2001). Por fim surge a γ -quitina, em que duas cadeias paralelas alternam com uma anti-paralela (Kurita, 2006; Cohen, 1987; Merzendorfer & Zimoch, 2003). Estas duas últimas podem ser convertidas para o

formato anti-paralelo, a forma α -quitina, com um tratamento em ácido clorídrico forte (HCl) (Kurita, 2006). Na Figura 1.2 estão representadas as estruturas da α - e da β -quitinas.

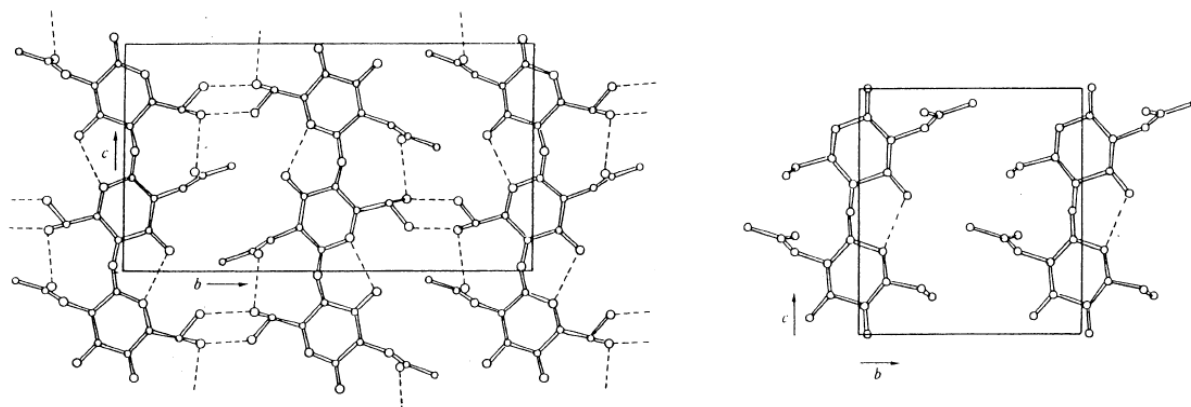


Figura 1.2 – Representação da estrutura da α -quitina (à esquerda) da β -quitina, à direita (adaptado de Kurita, 2001)

A conformação anti-paralela das moléculas da α -quitina permite um empacotamento compacto, formando micronanofibrilas de quitina, as quais consistem em aproximadamente 20 cadeias únicas que são estabilizadas por um elevado número de ligações de hidrogênio. Este arranjo contribui amplamente para as propriedades físico-químicas da cutícula, como a resistência mecânica e a estabilidade (Cohen, 1987; Merzendorfer & Zimoch, 2003). A principal consequência das fortes ligações de hidrogênio na α -quitina é a sua insolubilidade em todos os solventes orgânicos comuns e em soluções ácidas, sendo por isso tão complicado trabalhar com este polímero. A funcionalidade do grupo N-acetilo desempenha um papel fundamental no comportamento deste biopolímero, pois são estes grupos os responsáveis pelas inúmeras ligações intermoleculares.

Em contraste com a anterior, na β -quitina e na γ -quitina a compacidade e o número de ligações de hidrogênio intermoleculares são reduzidos, originando um aumento de ligações de hidrogênio com a água. O elevado grau de hidratação e a reduzida compacidade resultam em estruturas quitinosas mais flexíveis e moles (Merzendorfer & Zimoch, 2003). A β -quitina apresenta também elevada afinidade com outros solventes e elevada reactividade, devido à já referida estrutura cristalina. A distância entre cadeias no eixo b da β -quitina potencia inclusões cristalinas de complexos de pequenas moléculas polares, como a água, álcoois e aminas. A β -quitina, obtida das lulas, é semi-cristalina, apesar de, segundo Kurita (2006), a β -quitina quase completamente cristalina ter sido obtida de tubos de *Tevnia*

jerichonana, um organismo do fundo marinho. A dissolução ou o inchamento convertem a β -quitina em α -quitina (o contrário não acontece), sugerindo que a β -quitina seja uma forma meta-estável biossintetizada por um mecanismo diferente do da α -quitina (Kurita, 2006). Observações morfológicas e cristalográficas revelaram que a transformação inter-cristalina está dependente da concentração de ácido (HCl) utilizado (Kurita, 2001). No caso de β -quitina obtida de lulas, pode ocorrer completa dissolução em água, podendo ser também referido que a passagem a α -quitina se deve à grande mobilidade das cadeias de β -quitina. A sua afinidade com a água e a sua escassez são as razões para a não produção em larga escala da β -quitina, pois a sua utilidade fica um pouco limitada. A γ -quitina tem um comportamento em relação à água intermédio entre o da β -quitina e da α -quitina (Khor, 2001).

O principal derivado da quitina, o quitosano, foi descoberto em 1859 por Rouget, quando este provou que a quitina em suspensão numa solução de hidróxido de sódio, levada à fervura, se torna solúvel em ácidos orgânicos. Só em 1894 é que Hoppe-Seyler deu o nome a este produto, denominando-o quitosano. A estrutura deste importante polímero apenas ficou totalmente conhecida no ano de 1950 (Khor, 2001; Campana-Filho *et al.*, 2007).

Ao estudar-se o quitosano é essencial definir o que este representa e o que o distingue do seu precursor, a quitina. Esta distinção é necessária pois durante muitos anos os dois termos foram vulgarmente confundidos, tendo melhorado a sua compreensão nos últimos vinte anos (Khor, 2001; Kurita, 2006).

Como foi referido, a quitina é um polissacarídeo linear formado pelo encadeamento de unidades N-acetil-glucosamina. Enquanto que no quitosano se observa a repetição de unidades N-glucosamina (Khor, 2001). Desta forma o quitosano é obtido por hidrólise alcalina da quitina, processo designado por desacetilação que será extensivamente abordado mais adiante.

Na realidade, a acetilação ou a desacetilação total, quase nunca ocorre, existindo sim um copolímero de N-acetil-glucosamina com N-glucosamina, fazendo-se a distinção entre quitina e quitosano através do respectivo conteúdo em grupos acetilo. Na Figura 1.3 está representado o copolímero referido anteriormente, encontrando-se também identificados os seis carbonos do anel da glucopirranose.

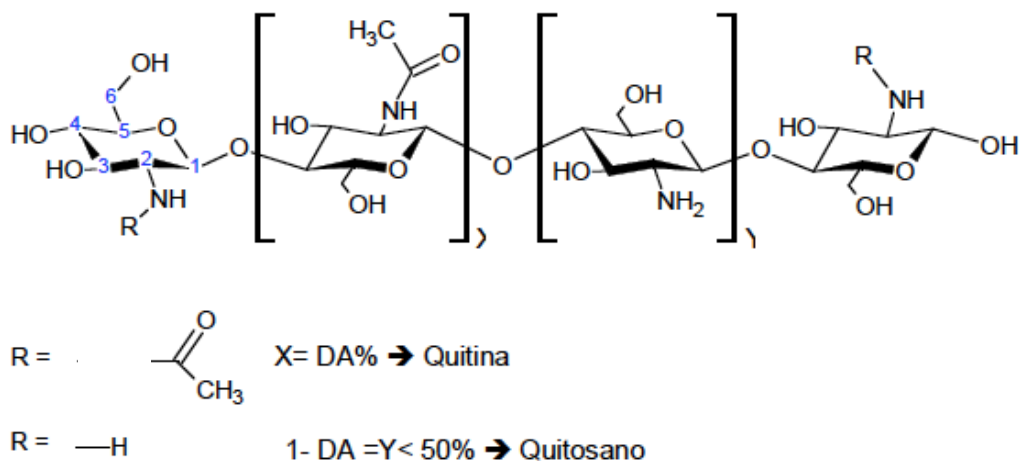


Figura 1.3 - Representação esquemática do copolímero quitina e quitosano (Khor & Lim, 2003).

É no carbono C-2 que se ligam o grupo acetamida ou o grupo amina. Quando se tem uma percentagem de unidades N-acetil-glucosamina superior a 50% tem-se quitina; quando a percentagem desses grupos é inferior a 50% tem-se quitosano, predominando então as unidades N-glucosamina. A percentagem de grupos acetamida é vulgarmente denominada de grau de acetilação (DA). Por sua vez, o grau de desacetilação (DD) é a percentagem de grupos amina presentes no polímero (Khor, 2001). Esta nomenclatura é a usada no meio científico respeitante a estes biopolímeros, sendo utilizada para caracterizar o conteúdo médio de unidades N-acetil-D-glucosamina na quitina e no quitosano (Silva, dos Santos & Ferreira, 2006).

A principal diferença entre o comportamento destes dois polímeros é a sua solubilidade. O polímero quitina é solúvel em N-dimetilacetamida com 5% cloreto de lítio (Li/DMAc) e insolúvel em soluções aquosas ácidas de ácidos fracos, ao contrário do seu derivado quitosano. Ao ter-se quitosano, o que implica um DD maior que 50%, tem-se um polímero solúvel em soluções ácidas aquosas que se comporta como um polielectrólito catiónico (Khor, 2001; Tolaimate, Desbrieres, Rhazi & Alagui, 2003). O conteúdo em azoto em amostras tratadas e purificadas é menos de 7% para a quitina e mais de 7% para o quitosano (Khor, 2001). Cientificamente o quitosano tem sido mais explorado do que a quitina, por ser solúvel em soluções aquosas de pH inferior a 6,5, sendo por isso mais fácil trabalhá-

lo (Khor & Lim, 2003).

Apesar de a quitina estar presente em inúmeros grupos taxonómicos, é geralmente separada e obtida de exoesqueletos de crustáceos, mais concretamente, de camarão e caranguejos, as fontes mais acessíveis de quitina. De um ponto de vista prático, as cascas destes tipos de crustáceos são as mais convenientes, pois estão disponíveis como resíduos da indústria alimentar (Kurita, 2006; Tolaimate *et al.*, 2003). Estas cascas geralmente contêm 15-40% de α -quitina, 20-40% de proteínas e 20-50% de carbonato de cálcio, sendo os restantes constituintes pigmentos e sais metálicos (Kurita, 2006).

Na Tabela 1.1 estão indicados os conteúdos em quitina e em carbonato de cálcio, para as diferentes fontes de quitina disponíveis na Biosfera.

Tabela 1.1 - Fontes de quitina: conteúdo em quitina e em CaCO_3 (Kurita, 2006)

Fonte	Quitina	CaCO_3 (%)	Tipo
Camarão	30-40	20-30	α -quitina
Caranguejo	15-30	40-50	α -quitina
Krill	20-30	20-25	α -quitina
Lula	20-40	residual	β -quitina
Amêijoas/ostras	3-6	85-90	α -quitina
Insectos	5-25	-	α -quitina
Fungos	10-25	-	α -quitina

Ao analisar-se a Tabela 1.1, chega-se à conclusão de que os dois tipos de fonte de quitina com maior conteúdo em biopolímero são, as já referidas, casca de camarão e caranguejo. A viabilidade da extracção de quitina de outras fontes, para além do camarão e caranguejo, fica comprometida quer pela baixa percentagem de quitina que apresentam, quer pela sua disponibilidade.

Na produção de um biomaterial, a alta pureza e a reprodutibilidade de características físico-químicas são fundamentais, pois só assim será possível chamar-lhe material de grau médico. Na produção da quitina tem que se ter em conta a sua origem, pois esta vai influenciar em muito o seu processo de obtenção. Existem características que variam de fonte para fonte, como o conteúdo em cálcio e proteínas, mesmo para a mesma fonte as características da quitina alteram-se com a idade, sexo e habitat de onde o animal é proveniente. É essencial ter-se a noção de que as condições de obtenção deste biopolímero (nomeadamente, as

temperaturas, os reagentes e suas concentrações, o material a utilizar e o número de etapas a realizar variam com a fonte e a espécie). Esta preocupação é fundamental pois vai influenciar directamente a qualidade do produto final.

No entanto, existem outras fontes de razoável interesse para a extracção de quitina como as paredes celulares de fungos e a cartilagem de moluscos como a lula.

Os fungos são facilmente cultivados sob condições controláveis, não sofrendo alterações de sazonalidade. Existem autores que extraíram quitosano de fungos com tratamentos ácidos e alcalinos (Rane and Hoover, 1993; Cai *et al.*, 2006; Suntornsuk *et al.*, 2002; Chatterjee *et al.*, 2005).

As cartilagens de lulas são interessantes devido à composição elevada de β -quitina, entre 35-40% e baixa em elementos inorgânicos como o cálcio, um dos elementos principais dos exoesqueletos do grupo artrópode. No entanto, a baixa disponibilidade desta fonte torna-a uma má escolha para um processo industrial.

A quitina e o quitosano exibem inúmeras propriedades biológicas e físico-químicas interessantes, tendo sido encontradas várias aplicações em diferentes campos, tais como: a indústria biomédica e farmacêutica, o tratamento de águas residuais, a agricultura, a cosmética e a indústria alimentar. Como já foi referido anteriormente, devido à sua biocompatibilidade, biodegradabilidade e bioactividade, é cada vez mais tido em conta como um poderoso biomaterial (Rinaudo, 2006).

O grau de desacetilação é um parâmetro estrutural cuja caracterização é fundamental, pois influencia as propriedades físico-químicas e mecânicas do polímero, bem como o peso molecular, do qual dependem a deformação máxima antes da fractura e a resistência à tracção do mesmo. Estes parâmetros combinados influenciam também as propriedades biológicas do quitosano, como a sua biodegradação, a promoção da cicatrização de lesões nos tecidos biológicos e, mais especificamente, a osteogénese e angiogénese (Chatelet, Damour & Domard, 2000).

Muitas das aplicações do quitosano são limitadas por problemas de solubilidade, uma vez que este é insolúvel em meio neutro, condição em que enzimas fisiológicas exercem a sua actividade. Partindo do princípio que derivados de quitina e quitosano podem ser preparados com a finalidade de melhorar a sua solubilidade em água, as aplicações destes polímeros podem aumentar significativamente (Silva *et al.*, 2006).

Tabela 1.2 - Aplicações do quitosano

Área de Aplicação	Uso Específico
Tratamento de Águas	Agentes de coagulação/floculação para águas residuais poluídas
	Remoção/recuperação de iões metálicos de águas residuais poluídas
Agricultura	Herbicida/pesticida
	Revestimento de sementes
	Fertilizante
Papel/Têxtil	Fibras para têxteis
	Papel e filmes
Biotecnologia	Cromatografia
	Material de imobilização enzimática
Alimentar/Suplementos	Espessantes naturais
	Aditivos alimentares
	Processamento de alimentos
	Filtração e clarificação
	Agentes de absorção de gorduras
Cosméticos	Condicionadores para cabelo e pele

Tabela 1.3 - Relação entre as propriedades do quitosano e as suas possíveis aplicações biomédicas (Rinaudo, 2006)

Aplicações Biomédicas	Características Principais
Suturas cirúrgicas Implantes dentários Pele artificial Reconstrução do osso Lentes de contacto Libertação controlada de fármacos Material de encapsulamento	Biocompatível Biodegradável Renovável Capacidade de formar filmes Agente hidratante Não é tóxico, tolerado biologicamente Hidrolisado pela lisozima Potencia a regeneração de tecido lesado Eficiente contra bactérias, vírus e fungos

Um dos objectivos do presente trabalho passa por obter quitina e quitosano com um grau de pureza próprio para aplicações do foro biomédico, encontrando-se essas especificações na tabela 1.4. Deste modo todas as etapas de extracção têm como objectivo remover quantitativamente todos os elementos ligados à quitina. Os mais relevantes neste processo de extracção são o carbonato de cálcio, proteínas e pigmentos, mas para a obtenção de grau médico todos os minerais e elementos têm que ser equacionados.

Embora existam diversos métodos referidos na literatura, todos eles produzem efeitos mais ou menos negativos na molécula, e que não podem ser evitados seja por diminuição do peso molecular ou grau de desacetilação. É por isso que ainda existe o interesse em optimizar a extracção de forma a evitar a degradação da molécula de quitina e ao mesmo tempo levar o nível de impurezas a um mínimo satisfatório para aplicações biomédicas (Percot *et al.*, 2003; Tolaimate *et al.*, 2003).

Tabela 1.4 – Especificações de quitosano com grau médico PROTASAN CL113 (NOVAMATRIX)

QUITOSANO GRAU MÉDICO	
Aparência do Pó	Branco
Aparência da Solução	Límpida e transparente ou ligeiramente amarelada
Grau de Desacetilação	75-90%
Matéria Seca	>90%
Cinzas	<1%
Proteínas	<0,3%
Endotoxinas	<100 EU/g
Metais Pesados	<40 ppm
Chumbo	<10 ppm
Mercúrio	< 1 ppm
Contagem Total de Bactérias Aeróbias)	< 100 cfu/g
Fungos	< 100 cfu/g

Para melhor compreensão das etapas necessárias à extracção de quitina e produção de quitosano, importa saber a constituição específica do material a tratar. Rhazi *et al.*, 2000, fizeram uma análise exaustiva de diversas cutículas de

crustáceos e cefalópodes associando-as a diferentes necessidades de tratamentos uma vez que cada cutícula apresenta uma diferente composição de elementos. No presente trabalho foi dada maior importância aos exoesqueletos de camarão, mais especificamente da espécie *Pandalus Borealis*. Na Figura 1.5 encontra-se resumida a composição da cutícula do crustáceo referido, sendo esta sazonal.

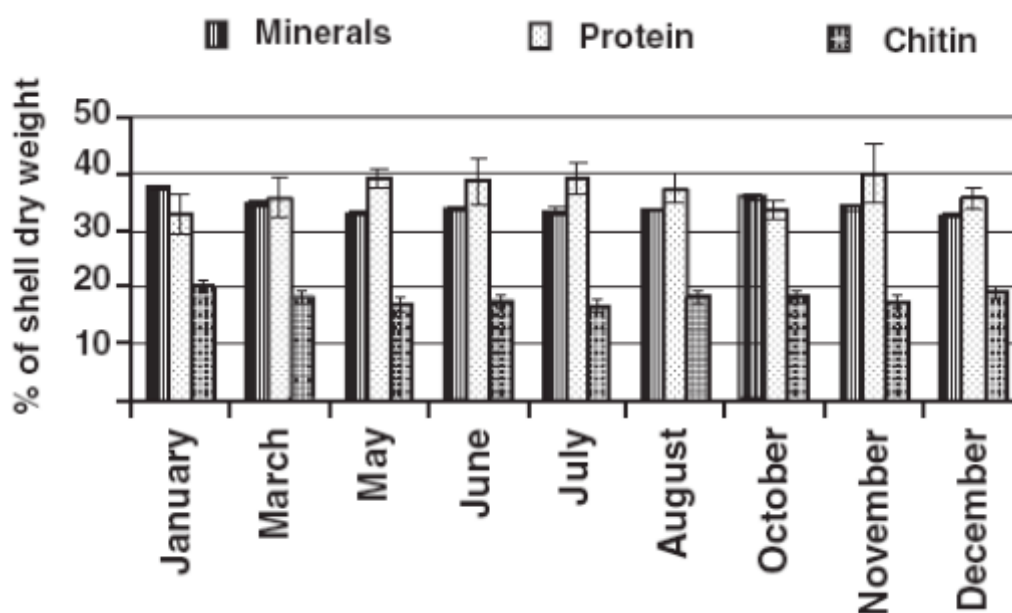


Figura 1.4 – Composição em percentagem de peso seco de minerais, proteínas e chitin quitina extraídos em condições industriais no ano 2000 de casca de camarão (adaptado de Rodde *et al.*, 2008)

A decisão pelo estudo desta fonte está relacionado com objetivos empresariais, uma vez que se trata de uma fonte abundante proveniente de resíduos da indústria alimentar que no âmbito de um projecto empresarial assume uma preponderância decisiva face à disponibilidade da matéria prima. Empresas de transformação alimentar recebem a referida espécie de camarão e procedem ao seu descasque para aproveitamento do miolo, não dando até ao momento um fim específico à casca. Parte do objectivo do presente trabalho está relacionado com o aproveitamento destes resíduos da indústria alimentar para a produção de compostos de valor acrescentado.

Outro factor determinante é a origem geográfica da fonte, de grande importância

para a pureza final dos produtos e a economia do processo. A cutícula de crustáceos é o receptor natural e “armazém” de poluentes e outros elementos presentes nas águas de cultivo da espécie, justificando deste modo a procura de espécies cultivadas em águas limpas. A espécie estudada tem origem em águas virgens do ponto de vista industrial, deste modo originando casca mais pura e com menor necessidade de purificação.

O procedimento típico de produção de quitosano de casca de crustáceos, consiste em 4 etapas básicas (Fig.1.5): Desmineralização (DM), Desproteínização (DP), Descoloração (DC) e Desacetilação (DS), existindo possibilidades de adição ou supressão de etapas:

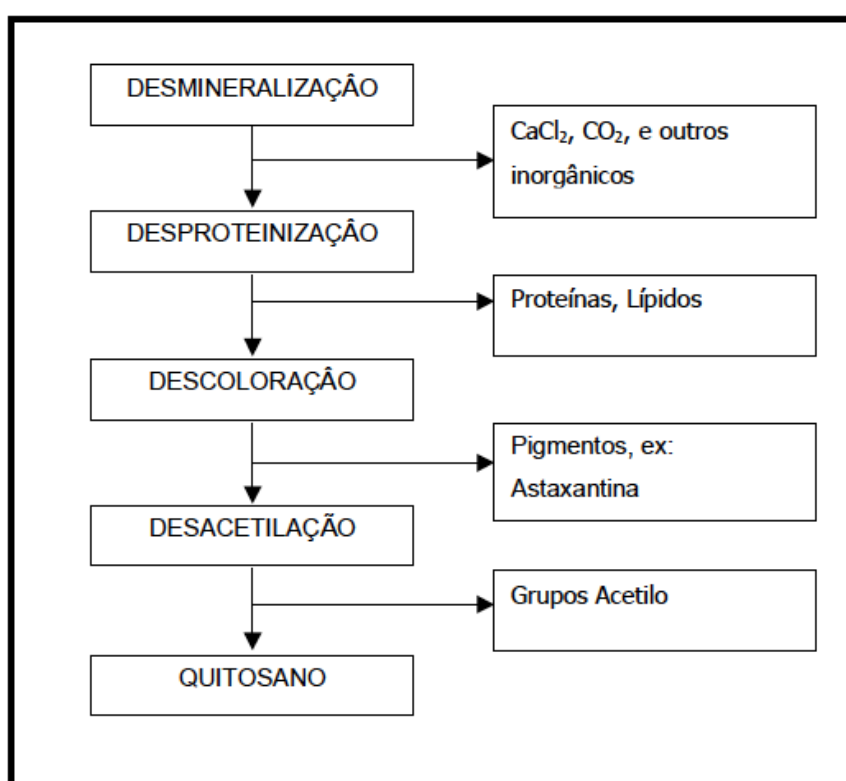


Figura 1.5 - Diagrama esquemático do processo de extração de quitina e produção de quitosano

- Pré-tratamento

É considerado pré-tratamento qualquer etapa anterior ao início da extração de quitina.

- **Lavagem**

Mukherjee utilizou um método de lavagem que consistia em colocar os resíduos alimentares em água a 80°C, durante uma hora, com uma razão de 1 kg para 10 Litros. (Mukherjee, 1996) Willem Stevens apresentou uma forma de pré-tratamento para casca de camarão com o objectivo de diminuir a carga de reagentes durante a extracção (Stevens et al., 2006). O tratamento apresentado era a lavagem da casca com ácido acético (0,05 M) ou ácido benzóico (0,016M) de forma a obter uma diminuição controlada da massa da casca, em que através de uma posterior lavagem da casca eram eliminadas até cerca de 40% de proteínas, obtendo-se ainda uma substancial redução da composição mineral. No entanto, a maior parte dos autores apenas recorre a água destilada para proceder à lavagem da casca. Se as propostas forem analisadas tendo em vista uma produção à escala industrial verifica-se que requerem grandes volumes de soluções e de água para efectuar este tratamento. É importante determinar a utilidade real deste passo, uma vez que a casca proveniente da indústria transformadora é consideravelmente mais limpa que a casca proveniente da indústria hoteleira, não apresentando óleos e detritos alimentares e com uma relação da quantidade de casca para miolo, superior.

- **Secagem**

O objectivo principal desta etapa é remover a humidade da casca e torná-la quebradiça para a moagem. Com um eficaz processo de secagem é possível armazenar casca seca durante longos períodos de tempo sem que esta se degrade. Mukherjee patenteou um processo de pré-tratamento que consistia em modificar a estrutura cristalina da quitina para amorfa secando a casca a uma temperatura de cerca de 80°C durante 48h e em seguida efectuar um rápido arrefecimento da casca de forma a “congelar” o novo arranjo amorfo. A teoria base desta proposta de prétratamento está relacionada com o facto de a casca com estrutura amorfa ser mais susceptível ao ataque químico e desta forma necessitar de menor carga de reagentes para a purificação (Mukherjee, 1996).

Percot e colaboradores, adicionam NaCl a cascas e deixam-nas a secar durante 2-3 dias, procedendo de seguida a uma lavagem e posterior liofilização (Percot et al., 2003). À primeira vista o processo de secagem ao sol parece ser uma forma de

poupar energia, necessitando-se contudo de uma área elevada de exposição solar para quantidades elevadas de casca. No entanto, no seguimento do processo as cascas são novamente lavadas e secas pelo que se presume que a secagem ao sol poderá influenciar as características finais do biopolímero, nomeadamente a coloração.

Tolaimate e colaboradores, afirmam que as cascas secas podem ser armazenadas por tempo indeterminado (Tolaimate et al., 2003).

Youn e colaboradores, provaram que a irradiação ultra violeta em partículas de quitosano promove a descoloração, dispensando etapas de branqueamento e consequentemente obtendo-se pesos moleculares mais elevados devido à despolimerização que tais técnicas provocam (Youn et al., 2007). Assim, abre-se uma possibilidade de investigar um método de branqueamento com uso de luz solar, naturalmente rica em UV, mas numa fase mais precoce do processo e sem o recurso à lavagem, com a introdução de uma fase líquida, tal como foi realizado pelos autores anteriores, sem que tenham integrado qualquer resultado prático desse pré-tratamento nos processos existentes.

De qualquer forma, e atendendo aos volumes de casca em jogo para uma unidade de produção industrial, o uso de uma estufa de secagem do tipo de pratos e o recurso a temperaturas entre os 60-80°C parece ser um método eficaz para esta etapa.

- **Moagem**

O objectivo desta etapa é reduzir a casca a pó, sendo tal vantajoso por diversas razões. A primeira relaciona-se com o facto de a casca inteira necessitar de volumes de armazenagem elevados. Outra é a tentativa de melhorar aspectos difusionais relacionados com as reacções de purificação seguintes. A moagem é feita com recurso a moinho de lâminas uma vez que se trata de um material fibroso. Percot e colaboradores reduziram o diâmetro de partícula da casca a 80µm; embora os autores não relacionem este facto com os resultados obtidos, é, como já foi referido, de prever que um menor diâmetro de partícula tenha influência nos aspectos difusionais nas reacções de extracção. Este tamanho de partícula foi obtido por criomoagem sob azoto líquido, evitando-se a degradação do polímero (Percot et al., 2003).

- **Desmineralização**

Esta parte do processo visa a remoção da parte mineral presente na casca. Genericamente esta etapa é normalmente efectuada com recurso a ácidos como HCl, HNO₃, H₂SO₃, CH₃COOH e HCOOH, sendo o HCl o ácido mais comum, com concentrações entre 0,275 e 2M, com tempos que variam de 15min a 48h, a temperaturas ambiente ou mais baixas, tabela 1.5. No entanto, as condições mais severas devem ser evitadas pois provocam forte despolimerização das moléculas de quitina. Alguns grupos demonstraram que este passo tem um impacto determinante no peso molecular tendo verificado que a viscosidade do quitosano baixa com o aumento do tempo de exposição do polímero a HCl, bem como com o aumento da concentração de HCl (Madhavan et al., 1974 ; Moorjani et al., 1975).

Em alternativa, e de modo a evitar esta quebra de peso molecular do polímero foi sugerido por Roberts e colaboradores a utilização de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), que torna o processo mais brando mas menos eficiente. (Roberts et al., 1997)



Esquema 1 - Reacção de descalcificação com ácido clorídrico

Tabela 1.5 – Resumo das condições utilizadas no processo de desmineralização de casca de camarão por outros autores.

Autor	Reagente	Concentração (M)	Tempo (min)	Número de etapas	Rácio g/mL	Temperatura
Vários autores	HCl	0,25-2,0	15-300	1-3	1/10-1/40	ambiente
Roberts, 1997	EDTA	1,0	30	1	1/15	ambiente

A eficiência do processo é facilmente avaliada através de métodos sensíveis como absorção atómica, que identifica a presença de minerais com rigor até partes por milhão e por espectrometria atómica por emissão de plasma, ICP, que o permite fazer até partes por bilião.

- **Desproteínização**

O objectivo desta etapa é remover a fracção proteica da casca, sendo necessário a destruição de fortes ligações covalentes entre a quitina e as proteínas. Esta separação realiza-se com alguma dificuldade. Quando estão em causa aplicações biomédicas, a remoção completa das proteínas é essencial, pois certos componentes destas são os principais responsáveis pela existência de tantos casos de alergias respeitantes a marisco na população humana¹ (Khor, 2001). Para tal habitualmente usam-se tratamentos alcalinos embora outros tenham sido publicados. Tipicamente a casca é tratada com soluções aquosas de NaOH 1M durante 1-72h e a temperaturas que variam dos 65 aos 100°C, tabela 1.6. Outro método alternativo e interessante, envolve a degradação enzimática de proteínas; no entanto o nível residual de proteínas, cerca de 1 a 7%, não é satisfatório e o tempo de reacção é superior quando comparado ao método químico (Bustos, 1994). Deste modo a eficiência da desproteínização enzimática exclui a possibilidade do uso industrial (Percot et al., 2003).

Tabela 1.6 - Resumo das condições usadas no processo de desproteínização da casca de camarão por outros autores.

Autor	Reagente	Concentração (M)	Tempo (min)	Razão (g/mL)	Temperatura (°C)
Vários autores	NaOH	0,3-5,0	60-360	1/10 - 1/20	65-100
No et al., 2003	NaOH	0,75	30	1/10	121°C/15psi
Shahidi et al., 1991	KOH	1%	120	1/20	90

No e colaboradores, experimentaram obter quitosano directamente após a desmineralização, uma vez que o reagente usado na desacetilação, o hidróxido de sódio, é usualmente o mesmo, mas consideravelmente mais concentrado, sendo a temperatura semelhante ou superior (No et al., 2003). Os resultados obtidos indicaram que a pureza no que toca à presença de proteínas é idêntica. A

solvente (Campana-Filho, 2007). Na tabela seguinte são apresentados os principais métodos de descoloração referidos na literatura.

Tabela 1.7 - Métodos de descoloração (adaptado de Youn *et al.*, 2006)

Solvente	Autor
Etanol e Éter	Hackman, 1954
Hipoclorito de Sódio	Blumberg <i>et al.</i> , 1951 No <i>et al.</i> , 2003
Acetona Absoluta	Kamasastri <i>et al.</i> , 1961 Mima <i>et al.</i> , 1983
Clorofórmio	Anderson <i>et al.</i> , 1978
Péroxido de Hidrogénio	Brine <i>et al.</i> , 1981 Moorjani <i>et al.</i> , 1975
Acetato de Etilo	Brzeski, 1982

Alternativamente, foi primeiramente proposto por Sionkowska, a remoção destes pigmentos recorrendo a luz solar, sendo a despigmentação provocada pela radiação UV própria da luz solar (Sionkowska *et al.*, 2006). Nadarajah e colaboradores, demonstraram que os agentes de branqueamento reduzem de forma significativa a viscosidade do quitosano (Nadarajah *et al.*, 2006). Youn e colaboradores, publicaram um estudo que explica que a descoloração por luz UV se deve à destruição, por oxidação das duplas ligações presentes na astaxantina, sendo um mecanismo semelhante ao que ocorre com solventes branqueadores à base de cloro (Youn *et al.*, 2007).

Em termos comparativos a viscosidade do quitosano, que é indicador do peso moléculas, descolorado por UV durante 5 min apresenta o valor de 1288 mPa.s enquanto que quitosano tratado com 10% de hipoclorito de sódio durante 5 min apresenta 34 mPa.s. (Youn *et al.*, 2008).

- **Desacetilação**

O objectivo desta etapa é obter quitosano através da reacção de desacetilação também denominada por hidrólise alcalina da quitina em que, como referido

anteriormente, a definição de quitosano está relacionada com o grau de desacetilação, isto é a quantidade de grupos acetilo ainda presentes na ligação com o grupo azoto do carbono na posição 1. O principal objectivo desta modificação da molécula de quitina é aumentar a solubilidade da mesma.

Esta reacção visa a remoção do grupo acetilo substituindo-o por um átomo de hidrogénio, sendo tal feito pela utilização de uma base forte. Broussignac em 1968 propôs a primeira reacção de desacetilação, em meio quase anidro, com o uso de KOH (50% p/p), etanol 96% (25% p/p) e monoetileno glicol (25% p/p) a 90°C, e com uma razão de 1mg de quitina para 60mL de solvente. Alternativamente Kurita e colaboradores, propuseram que a reacção fosse feita em meio aquoso, apenas com recurso a NaOH 50% (p/v), com temperaturas acima dos 80°C, em atmosfera de azoto e com rácios semelhantes (Kurita *et al.*, 1993).

Na produção de quitosano esta é habitualmente considerada a etapa chave, uma vez que através do controlo de parâmetros como rácio, temperatura, tempo, número de etapas e ainda concentração de base é possível influenciar características como o peso moléculas, grau de desacetilação e polidispersão e assim obter um quitosano com as características desejadas para determinada aplicação.

Deste modo, muitos estudos têm sido feitos de forma a otimizar esta última reacção, mas todos são meras adaptações ou optimizações dos seguintes estudos:

Tabela 1.8 - Resumo das condições usadas no processo de desacetilação por outros autores;

Autor	Reagente	Concentração (M)	Razão (g/mL)	Temperatura (°C)
Broussignac, 1968 α -quitina	KOH 50%(p/p) EtOH 25%(p/p) Monoetilenglicol 25%(p/p)	-	1/60	90°C
Kurita, 1993 α -quitina	NaOH	12,5	-	>80°C
Kurita, 1993 β -quitina	NaOH	12,5	-	>80°C

A quitina proveniente de lulas (*Loligo Vulgaris*), quando comparada com a α -quitina, é mais susceptível à reacção de desacetilação devido às já referenciadas fracas

ligações intermoleculares. O quitosano obtido a partir de β -quitina tem a tendência em se apresentar com uma leve tonalidade acastanhada, em situações similares ao obtido pela α -quitina, que por sua vez é obtido sem o produto final apresentar essa cor. Para contrariar este facto, deverão ser utilizadas condições menos agressivas de desacetilação quando se trabalhar com a β -quitina, como uma temperatura de desacetilação mais baixa, por exemplo de 80°C (Kurita, 2006; Kurita *et al.*, 1993).

Na Figura 1.7 é possível observar a influência da etapa de desacetilação para os dois principais tipos de quitina. Estudos referentes ao processo de desacetilação dos dois tipos de quitina têm sido referidos por diversos autores, sendo dado como exemplo os realizados por Lamarque e colaboradores (2004a, 2004b e 2005).

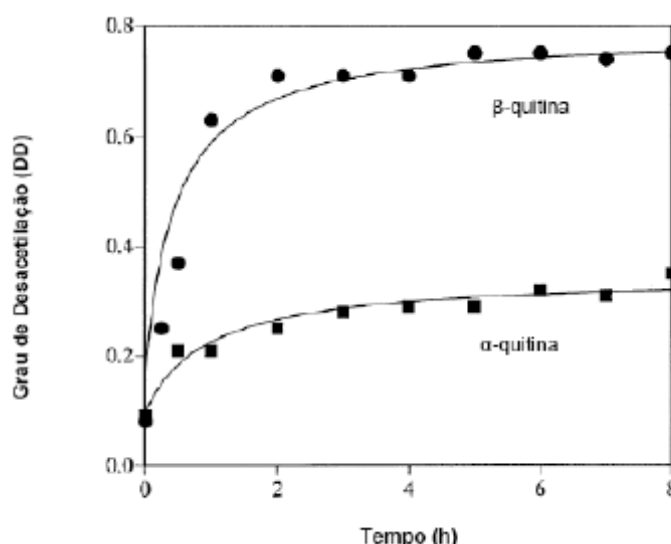


Figura 1.7 - Desacetilação de α -quitina e β -quitina com NaOH a 30% (p/v) a 100°C (adaptado de Kurita, 2001).

A rede cristalina foi um parâmetro chave na compreensão da diferente reactividade química observada para os dois tipos de quitina durante uma primeira desacetilação heterogénea (Lamarque *et al.*, 2004a). De igual modo, é também salientado que foi graças à separação sistemática entre materiais solúveis e insolúveis em água (em pH 8.5) de cada desacetilação, recolhidos depois da neutralização do meio reaccional, que se conseguiu determinar que a desacetilação heterogénea da quitina conduz a uma importante composição e a heterogeneidades estruturais. A estrutura e a microestrutura dos materiais solúveis e insolúveis em água (em pH 8.5) dos dois tipos de quitina foram estudados com o recurso a difracção de raios X e a

espectroscopia de ressonância magnética nuclear (H^1 RMN). Relativamente às fracções insolúveis de α -quitina, foi demonstrado que as regiões amorfas foram primeiramente desacetiladas relativamente à rede cristalina, a qual ficou aparentemente preservada. Este mecanismo leva ao bloqueio de copolímeros de unidades N-acetilglucosamina e N-glucosamina. Após o colapso da rede cristalina da α -quitina devido à acção da solução alcalina, a desacetilação ocorre homogeneamente por toda a amostra. Por outro lado, como já foi referido, graças às

suas ligações mais fracas e estrutura penetrável, as fracções de β -quitina não solúveis em água tornam-se totalmente amorfas pouco tempo depois do início da reacção. Esta situação resulta num mecanismo simples para a formação de copolímeros aleatórios de unidades N-acetilglucosamina e N-glucosamina (Lamarque *et al.*, 2004a, 2004b).

De facto existem diversas adaptações dos métodos anteriormente descritos, o que torna difícil a selecção de um determinado método óptimo para a execução desta etapa. Da mesma forma torna-se complicado comparar resultados de grau de desacetilação ou peso molecular obtidos experimentalmente com os que são apresentados na literatura uma vez que existem diversos factores que influenciam as características finais do quitosano. A título de exemplo a sazonalidade da casca q é o suficiente para influenciar os referidos resultados (Rodde *et al.*, 2008)

1.2. Procedimento Experimental

A casca de camarão da espécie *pandalus borealis* é a matéria prima em estudo no presente trabalho. Esta casca tem proveniência do mar do norte e foi pescada em águas consideradas limpas do ponto de vista industrial. A empresa Pró Pesca, Peniche dedica-se à comercialização de produtos do mar, nomeadamente miolo de camarão, sendo o camarão descascado e congelado. A casca, habitualmente descartada, foi congelada para seu aproveitamento.

Deste modo, a casca em questão é expedida congelada em caixas de esferovite, em carro refrigerado, chegando à empresa Ceramed em óptimo estado de conservação. Parte desta casca recebida foi alvo dos estudos do presente trabalho. Como foi referido na literatura o método de extracção de quitina e quitosano está amplamente estudado. Desse modo e com base nos estudos feitos anteriormente, pensou-se em desenvolver um método simples e económico, que fosse possível executar à escala industrial e que fosse simultaneamente flexível no que toca às duas principais características do polímero quitosano a obter, o grau de desacetilação e o peso molecular.

1.2.1 Extracção de Quitina e Produção de Quitosano

- **Pré-tratamento**

Considera-se que o bom acondicionamento inicial da casca faz diferença no seu tempo de validade. É ainda mais económico armazenar a casca seca e moída, do que inteira e congelada, devido ao consumo de energia e espaço necessário para arcas frigoríficas.

Assim, a casca recebida foi imediatamente descongelada e lavada com água quente, seguindo-se uma etapa de secagem durante 24h. Ao fim de seca, as cabeças foram separadas do resto do corpo, não sendo aproveitadas para o resto do trabalho. A razão para tal é que no presente estudo pretende-se trabalhar com a casca o mais pura possível e a cabeça do camarão possui grandes quantidades de miolo, fracção donde não é possível extrair quitina. A casca seca foi então triturada e moída, com um moinho de lâminas Reutsch SM1000, sendo seleccionada para processamento a fracção de casca com diâmetro de partícula entre 250 μ m e 1000 μ m.

- **Desmineralização**

Esta etapa é de vital importância para a qualidade final do produto, pois é a oportunidade de remover a maior parte dos minerais presentes na casca. No entanto, o contacto prolongado da casca com o ácido usado limita o peso molecular final. Tal facto não tem forçosamente que ser um obstáculo mas algo que pode ser vantajoso para determinar as características finais do produto em termos de peso molecular. As condições iniciais foram escolhidas com base no trabalho de Percot. (Percot *et al.*, 2003).

Tabela 1.9 – Aferição das condições experimentais do processo desmineralização

Autor	Amostra	Condições				Etapas
		Concentração de HCl (M)	Razão	Temperatura (°C)	Tempo (min)	
Percot <i>et al.</i>	1	0,25	1/40	25	20	1
No <i>et al.</i>	2	1,0	1/20	25	20	1
Este trabalho	3	1,0	1/40	25	20	1

Tabela 1.10 - Condições experimentais do processo de desmineralização

Amostra	Condições				
	Concentração de HCl (M)	Razão (g/mL)	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Etapas
A	1,0	1/40	25	20	1
B	1,0	1/40	25	60	1
C	1,0	1/40	25	120	1
D	1,0	1/40	25	240	1
E	1,0	1/40	25	1440	1

No final de cada desmineralização, cada amostra foi cuidadosamente filtrada, neutralizada com água destilada e seca a 40°C até peso constante.

- **Estudo Cinético da Desmineralização**

O estudo cinético da reacção de desmineralização consistiu na determinação da constante cinética, da ordem da reacção e da energia de activação, para o que foram realizados os ensaios que a seguir são descritos.

A casca seca e moída foi seleccionada com peneiros a fim de separar a fracção com diâmetro de partícula entre os 250 e os 300 μm . Foram colocados 0,1g de casca de camarão em tubos de ensaio e estes num banho à temperatura da experiência, a qual variou entre 5°C e 30°C. De seguida adicionou-se a cada um 4mL de HCl 1,0M, à temperatura em estudo e prefazendo a razão de 40 mL/g. Foi utilizada agitação magnética com uma velocidade de 1100 rpm, uma vez tratar-se de uma reacção heterogénea, envolvendo uma fase sólida, a casca, uma fase líquida, o solvente aquoso de HCl, e uma fase gasosa, dióxido de carbono que se liberta durante a reacção. Ao fim de um determinado tempo juntou-se 5 mL de NaOH 1,0 M a fim de parar a reacção. De seguida os tubos foram centrifugados para promover a separação dos solventes da casca. A casca desmineralizada obtida em cada tempo foi seca e a determinação do cálcio nela contida foi realizada por espectrometria atómica de emissão por plasma, ICP-AES (num aparelho de marca Jobyn – Yvon, modelo Ultima), após digestão de cada amostra. A digestão consistiu na destruição de toda a matéria orgânica com HCl à ebulição, em vaso fechado sob pressão, durante 4 horas.

Tabela 1.11 - Condições experimentais do processo de determinação da constante cinética de desmineralização, Amostras X,i (X=F,G,H,I,J,K, i=5,22,30)

Amostra	Condições				
	Concentração de HCl (M)	Razão (g/mL)	Temperatura (°C)	Tempo (s)	Etapas
F,i	1,0	1/40	5, 22, 30	20	1
G,i	1,0	1/40	5, 22, 30	40	1
H,i	1,0	1/40	5, 22, 30	60	1
I,i	1,0	1/40	5, 22, 30	120	1
J,i	1,0	1/40	5, 22, 30	180	1
K,i	1,0	1/40	5, 22, 30	300	1

• Desproteínização

No seguimento do trabalho efectuado por outros autores, a mesma desproteínização foi efectuada em todas as amostras. Nesta etapa apenas se pretende remover um valor considerável de proteínas possível, uma vez que na reacção de desacetilação existe a possibilidade de remoção total. O efeito do reagente e da concentração utilizados não é considerado dramático para a qualidade final do produto, em comparação com o processo de desmineralização (Percot, 2003)

Amostras provenientes dos processos A, B, C, D e E foram todas desproteínizadas nas mesmas condições, numa única etapa, a 70 °C, durante 120 minutos, utilizando NaOH 1,0M e uma razão 1/15 (g/mL).

No final de cada desproteínização, cada amostra foi cuidadosamente filtrada, neutralizada com água destilada e seca a 40°C até peso constante.

• Desacetilação

A desacetilação da quitina tem um forte efeito em duas das principais características do produto final, sendo uma o grau de desacetilação e outra o peso molecular. Habitualmente, na literatura são referidos estudos que visam estudar o efeito da desacetilação nas duas características indicadas, sendo que se procuram métodos para obter diferentes graus de desacetilação para diferentes pesos moleculares. Teoricamente é sabido que o mesmo processo de desacetilação empregue em

amostras diferentes de quitina resulta em graus de desacetilação semelhantes e perdas de peso moléculas da mesma ordem de grandeza. Em consequência, foi aplicado o mesmo processo de desacetilação em todas as amostras, esperando-se desta forma que seja a desmineralização a principal responsável pela perda de peso moléculas, e a desacetilação a principal responsável pelo aumento do grau de desacetilação.

Amostras provenientes de quitina provenientes dos processos A, B, C, D e E foram todas desacetiladas nas mesmas condições, numa única etapa, a 100 °C, durante 180 minutos, utilizando NaOH 12,5M e uma razão 1/15 (g/mL).

No final de cada desacetilada, cada amostra foi cuidadosamente filtrada, neutralizada com água destilada e seca a 40°C até peso constante.

1.2.2. Caracterização dos Polímeros

Segundo Lamarque *et al.* (2004), as propriedades destes polímeros dependem fortemente do grau de desacetilação e do seu peso moléculas médio, estando directamente relacionados com o comportamento físico-químico e a sua actividade biológica. Assim, é pertinente uma análise aos valores destas grandezas obtidos para os polímeros sintetizados, com o intuito de prever o seu comportamento aquando da sua aplicação. Para a determinação do DD foi utilizada a técnica de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier, FTIR, e para a determinação dos pesos moléculares médios e da polidispersão foi utilizada a técnica de cromatografia de exclusão moléculas, SEC.

- FTIR

O espectro vibracional de uma moléculas é considerado uma propriedade física única e característica dessa moléculas. O espectro de infravermelho pode ser usado como uma característica de identificação fazendo-se a comparação do espectro conhecido com outros de referência. Na ausência de uma referência utilizável na identificação é possível realizar uma interpretação básica do espectro, levando à caracterização e à possível identificação da amostra desconhecida (Coates, 2000).

Actualmente o método para a determinação do DD mais discutido e abordado em publicações é a espectroscopia de infravermelho, baseada na quantificação da banda da *amida I* no espectro da quitina e quitosano (Khor, 2001; Rinaudo, 2006).

Um espectro de IR típico de uma amostra de quitina/quitosano encontra-se representado na Figura 1.8.

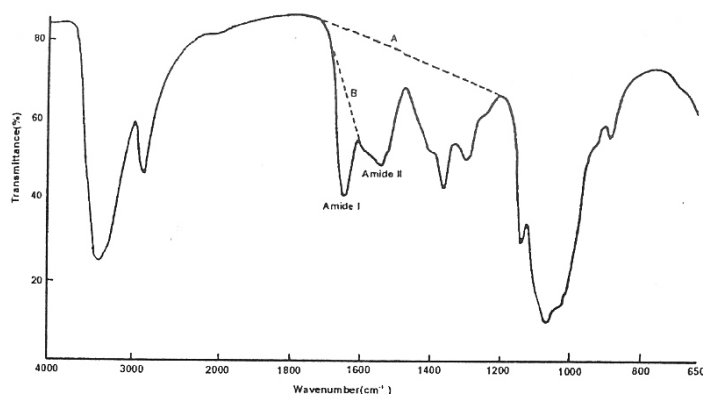


Figura 1.8 - Espectro de infravermelho típico de quitina/quitosano (Khor, 2001)

Este espectro evidencia bandas de absorção características deste tipo de polímeros, tais como: 1655 cm^{-1} → amida I; 1630 cm^{-1} → amida I; 1560 cm^{-1} → amida II; 3450 cm^{-1} → grupo hidróxilo; 2878 cm^{-1} → ligação C-H; 1160 cm^{-1} → banda de oxigénio; 1070 cm^{-1} → ligação C-O; 1030 cm^{-1} → ligação C-O; 897 cm^{-1} → ligação C-O. Estas bandas de absorção permitem a determinação do conteúdo em grupos *N*-acetilo, fazendo-se a razão entre as áreas de uma destas e outra banda de referência interna. A escolha da banda de amida é feita duma das três referidas e é utilizada em conjunto com uma banda de absorção interna como a do grupo hidróxilo a 3450 cm^{-1} , a ligação C-H a 2878 cm^{-1} , a banda de oxigénio a 1160 cm^{-1} e as bandas das ligações C-O a 1070 , 1030 e a 897 cm^{-1} (Khor, 2001; Rinaudo, 2006).

Quando se está a determinar o DD para polímeros com previsível alto grau de desacetilação, Domard & Rinaudo (1983) sugerem a utilização da banda de absorção da amida a 1655 cm^{-1} (amida Ia). Esta escolha deve-se ao facto de para um baixo grau de acetilação, predominar a banda de -NH_2 (1590 cm^{-1}) o que faz com que a banda da amida II fique mascarada, sendo difícil a sua utilização para o fim desejado (Domard et al., 1983).

Segundo Khor (2001) a banda do grupo hidróxilo a 3450 cm^{-1} é bastante visível e fácil de utilizar, sendo por isso a mais utilizada para determinar o DD. A banda de

absorção a 2878 cm⁻¹ é dependente do DD que origina vibrações na ligação C-H, o que faz com que seja necessário proceder a uma posterior calibração. A razão A₁₆₅₅/A₃₄₅₀, é até à data, a mais utilizada para a determinação da percentagem de N-acetilação. A principal reserva à utilização deste rácio deve-se à escolha da linha de base para a banda de absorção da amida I (Figura 1.8). Para um polímero totalmente desacetilado, esta linha de base A dá origem a um DD entre 95-97%, o que não é esperado pois a banda da amida I deveria estar ausente (Domard, 1987). Contudo, para amostras com DD menor que 80%, o DD calculado é semelhante ao obtido com outros métodos, demonstrando a utilidade desta razão para este tipo de amostras (Khor, 2001; Rinaudo, 2006).

A análise da Figura 1.8 permite observar que pode ser utilizada outra linha de base B, com o objectivo de se obterem resultados mais precisos para amostras com um DD maior que 90%, conservando-se as vantagens da utilização do método da razão A₁₆₅₅/A₃₄₅₀. Ao usar esta linha de base a equação para o cálculo do DD é a equação 1.1:

$$DD = 100 - DA = 100 - \left[\left(\frac{A_{1655}}{A_{3450}} \right) \times 115 \right] \quad \text{Equação 1.1}$$

- Procedimento FTIR:

Colocaram-se as amostras de quitosano (CS) em tubos *ependorf* tapados, com parafilme furado, numa pistola de secagem a vácuo, com pentóxido de fósforo, durante 48h, a fim de obter uma completa remoção da água adsorvida, a qual teria como consequência a quantificação da banda do grupo hidróxilo do polímero com erro.

Os espectros de FTIR foram obtidos num espectrofotómetro da marca *BIO-RAD FT-IR*, modelo *Spectrometer FTS 155*, a partir de pastilhas de KBr, para as quais foram pesados 0.1000g de KBr e 0.0010g de polímero a caracterizar. Para cada amostra foram obtidos cinco espectros entre 4000 e 400cm⁻¹, tendo sido realizados 60 varrimentos com uma resolução de 4 cm⁻¹

- SEC

Outra importante característica da quitina e do quitosano a ter em conta é o seu peso moléculár médio. A cromatografia de exclusão moléculár permite determinar ambas as médias de peso moléculár, em peso e em número, respectivamente M_w e M_n , bem como a distribuição de peso moléculár, MWD, e a polidispersão, $PD = M_w/M_n$, uma medida do grau de homogeneidade do polímero relativamente ao tamanho das cadeias que o constituem, Uma das principais dificuldades na determinação destes parâmetros está relacionada com a solubilidade das amostras e a não dissociação de agregados, usualmente presentes em soluções onde intervêm polissacarídeos (Rinaudo, 2006; Philippova *et al.*, 2001; Kurita, 2001).

Uma das razões para a dificuldade da determinação do peso moléculár da quitina na sua forma não refinada, é a sua associação com as proteínas e outras substâncias, só sendo possível a sua obtenção depois de esta sofrer tratamento de desproteínização. O peso moléculár da quitina isolada pode ser obtido de uma forma mais simples por viscosimetria capilar, devido às dificuldades de solubilização, mas apenas uma das médias. Essa determinação é realizada através da equação de Mark-Houwink-Sakurada, que relaciona a viscosidade íntrinseca, $[\eta]$, com o peso moléculár médio viscosimétrico (peso moléculár médio mais próximo do valor em número ou em peso, dependendo do método absoluto através do qual foram obtidos os pesos moléculares que permitiram a determinação das constantes de Mark-Houwink, K e a , válidas apenas para um par polímero/solvente a uma determinada temperatura (Equação 1.2), Geralmente utiliza-se como solvente DMAc/LiCl. Segundo Kurita (2001), pode ser também ser utilizado como solvente, metanol saturado com cloreto de cálcio di-hidratado.

$$[\eta]=KM^a \qquad \qquad \qquad \text{(Equação 1.2)}$$

Como se sabe, o quitosano é solúvel em soluções ácidas, sendo os seus pesos moléculares médios e a polidispersão obtidos pelas mesmas técnicas referidas para a quitina. Neste sentido, têm sido propostas várias equações de Mark-Houwink-Sakurada para soluções aquosas de ácido acético, ácido acético/acetato de sódio e de ácido láctico.

Quanto à escolha de solvente para a caracterização do quitosano relativamente aos vários métodos propostos, é sempre utilizada uma solução ácida para a protonação,

em conjunto com um sal com o intuito aumentar a força iónica do meio, promovendo uma maior solvatação das cadeias, com a consequente diminuição da formação de pontes de hidrogénio e de formação de microgéis..

Um dos primeiros solventes propostos foi uma solução de ácido acético 0,1M com NaCl 0,2M, tendo sido demonstrado que a sua utilização ainda permitia a formação de agregados, sendo os pesos moléculares obtidos por excesso. Com o objectivo de minimizar este problema, foi proposto como solvente uma solução de AcOH 0,3M com acetato de sódio 0,2M, não tendo sido encontrado para este qualquer formação de agregados (Rinaudo *et al.*, 1993). Este assunto tem sido amplamente estudado e referido na literatura, sendo possível encontrar bastante informação relativa a diferentes tipos de solventes e aos resultados obtidos aquando da sua utilização (e.g. Rinaudo, 2006).

- Procedimento SEC:

Os pesos moléculares médios e correspondentes distribuições foram determinados através de cromatografia líquida de exclusão molecular.

A análise foi realizada num equipamento modular de marca *Waters* com bomba modelo 510, injector *Rheodyne*, foi utilizada uma coluna linear *Waters Hydrogel* e um detector de índice de refração diferencial modelo 2410. Utilizou-se como solvente cromatográfico ácido acético 0,3 M com acetato de sódio 0,2 M, à temperatura de 30°C. As soluções foram filtradas utilizando filtros de membrana de porosidade 0.45µm. Foram injectadas amostras de polímero com a concentração de 0.1% (p/v) e um volume de 100µL. Os pesos moléculares foram determinados através de uma curva de calibração obtida com padrões de Pullulan. Ao longo de todo o trabalho os pesos moléculares médios indicados serão sempre valores de Mw.

1.3. Resultados e Discussão

1.3.1 Estudo da reacção de desmineralização

Relativamente às três condições ensaiadas (indicadas na Tabela 1.9), em cada uma das amostras avaliou-se a evolução do pH ao longo do tempo de reacção,, sendo os resultados obtidos apresentados na figura seguinte:

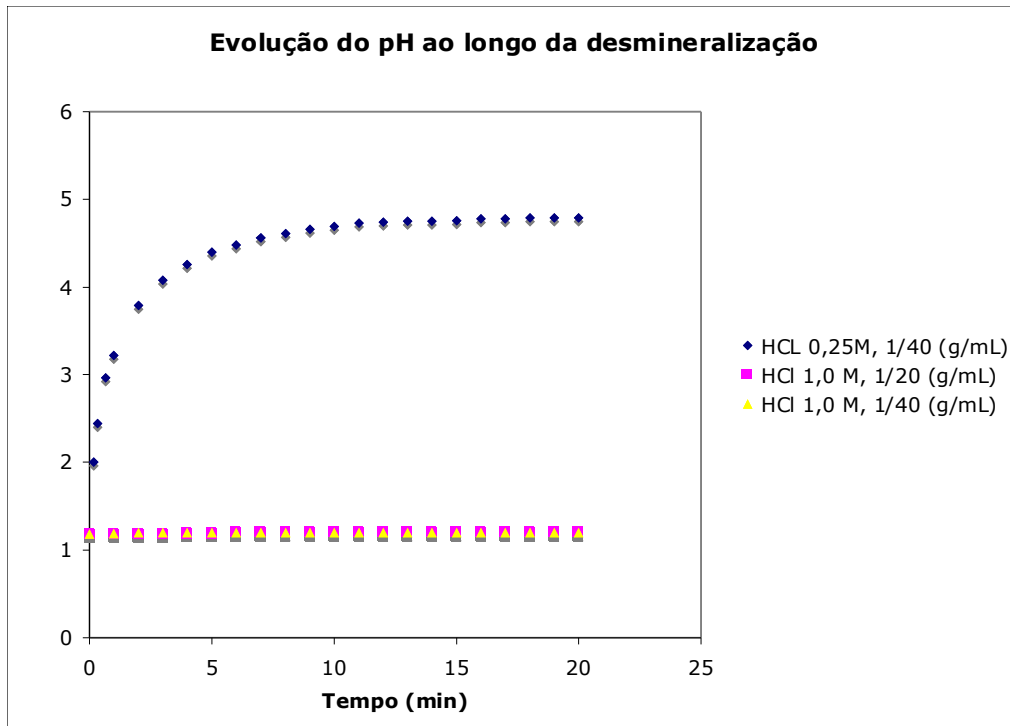


Figura 1.9 - Avaliação da evolução do valor de pH ao longo da reacção de desmineralização

Da evolução do valor de pH durante a desmineralização, registado na figura 1.9, verifica-se que o valor de pH para amostra 1 sobe muito rapidamente para valores acima de 2. Tal como foi indicado por Kjell M. Varum e Olav Smidsrod em 2005, o carbonato de cálcio perde para metade a sua solubilidade para valores de pH superiores a 2, pelo que é natural que a extensão da reacção não seja tão elevada quanto para as outras amostras. Para além deste factor importante, verifica-se que a razão entre os iões cloro e cálcio está abaixo do estequiométricamente necessário (Tabela 1.13). Esta hipótese foi verificada pela determinação da composição final de cálcio em cada uma das amostras por ICP (Tabela 1.12).

Tabela 1.12 - Valores em percentagem da quantidade de cálcio presente em cada amostra

Amostra	Valor inicial de cálcio e (total minerais) (%)	Valor final de cálcio (%)
1	33,9	7,9
2	(40,2)	2,0
3		0,2

Tabela 1.13 - Valores de quantidade de iões cálcio e cloro presentes na reacção de desmineralização

	Cloro (mol)	Cálcio (mol)	Razão Cl / Ca
Amostra 1	0,1	0,0845	1,05
Amostra 2	0,2	0,0845	2,1
Amostra 3	0,4	0,0845	4,2

Na tabela 1.12, verifica-se que o processo empregue na amostra 3 é mais eficaz na remoção de cálcio, apesar de menos económico pela maior quantidade de ácido utilizada. Na amostra 2, o pH mantém-se baixo, mas a quantidade de cloro presente em solução, apesar de superior em relação à quantidade de cálcio presente na casca, não é adequado para que a reacção seja suficientemente eficaz (Tabela 1.13). Este facto deve-se a que a constituição mineral da casca no valor de 40,2 %, apresenta apenas 33,9 % de cálcio, competindo desta forma, outros iões pelo ião cloro. De referir, que considerando o esquema reaccional da desmineralização indicado anteriormente (esquema 1, página 42), são necessários dois iões de cloro, para cada ião de cálcio (CaCl_2). Importa salientar que se trata de uma reacção heterogénea, pelo que limitações difusionais poderão estar na origem de uma desmineralização deficiente. Desta forma optou-se por incrementar a razão líquido/sólido para 40 de forma a minimizar ao máximo as camadas limites junto das partículas de casca. Em consequência, o processo 3 foi empregue para os restantes estudos.

Em termos cinéticos a reacção de desmineralização feita nas condições da amostra 3 (com largo excesso de ácido e considerando que a sua concentração se mantém aproximadamente constante), pode ser considerada elementar e de primeira ordem

relativamente ao cálcio e ordem zero relativamente ao ácido. Desta forma a lei de velocidade da reacção pode ser descrita como:

$$-\frac{d[\text{Ca}]}{dt} = k[\text{Ca}] \quad \text{(Equação 1.3)}$$

sendo k a constante cinética.

Como referido anteriormente, foi determinada, por ICP, a % de cálcio restante na casca ao longo da desmineralização de forma permitir realizar um estudo cinético da reacção a fim de determinar a constante cinética da reacção (k) e a sua dependência da temperatura (T), através da determinação da energia de activação (E_a) e do factor pré exponencial da lei de Arrhenius (A , uma medida do número de colisões entre as moléculas reagentes), a qual se encontra seguir indicada (sendo R a constante dos gases perfeitos):

$$k = A e^{-\frac{E_a}{RT}} \quad \text{(Equação 1.4)}$$

A amostragem foi realizada de uma forma descontínua, sendo cada ponto das curvas cinéticas o correspondente a uma reacção que foi parada ao fim de um tempo previamente estipulado, através da adição de NaOH, de forma a neutralizar o HCl ainda presente na reacção. A reacção é heterógena, envolvendo uma fase sólida, a casca, uma fase líquida, a solução de ácido clorídrico e uma fase gasosa, o CO₂ que se liberta. Desta forma a agitação utilizada foi elevada, tendo-se observado que apesar da libertação de CO₂ a casca ficava toda mergulhada no interior do solvente ao fim de poucos segundos. A curva cinética para as diferentes temperaturas encontram-se na figura 1.10. Da análise do referido gráfico, verificamos que existe uma queda abrupta da % cálcio na casca logo para os primeiros segundos de reacção, ocorrendo posteriormente um decaimento mais lento na velocidade da reacção de desmineralização, realizada a 5°C. Às temperaturas superiores testadas a conversão é praticamente completa, sobretudo a 22°C em que o desaparecimento total do cálcio é obtido ao fim de pouco mais de 100 segundos.. Dado não existirem na literatura curvas cinéticas relativas à desmineralização da casca de camarão, os presentes resultados foram comparados com o trabalho de Castro-Ceseña e colaboradores, referente à desmineralização do osso com ácido clorídrico. Os autores referem que a reacção ocorre a velocidades

iniciais muito altas, devido à presença de hidroxiapatite ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) em maior quantidade na superfície do osso. Posteriormente a velocidade diminui devido a questões difusionais no interior do osso, uma vez que se encontram moléculas de hidroxiapatite no interior da tripla hélice do colagénio tipo II (Castro-Ceseña et al., 2011).

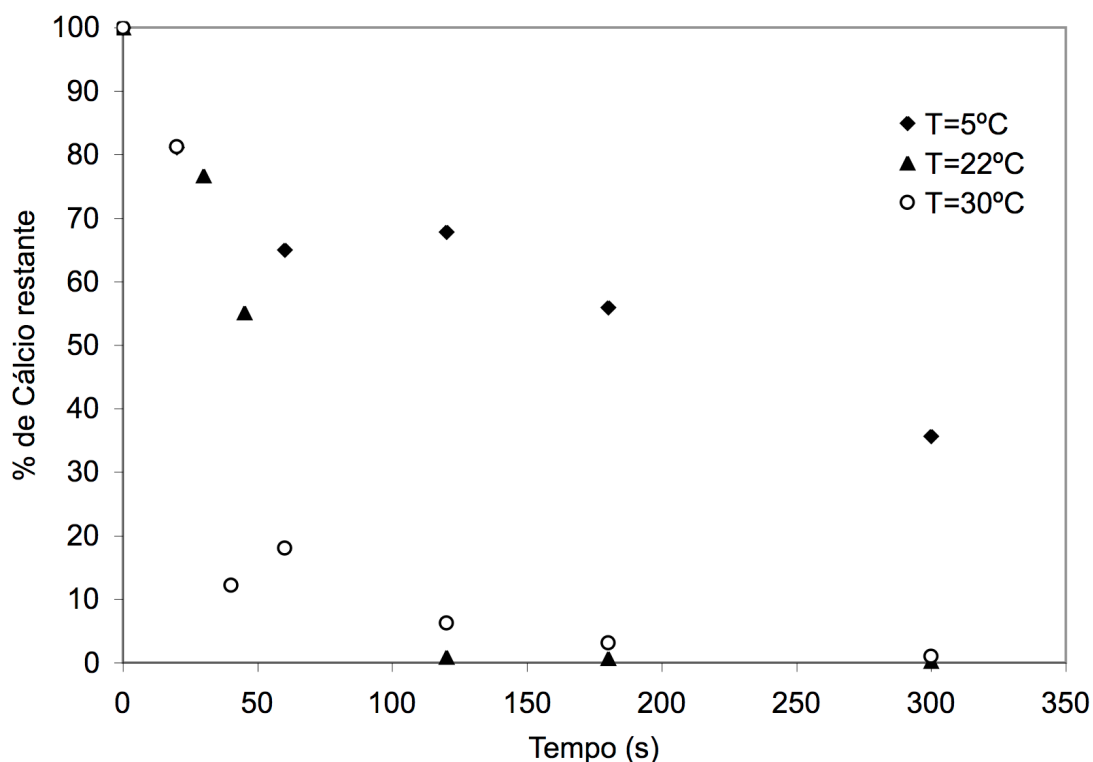


Figura 1.10 - Evolução da % Cálcio restante na casca em função do tempo, para as temperaturas de 5°C, 22°C e 30°C

Tal como referido por Belamie e colaboradores, a casca de camarão possui características morfológicas em tudo semelhantes ao osso humano, pelo que a mesma interpretação poderá ser considerada para a casca de camarão: que na primeira etapa existe uma grande quantidade de carbonato de cálcio à superfície da casca e que está pronto a reagir, e que o decaimento na velocidade da reacção está relacionado com a presença de partículas de carbonato de cálcio no interior das fibrilhas de quitina e por esse motivo mais inacessíveis, sendo esta etapa da reacção controlada pela difusão e não pela cinética (Belamie et al., 2004). Importa ainda lembrar que o quitosano pretendido pela CERAMED é de grau médico, pelo

que esta segunda etapa e o seu estudo se revelam determinantes para a obtenção de valores de % de cálcio suficientemente baixos.

Para o estudo cinético foi apenas considerada a primeira etapa. A constante cinética foi determinada pelo declive da recta que resulta da linearização das % de calico restantes na casca versus o tempo. Na figura 1.11 representam-se as rectas resultantes da linearização referida e na tabela 1.14 encontram-se os valores das constantes cinéticas determinadas e os correspondentes coeficientes de correlação.

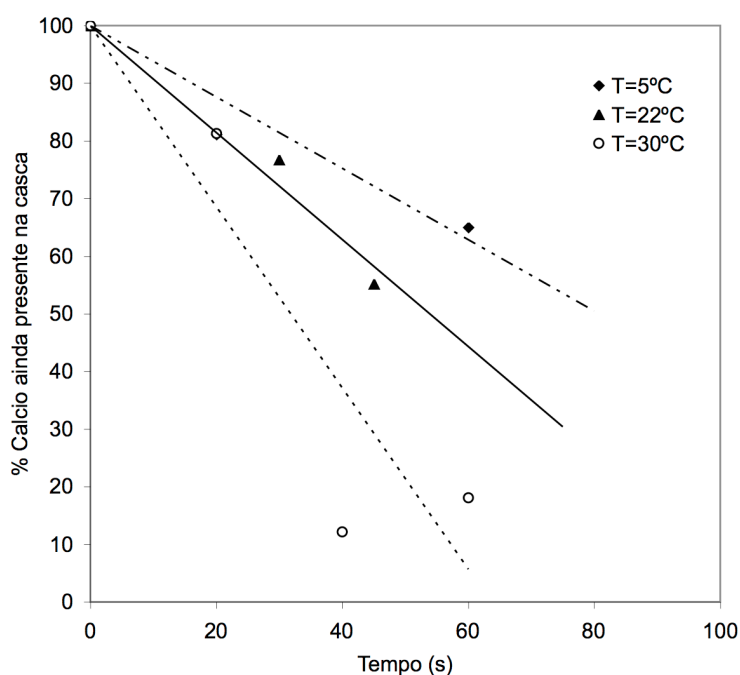


Figura 1.11 – Representação da linearização dos pontos iniciais da reacção de desmineralização às temperaturas de 5°C, 22°C e 30°C

Tabela 1.14 - Valores das constantes cinéticas determinadas para diferentes temperaturas

Temperatura (°C)	k (s ⁻¹)	R ²
5	0,619	0,924
22	0,928	0,969
30	1,572	0,841

Outros autores consideraram também a reacção de desmineralização da quitina como sendo de primeira ordem relativamente ao cálcio (Chang et al., 1997). Os

valores obtidos por estes autores para a constante cinética encontram-se entre 0,012 s⁻¹ e 1,02 s⁻¹. Estes valores são semelhantes aos obtidos para condições reaccionais que diferem unicamente na razão sólido/líquido, uma vez que estes autores nunca usam valores acima de 15 g/mL. A linearização da lei de Arrhenius traduzida pela equação 1.5), aplicada às constantes cinéticas determinadas permitiu a determinação da energia de activação e do factor pré-exponencial.

$$\text{Ln } k = \text{Ln } A - \frac{E_a}{R} \frac{1}{T} \quad (\text{Equação 1.5})$$

Na figura 1.12 encontra-se representada a linearização que conduziu aos valores de:

$$E_a = 5821 \text{ cal/mol e } A = 27447 \text{ s}^{-1}$$

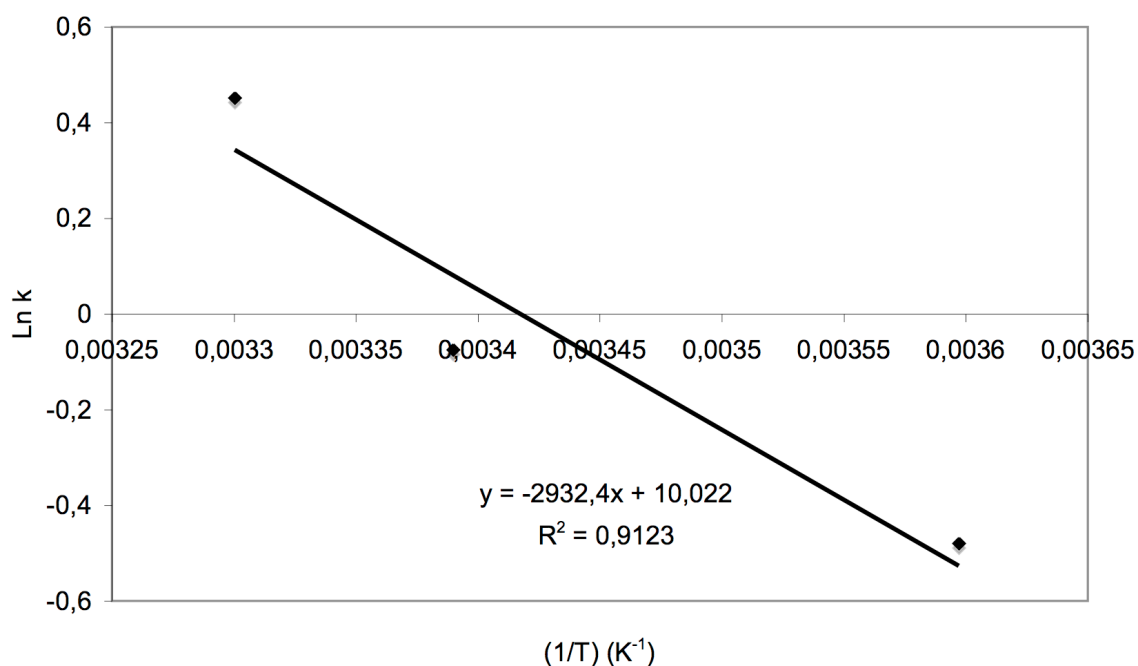


Figura 1.12 - Representação de Arrhenius para a reacção de desmineralização

No trabalho de Chang não foram apresentados valores para a energia de activação, não tendo sido encontrada na literatura qualquer referência a este valor. Foram, no entanto, encontrados dois estudos cinéticos realizados com base em medições de pH ao longo do tempo e para outra espécie diferente da utilizada neste trabalho (Percot et al., 2003; Choorit et al., 2008). Existem outros trabalhos sobre a desmineralização do osso, nos quais também a reacção foi considerada de primeira

ordem em relação ao cálcio (Figueiredo et al., 2011; Castro-Ceseña et al., 2011). Assim, não foi possível obter informação que nos permitisse comparar o valor obtido para a energia de activação.

1.3.2 Grau de Desacetilação

Com base no seguinte espectro de FTIR (figura 1.13) para cada uma das amostras determinaram-se os graus de desacetilação.

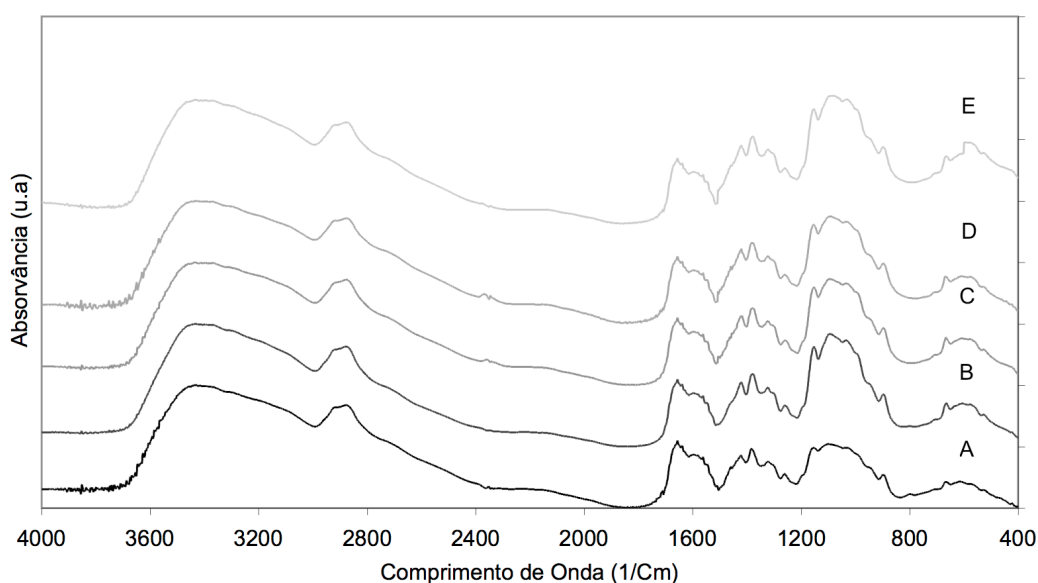


Figura 1.13 - Espectros de FTIR das 5 amostras de quitosano

Como referido anteriormente, os graus de desacetilação são determinados pela razão das áreas da banda de absorção do grupo amina e da banda de absorção do grupo hidroxilo, utilizando-se a equação 1.1, depois de traçadas as linhas de base.

Tabela 1.15 - Graus de desacetilação para cada amostra de quitosano

Amostra	Grau de Desacetilação
A	83,00%
B	85,26%
C	84,37%

D	83,38%
E	77,43%

Atendendo a que este método de extracção da quitina nunca foi proposto anteriormente, torna-se complicado comparar estes valores experimentais com os existentes na literatura, devido a diversos factores, como a fonte de quitina ou o método de extracção da mesma. No entanto existem algumas publicações que apoiam os valores de grau de desacetilação para a α -quitina (Chen and Tsaih, 1998 e 2003). Estes trabalhos indicam que com apenas uma reacção de 3h e à temperatura de 100°C, é possível obter um grau de desacetilação acima dos 75%, valor típico de quitosano de grau comercial.

$$R_{DD} = \frac{DD_t - DD_0}{t} \quad \text{(Equação 1.6)}$$

Utilizando a equação 1.6, determinada pelos mesmo autores, para o cálculo da razão de desacetilação da reacção realizada, sendo, R_{DD} a razão de desacetilação, DD_t , o valor do grau de desacetilação a um determinado tempo t , e DD_0 o valor inicial do grau de desacetilação, obtém-se um valor para a razão de desacetilação de 26, valor próximo do obtido pelos referidos autores (Tsaih et al., 2002).

Chen e colaboradores em 1998, referem que utilizam uma simples desacetilação com NaOH 50% durante 2h à temperatura de 100 °C, para obter amostras de quitosano com 70% de grau de desacetilação (Chen et al., 1998). É de salientar que a desacetilação a 100°C durante 3h para todas as amostras permitiu que estas apresentassem valores de desacetilação semelhantes e dentro das especificações do grau comercial. Para obtenção de um grau de desacetilação típico de grau médico, seria necessário ou aplicar uma temperatura superior, por exemplo 120°C, ou mais horas de reacção, como é possível verificar nos mesmos estudos.

1.3.3 Peso Molecular e Polidispersão

Como referido, a técnica SEC permitiu determinar os pesos moleculares médios e o grau de polidispersão de cada uma das amostras obtidas. Na figura 1.14 são apresentados os cromatogramas das cinco amostras de quitosano, em estudo e na tabela 1.16 encontram-se os respectivos valores de Mw e da polidispersão.

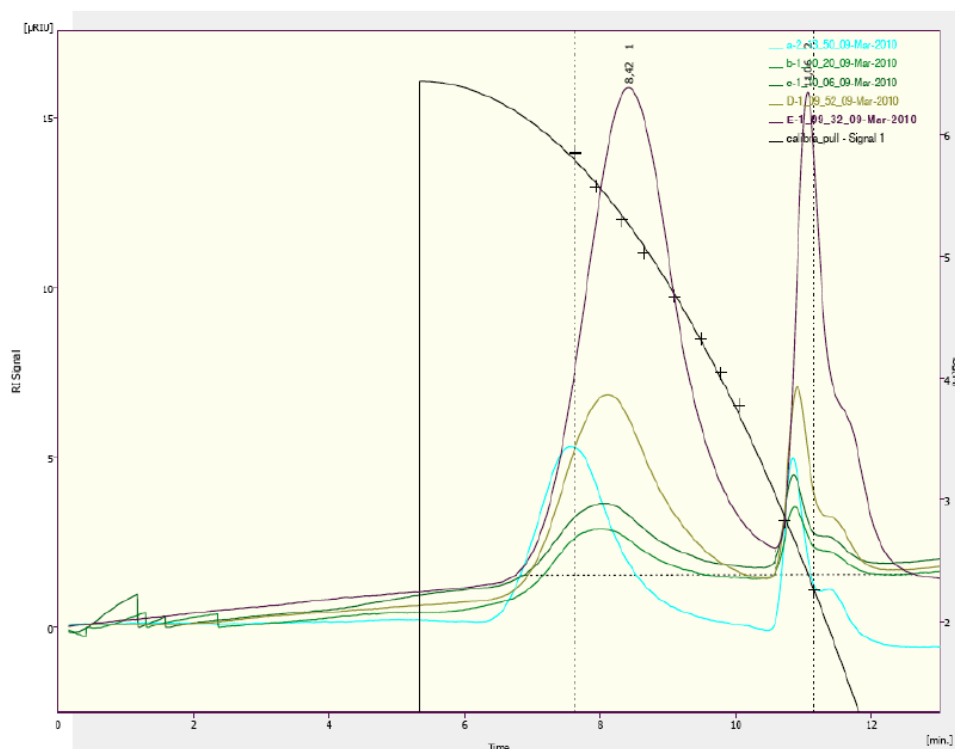


Figura 1.14 - Cromatogramas de SEC das 5 amostras de quitosano

Tabela 1.16 - Valores de Peso Molecular Mw e Polidispersão das amostras de quitosano

Amostra	Peso Molécul ar Mw	Polidispersão
A	738 051	1,53
B	549 835	1,27
C	539 252	1,28
D	402 170	3,25
E	286 928	5,23

Têm sido realizados muitos estudos sobre o efeito da desacetilação no peso molecular, tentando-se desenvolver processos que mantenham os valores de peso molecular o mais elevado possível e com graus de desacetilação igualmente elevados (Percot et al., 2003). Para tal, são empregues métodos de extracção de quitina que a mantenham o mais inalterada possível, de modo a que seja a desacetilação a controlar as referidas características (Tolaimate et al., 2003). No presente trabalho procurou-se que fosse a desmineralização a principal responsável pelo controlo do peso molecular, mesmo sabendo que a desacetilação final seria ainda um factor importante no peso molecular obtido. Optou-se assim por aplicar o mesmo processo de desacetilação em todas amostras, admitindo-se que a perda de peso molecular em percentagem seria semelhante para todas elas.

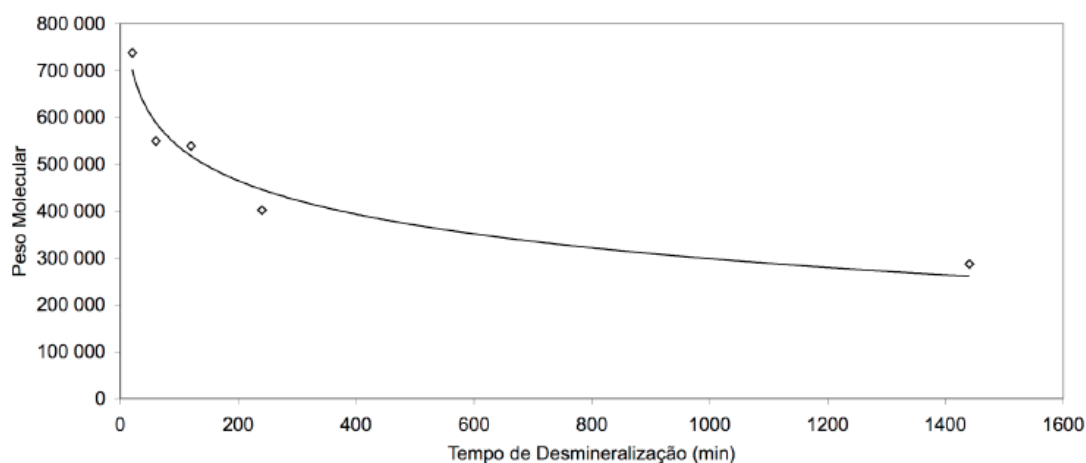


Figura 1.15 – Relação entre o tempo de desmineralização e os valores de peso molecular das amostras de quitosano.

tendo sido possível obter 3 gamas diferentes (Tabela 1.16). Uma gama alta, a amostra A, com peso molecular acima dos 700 000, uma gama média, amostras B, C e D, com valores de Mw entre 400 - 600 000 e uma gama baixa, amostra E, com peso molecular inferior a 300 000. Na figura 1.15, é possível verificar que a perda de peso molecular da quitina em contacto com o HCl, obedece a um decaimento exponencial, verificando-se claramente um abrandamento na quebra das ligações glicosídicas ao longo do tempo (Einbu et al., 2007). Este facto pode ser explicado pelo consumo de iões de H⁺ no decorrer da reacção, devido à protonação da ligação glicosídica entre monómeros e da ligação N-acetilo. Este consumo ao longo do tempo reduz a velocidade da reacção de despolimerização. Importa referir que existem divergências relativamente ao facto da despolimerização ser ou não independente do peso moléculas médio das cadeias. De uma consulta atenta da literatura foi possível verificar que os defensores da primeira hipótese utilizaram informação de degradação de oligómeros com pouco mais de 4 unidades repetitivas (Graham et al., 1995) ao passo que os defensores da segunda hipótese utilizaram dados experimentais relativos a cadeias longas (Chen et al., 1997).

A desmineralização para além de ter um forte impacto no peso molecular, tem forte influência na polidispersão do produto verificando-se que quanto maior o tempo de contacto com o ácido clorídrico maior a heterogeneidade do polímero em termos extensão de cadeia, chegando este valor a atingir 5,2 para a amostra E (Fig. 1.16).

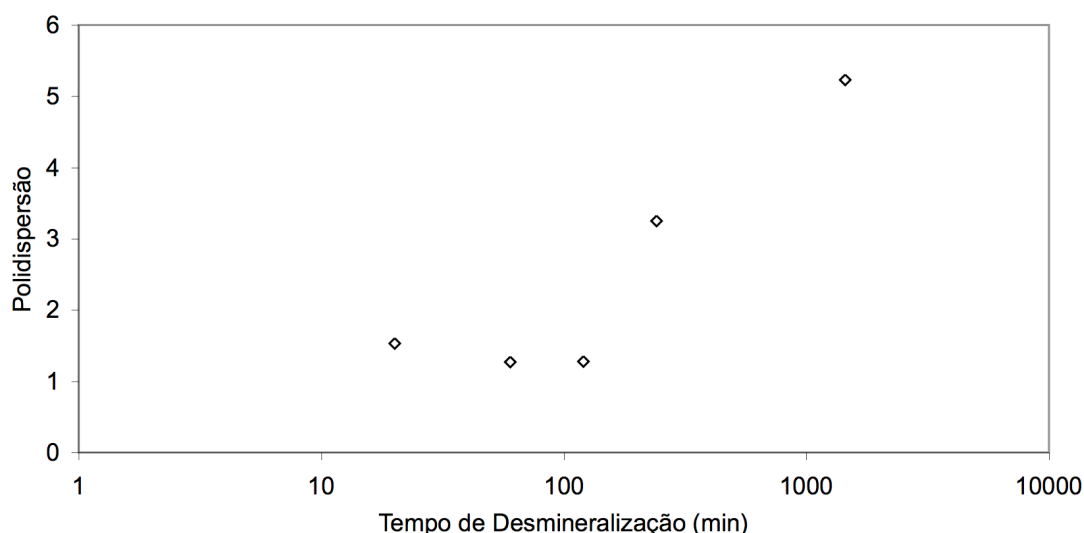


Figura 1.16 - Relação entre o tempo de desmineralização e a polidispersão nas amostras de Quitosano

A polidispersão é a medida que indica a disparidade de tamanhos de cadeia de uma determinada amostra, sendo que valores entre 2 e 3 são considerados ótimos. Abaixo destes valores considera-se que parte das cadeias moleculares (as de menor tamanho) foram perdidas em alguma etapa do processo, por exemplo, por dissolução em algum dos solventes (Kjell M. Varum and Olav Smidsrod, 2005). Casale e Porter, referiram ainda que o valor de polidispersão é dependente do mecanismo de cissão molecular, podendo este ser específico ou aleatório. Para valores entre 1 e 2 existe cissão a meio da cadeia e para valores perto de 2, o mecanismo de cissão aleatória é sobreposto ao específico (Casale et al., 1978).

1.3.4. Coloração

O processo de extracção e produção de quitina e quitosano apresentado não contempla uma etapa de descoloração porque inicialmente esta etapa foi considerada desnecessária, uma vez que a desmineralização é feita com ácido clorídrico, pensando-se que o cloro presente em solução pudesse realizar o branqueamento necessário para a obtenção de uma coloração ideal. No entanto, as amostras A e B apresentam alguma coloração laranja/rosada e a amostra E apresenta um tom amarelado mais intenso, consequência da desmineralização mais extensa (Fig. 1.17). As amostras C e D apresentam uma coloração semelhante ao produto produzido pela empresa Cognis, considerado como referência em termos de cor. Confirma-se desta forma que na etapa de desmineralização se a casca estiver em contacto com um largo excesso de cloro por períodos entre 2-4h é possível descolorar a casca de camarão. Para a descoloração das amostras A e B, recomenda-se uma descoloração feita com solventes orgânicos, por exemplo, acetona à temperatura de ebulição, evitando-se assim a perda de peso molecular (Charoenvuttitham P., 2006).



Figura 1.17 - Amostras de quitosano com diferentes tempos de desmineralização

1.3.5 Rendimento Global

Com os valores obtidos é possível determinar uma composição experimental da casca de camarão *Pandalus borealis*. Os valores obtidos, que se encontram na tabela 1.17, não indicam a constituição real da casca, mas a capacidade que os processos têm em média de extracção de minerais, proteínas e quitina.

Tabela 1.17 - Composição Experimental da Casca de Camarão *Pandalus borealis*

Constituinte	%
Minerais + Pigmentos	61,5
Proteínas	24,7
Quitina	13,8
Total	100

É sabido da tabela 1.1 que a constituição mineral da casca é de 40,2%, no entanto o rendimento da reacção de desmineralização é superior a este valor, indicando que

nesta etapa são removidos outros constituintes da casca, sendo possível que restos de miolo ainda estejam presentes, ou que haja remoção de lípidos ou pigmentos. É ainda possível que pequenas cadeias de quitina se tenham dissolvido no solvente usado, justificando assim também os valores de polidispersão baixos obtidos para os processos A, B e C, bem como um rendimento baixo de quitina, uma vez que segundo Rodde e colaboradores é de esperar que a constituição em quitina da casca esteja entre 17% e 20%, sendo este valor sazonal (Rodde et al., 2008).

1.4 Conclusão

Este trabalho permitiu identificar um método de desmineralização eficaz da casca de camarão. Possibilitou ainda determinar como este processo influencia uma das características principais do produto final do quitosano, o peso molecular, bem como a sua influência na polidispersão do produto.

Obtiveram-se 3 gamas distintas de produto, em termos de peso molecular (baixo, médio e alto), pela simples manipulação do tempo de desmineralização, sendo este aspecto muito importante relativamente à comercialização do produto. Quanto ao grau de desacetilação, os valores obtidos para uma desacetilação de 3h a 100°C, estão de acordo com valores referidos na literatura. Para além destes aspectos, as especificações dos produtos obtidos encontram-se abaixo da gama médica, mas dentro das especificações da gama comercial de quitosano.

Tabela 1.18 - Resumo da caracterização das amostras de quitosano obtidas

Amostra	Grau de Desacetilação (%)	Peso Molecular Mw	Polidispersão	Classificação Comercial
Quitosano A	83,0	738 051	1,5	Alto
Quitosano B	85,3	549 835	1,3	Médio
Quitosano C	84,4	539 252	1,3	Médio
Quitosano D	83,4	402 170	3,3	Médio
Quitosano E	77,4	286 928	5,2	Baixo

Outra descoberta interessante efectuada neste trabalho, foi que é possível realizar a descoloração da quitina, se esta estiver em contacto com um largo excesso de cloro por períodos longos.

1.5. Referências

- Anderson, C. G., de Pablo, N. and Romo, C. R. (1978). Antarctic krill (*Euphausia superba*) as a source of chitin and chitosan. In *Proceedings of the first international conference on chitin/chitosan*. (ed. Parsier, E. R. and. Muzzarelli, R. A. A.), pp. 54-63. Cambridge, USA: MIT.
- Almeida, Henrique V., Síntese e Caracterização de Novos Derivados Biocompatíveis de Quitosano. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, 2007.
- Aye, K. N., Stevens, W. F. (2004). Technical note: Improved chitin production by pretreatment of shrimp shells. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 79, 421-425.
- Aslak Einbu, Hans Grasdalen and Kjell M. Va°rum, Kinetics of hydrolysis of chitin/chitosan oligomers in concentrated hydrochloric acid, *Carbohydrate Research* 342 (2007) 1055–1062
- Belamie E, Davidson P and Giraud-Guille M M 2004 Structure and chirality of the nematic phase in α -chitin suspensions *J. Phys. Chem. B* **108** 4991–5000
- Brine, J. Charles, Austin, R. Paul, (1981) *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, Volume 70, Issue 2, Pages 173-178
- Brugnerotto, J., Lizardi, J., Goycoolea, F. M., Argüelles-Monal, W., Desbrières, J., Rinaudo, M. (2001). An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization. *Polymer*, **42**, 3569-3580.
- Broussignac ,P. (1968), Chitosan: a natural polymer not well known by the industry, *Chimie et Industrie- Génie Chimique*, **99**, 1241-1247
- Bustos, R. O., Healy, M. G., (1994) Proc. 2nd Int. Symp. Environ. Biotechnol., Brighton. 4-6 Jul, 1994. pp. 13-15.
- Casale A., Porter R., *Polymer Stress Reaction*, Academic Press, New York, vol I,

1978

- Cai, J., Yang, J., Du, Y., Fan, L., Qui, Y., Li, J., Kennedy, J.F. (2006). Enzymatic preparation of chitosan from the waste *Aspergillus niger* mycelium of citric acid production plant. *Carbohydrate Polymers* **64**, 151–157.
- Campana-Filho, S. P., Britto, D., Curti, E., Abreu, F. R., Cardoso, M. B., Battisti, M. V., Sim, P. C., Signini, R., & Lavall, R. L. (2007). Extração, estruturas e propriedades de α - e β -Quitina. *Quim. Nova*, **30** (3), 644-650.
- Chang KLB, Tsai G. (1997). Response surface optimization and kinetics of isolating chitin from pink shrimp (*Solenocera melantho*) shell waste *J. Agric. Food Chem.*, **45**, 1900-1904.
- Chatterjee, S., Adhya, M., Guha, A.K., Chatterjee, B.P. (2005). Chitosan from *Mucor rouxii*: production and physico-chemical characterization. *Process Biochemistry* **40**, 395–400.
- Chen, R.H., Tsaih M.L. (1998). Effect of temperature on the intrinsic viscosity and conformation of chitosans in dilute HCl solution, *International Journal of Biological Macromolecules*, **23**, 135–141.
- Chen, R.H., Tsaih M.L. (2003). The effect of reaction time and temperature during heterogenous alkali deacetylation on degree of deacetylation and molecular weight of resulting chitosan, *Journal of Applied Polymer Science*, **88**, 2917–2923.
- Coates, J. (2000). Interpretation of infrared spectra, a practical approach. In *Encyclopedia of analytical chemistry*, R. A. Meyers (Ed.), (pp. 10815-10837), Chichester, John Wiley & Sons Ltd.
- Cohen, E. (1987). Chitin biochemistry: synthesis and inhibition. *Ann. Rev. Entomol.*, **32**, 71-93.
- Chatelet C., Damour O., Domard A. (2001) Influence of the degree of acetylation on some biological properties of chitosan films. *Biomaterials*, **19**, 261–268.

- Domard, A. (1987). Determination of N-acetyl content in chitosan samples by c.d. measurements. *Internation. J. Biological Macromolecules*, **9**, 333-336.
- Graham Allan, G., Peyron, M. (1995) Molecular Weight Manipulation of Chitosan I: Kinetics of depolymerization by Nitrous Acid, *Carbohydrate Research* 277 (1995) 257-272
- Henry, L. K., Puspitasari-Nienaber, N. L., Jaren-Galan, M., Van Breemen, R. B., Catignani, G. L., & Schwartz, S. J. (2000). Effects of ozone and oxygen on the degradation of carotenoids in an aqueous model system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **48**, 5008–5013.
- Hsiao, H., Tsai, C., Chen, S., Hsieh, B., Chen, R. (2004). Spectrophotometric determination of deacetylation degree of chitinous materials dissolved in phosphoric acid. *Macromol. Biosci.*, **4**, 919-921.
- Mima, S., Miya, M., Iwamoto, R. and Yoshikawa, S., 1983. Highly deacetylated chitosan and its properties. *Journal of Applied Polymer Science* 28, pp. 1909–1917
- Moorjani, M.N. , V. Achuta and D. Imam Khasim, Parameters affecting the viscosity of chitosan from prawn waste. *J. Food Sci. Tech.* **122** (1975), pp. 187–189.
- Jiang, X., Chen, L., & Zhong, W. (2003). A new linear potentiometric method for determination of deacetylation degree of chitosan. *Carbohydrate Polymer*, **54**, 457-463.
- Khor, E. (2001). *Chitin: fulfilling a biomaterials promise*. London, Elsevier.
- Khor, E. (2002). Chitin: a biomaterial in waiting. *Current Opinion in Solid State and Materials Sci.*, **6**, 313-317.
- Khor, E., & Lim, L. (2003). Implantable applications of chitin and chitosan. *Biomaterials*, **24**, 2339-2349.

- Kjell M. Varum and Olav Smidsrod, 2005, Structure–Property in Chitosans, Polysaccharide, 2nd Edition, pp 625-642, Marcel Dekker, New York
- Kurita, K. (2001). Controlled functionalization of the polysaccharide chitin. *Prog. Polym. Sci.*, **26**, 1921-1971.
- Kurita, K. (2006). Chitin and chitosan: functional biopolymers from marine crustaceans. *Marine Biotechnology*, **8**, 203-226.
- Kurita, K., Tomita, K., Tada, T., Ishii, S., Nishimura, S-I., Shimoda, K. (1993). Squid chitin as a potential alternative chitin source: deacetylation behavior and characteristic properties. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, **31** (2), 485-491.
- Lamarque, G., Cretenet, M., Viton, C., Domard, A. (2005). New route of deacetylation of α - and β -chitins by means of freeze-pump out-thaw cycles. *Biomacromolecules*, **6**, 1380-1388.
- Lamarque, G., Viton, C., Domard, A. (2004a). Comparative study of the first heterogeneous deacetylation of α - and β -chitins in a multistep process. *Biomacromolecules*, **5**, 992-1001.
- Lamarque, G., Viton, C., Domard, A. (2004b). Comparative study of the second and third heterogeneous deacetylation of α - and β -chitins in a multistep process. *Biomacromolecules*, **5**, 1899-1907.
- Lehrer, S.B., Ayuoso, R., Reese, G. (2003). Seafood allergy and allergens: a review. *Mar. Biotechnology*, **5**, 339-348.
- Liu, D., Wei, Y., Yao, P., & Jiang, L. (2006). Determination of the degree of acetylation of chitosan by UV spectrophotometry using dual standards. *Carbohydr. Res.*, vol. 341 (6), 782-785.
- Figueiredo, M. , Cunha, S., Martins, G., Freitas, J., Judas, F., Figueiredo, H., (2011) Influence of hydrochloric acid concentration on the demineralization of

- Madhavan, P., Ramachandran Nair, K.G., 1974. Utilization of prawn waste- isolation of chitin and its conversion to chitosan. *Fish. Technol.* **11**, 50–55
- Marinho, S., Morais-Almeida, M., Gaspar, Â., Santa-Marta, C., Pires, G., Postigo, I., Guisantes, J., Martínez, J., Rosado-Pinto, J. (2006). Barnacle allergy: allergen characterization and cross-reactivity with mites. *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.*, **16** (2), 117-122.
- Moorjani, M.N., Achutha, V., Khasim, D.I., (1975) Parameters affecting the viscosity of chitosan from prawn waste. *J. Food Sci. Technol.*, **12**. p.187-189.
- Mukherjee, Debi P., Method for producing chitin or chitosan, USPatent 6310188B1, Oct. 30, 2001
- Muzzarelli, R., Muzzarelli, C., Tarsi, R., Miliani, M., Gabbanelli, F., Cartolari, M. (2001). Fungistatic activity of modified chitosans against *Saprolegnia parasitica*. *Biomacromolecules*, **2**, 165-169.
- Muzzarelli, R., Rochetti, R. (1985). Determination of the degree of acetylation of chitosan by first derivative ultraviolet spectrophotometry. *Carbohydr. Polym.*, **5**, 461-472.
- Nadarajah, K., Prinyawiwatkul, W., No, H. K., Sathivel, S., Xu, Z. (2006). Sorption behavior of crawfish chitosan films as affected by chitosan extraction processes and solvent types. *Journal of Food Science*, **71**, E33–E39.
- No, H. K., Nah, J. W., Meyers, S. P. (2003a). Effect of time/temperature treatment parameters on depolymerization of chitosan. *Journal of Applied Polymer Science*, **87**, 1890–1894.
- No, H. K., Lee, S.H., Park, N.Y., Meyers, S. P (2003b), Comparison of Physicochemical, Binding, and Antibacterial Properties of Chitosans Prepared without and with Deproteinization Process, *J. Agric. Food Chem.*, **51** (26), pp 7659–7663

- Pedroni, V., Gschaider, M., Schulz, P. (2003). UV spectrophotometry: improvements in the study of the degree of acetylation of chitosan. *Macromol. Biosci.*, **3**, 531-534.
- Rane, D. K., Hoover, G. D. (1993). Production of chitosan by fungi. *Food Microbiol.*, **7** (1), 11-33.
- Rhazi, M., Desbrières, J., Tolaimate, A., Alagui, A., Vottero, P. (2000). Investigation of different natural sources of chitin: influence of the source and deacetylation process on the physicochemical characteristics of chitosan. *Polymer. Int.*, **49**, 337-344.
- Rinaudo, M. (2006). Chitin and chitosan: Properties and applications. *Prog. Polym. Sci.*, **31**, 603-632.
- Rinaudo, M., Milas, M., Le Dung, P. (1993). Characterization of chitosan. Influence of ionic strength and degree of acetylation on chain expansion. *Int. J. Biol. Macromol.*, **15**, 281-285.
- Rodde, R.H., Einbu, A., Varum, K.M (2008). A seasonal study of the chemical composition and chitin quality of shrimp shells obtained from northern shrimp (*Pandalus borealis*) *Carbohydrate Polymers*, **71**, 388–393.
- Rudall, K. M. (1969). Chitin and its association with other molecules. *Journal of Polym. Sci. Part C: Polymer Symposia*, **28** (1), 83-102.
- Saito, H, Tabeta, R., & Ogawa, K. (1987). High-resolution solid-state ¹³C NMR study of chitosan and its salts with acids: conformational characterization of polymorphs and helical structures as viewed from the conformation-dependent ¹³C chemical shifts. *Macromolecules*, **20**, 2424-2430.
- Saito, Y., Putaux, J-L., Okano, T., Gaill, F., & Chanzy, H. (1997). Structural aspects of the swelling of β -chitin in HCl and its conversion into α -chitin. *Macromolecules*, **30**, 3867-3873.

- Santos, J. E., Soares, J., Dockal, E., Campana-Filho, S. P., Cavalheiro, É. (2003). Caracterização de quitosanas comerciais de diferentes origens. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, **13** (4), 242-249.
- Silva, H., dos Santos, K., Ferreira, E. (2006). Quitosano: derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços. *Quim. Nova*, **29** (4), 776-785.
- Sionkowska, A. (2006). Effects of solar radiation on collagen and chitosan films. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, **82**, 9–15.
- Sionkowska, A., Kaczmarek, H., Wisniewski, M., Skopinska, J., Lazare, S., Tokarev, V. (2006). The influence of UV irradiation on the surface of chitosan films. *Surface Science*, **600**, 3775–3779.
- Suntornsuk W., Pochanavanich P, Suntornsuk L. (2002) Fungal chitosan production on food processing by-products. *Proc Biochem*, **37**, 727–9.
- Tan, S. C., Khor, E., Tan, T. K., Wong, S. M. (1998). The degree of deacetylation of chitosan: advocating the first derivative UV-spectrophotometry method of determination. *Talanta*, **45**, 713-719.
- Teng, W., Khor, E., Tan, T., Lim, L., Tan, S. (2001). Concurrent production of chitin from shrimp shells and fungi. *Carbohydr. Research*, **332**, 305-316.
- Tolaimate, A., Desbrières, J., Rhazi, M., & A. Alagui. (2003). Contribution to the preparation of chitins and chitosans with controlled physico-chemical properties. *Polymer*, **44**, 7939-7952.
- R. Blumberg, C.L. Southall, N.J. Van Rensburg and O.B. Volckman, (1951) South African fish products. XXXII-The rock lobster: a study of chitin production from processing wastes, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **2**, pp. 571–576.
- Van Toan, N., Ng, C., Aye, K.N., Trang, S.T. Stevens, W.F. (2006). Production of high-quality chitin and chitosan from preconditioned shrimp shells, *Journal of*

Chemical Technology and Biotechnology, **81**, 1113–1118.

Youn, D. K., No, H. K., Prinyawiwatkul, W. (2007). Physical characteristics of decolorized chitosan as affected by sun drying during chitosan preparation. *Carbohydrate Polymers*, **69**, 707–712.

Youn D.K., No H.K., Prinyawiwatkul W. (2009). Physicochemical and functional properties of chitosans affected by sun drying time during decoloration, *Food Science and Technology*, **42** 1553–1556.

Youn D.K., No H.K., Kim, D.S., Prinyawiwatkul W. (2008). Decoloration of chitosan by UV irradiation, *Carbohydrate Polymers*, **73**, 384–389.

Capítulo II

Instalação Piloto

2. Instalação Piloto

2.1. Projecto da Instalação Piloto para a Produção de Quitosano Grau Médico

Foi proposta a elaboração do projecto de uma instalação piloto para a produção de quitosano com grau médico. O projecto da instalação piloto foi realizado com o objectivo de produzir cerca de 20-30 kg/ano de quitosano, e o local de implantação seria nas instalações da Ceramed. Devido à escolha deste local, um dos factores críticos na elaboração do projecto seria a reduzida área de ocupação, uma vez que o local de colocação do todo equipamento estaria limitado a uma sala com 5m de comprimento e 7m de largura, prefazendo 35m².

No presente trabalho são apresentados os balanços de massa, realizados com base nos dados experimentais recolhidos durante o estudo da produção de quitosano, a escolha do equipamento e o dimensionamento do mesmo, os diagramas do equipamento e da sua ocupação e o diagrama de utilidades e instrumentação. Os balanços de energia ficaram a cargo da empresa que construiu o equipamento.

A instalação que a seguir se descreve tem como objectivo a produção de quitosano grau médico, mas não reflecte totalmente o processo elaborado no Capítulo I, que se destina à produção de quitosano grau comercial. No capítulo anterior optou-se por não apresentar a optimização do processo de produção de quitosano grau médico devido a questões de sigilo e de propriedade industrial.

2.1.1 Descrição do Processo

A casca recebida é lavada, seca, e moída em moinho de lâminas. A fracção de casca abaixo de 250µm não é utilizada no processo.

- Extracção de Quitina

O processo de extracção da quitina dá-se por duas etapas distintas: a desmineralização e a desproteíntização. Na presente instalação a casca de camarão é carregada no Reactor Filtro 1, onde lhe é adicionada uma solução aquosa de HCl preparada no tanque de mistura. O tempo de reacção e número de ciclos podem ser optimizados para o tipo de casca a processar. No seguimento, a casca é filtrada e retida no Reactor Filtro 1, onde é desproteíntizada com uma solução aquosa de NaOH também preparada no tanque de mistura. No fim desta reacção a quitina é filtrada, e transferida para o Reactor Filtro 2.

- Produção de Quitosano

A quitina transferida para o Reactor Filtro 2, é primeiramente seca através de um fluxo de ar quente. Seguidamente, é transferida uma solução aquosa de NaOH, que reage com o grupo acetilo na posição C2 da unidade repetitiva da quitina. No fim, o quitosano é filtrado, neutralizado e seco neste reactor.

2.1.2 Diagrama de Blocos

Os diagramas de blocos apresentam a sequência coordenada das operações unitárias, expondo assim, os aspectos básicos do processo químico. Indicam os pontos de entrada das matérias-primas e também os pontos de remoção do produto e dos subprodutos.

Cada bloco representa um equipamento onde se dá uma reacção química, uma operação de mistura ou de separação de produtos químicos.

No presente diagrama de blocos apresenta-se o processo de extracção de quitina e produção de quitosano com todas as operações unitárias que lhe estão associadas. O processo apresentado está de acordo com o investigado laboratorialmente, tendo sido feitas as necessárias adaptações para um processo à escala piloto.

Tabela 2.1 - Constituição das Correntes de Processo

Corrente	Composição
1	H ₂ O
2	HCl 33%
3	Solução HCl 1,0M
4	Casca
5	Mistura Reaccional
6	H ₂ O + CaCl ₂ + outros
7	Casca Desmineralizada + H ₂ O
8	H ₂ O
9	NaOH 50%
10	Solução NaOH 1,0M
11	Mistura Reaccional
12	NaOH + Proteínas + outros
13	Quitina + H ₂ O
14	H ₂ O
15	Quitina
16	NaOH 50%
17	Quitosano + H ₂ O + Acetato de Sódio
18	H ₂ O + Acetato de Sódio
19	Quitosano + H ₂ O
20	H ₂ O
21	Quitosano

Tabela 2.2 - Descrição do local onde cada operação decorre

Operação	Equipamento
Mistura 1	Tanque de Mistura
Reacção 1	Reactor Filtro 1
Separação 1	Reactor Filtro 1
Mistura 2	Tanque de Mistura
Reacção 2	Reactor Filtro 1
Separação 2	Reactor Filtro 1
Separação 3	Reactor Filtro 2

Reacção 3	Reactor Filtro 2
Separação 4	Reactor Filtro 2
Separação 5	Reactor Filtro 2

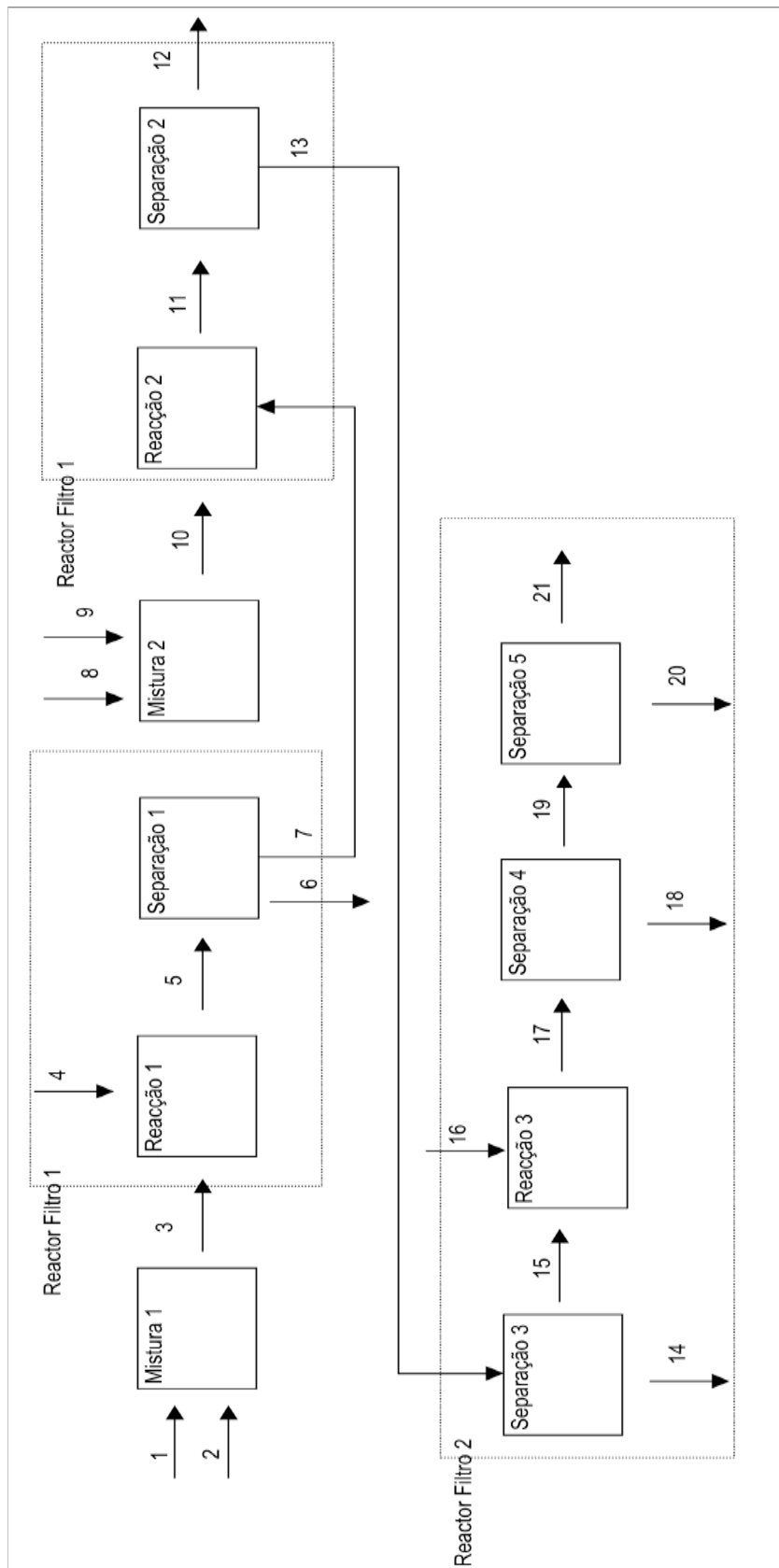


Figura 2.1 - Diagrama de blocos do processo de extração de quitina e produção de quitosano

2.1.3 Balanços de Massa

Os balanços a seguir apresentados podem ser considerados como a base de qualquer projecto de engenharia química. Estes consistem na determinação das composições mássicas ou molares dos compostos que entram, saem e se transformam no interior de cada um dos blocos que representam operações unitárias.

Para a realização de um balanço é necessário ter em conta alguns princípios básicos, deste modo, teve-se em conta o princípio da conservação de massa que é dado pela seguinte expressão:

$$\text{Saída} = \text{Entrada} + \text{Gerado} - \text{Consumido} - \text{Acumulado}$$

Os balanços foram efectuados para uma capacidade anual de 30 kg/ano de quitosano, considerando que a instalação trabalhará 8 horas diárias, 5 dias por semana, durante 50 semanas por ano:

$$30 \text{ kg/Ano} = 30/50 \text{ (kg/Semana)} = 0,6/5 \text{ (kg/dia)} = 0,12 \text{ (kg/dia)}$$

Os balanços efectuados comportam algumas considerações:

Reactor Filtro I

Desmineralização

- A razão entre o solvente HCl 1,0M e a Casca é de 40 mL/ g;
- A conversão da Casca I (inicial) em Casca II (desmineralizada) é de 0,38;
- A humidade residual da Casca II é 70%.

Desproteínização

- A razão entre o solvente NaOH 1,0M e a Casca II é de 15mL/g;
- A conversão da Casca II em Quitina é de 0,36;
- A humidade residual da quitina é de 70%.

Reactor Filtro II

Desacetilação

- A razão entre o solvente NaOH 50% e a quitina é de 15mL/ g;
- A conversão de quitina em quitosano é de 0,85;
- A humidade do quitosano é de 70%.

Balço de Massa: Desmineralização

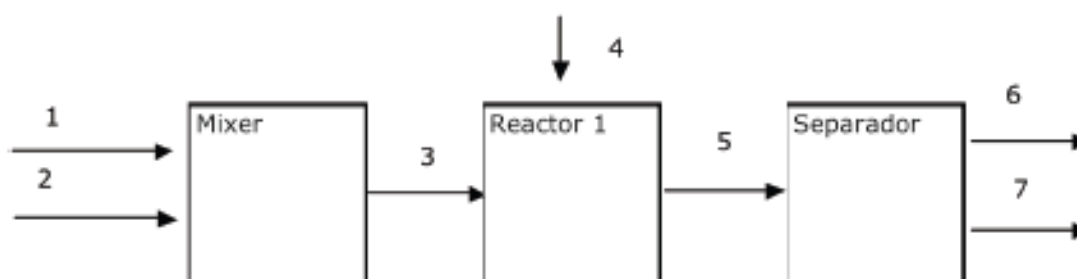


Figura 2.2 - Diagrama esquemático do processo de desmineralização

Tabela 2.3 - Balço de Massa referente ao processo de desmineralização

Compostos (kg)	Correntes						
	1	2	3	4	5	6	7
H ₂ O	36,26	-	36,26	-	36,26	-	0,27
HCl 33%	-	3,74	3,74	-	-	-	-
Casca I	-	-	-	1,00	-	-	-
Resíduos	-	-	-	-	4,36	40,35	-
Casca II	-	-	-	-	0,38	-	0,38
Total	36,26	3,74	40,00	1,00	41,00	40,35	0,65

Balço de Massa: Desproteinizao

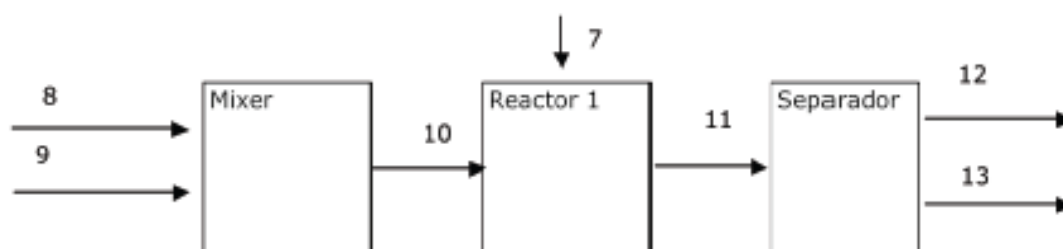


Figura 2.3 - Diagrama esquemático da desproteinizao

Tabela 2.4 - Balço de Massa referente ao processo de desproteinizao

Compostos (kg)	Correntes						
	7	8	9	10	11	12	13
H ₂ O	0,27	8,91	-	8,91	9,18	-	0,10
NaOH 50%	-	-	0,78	0,78	-	-	-
Casca II	0,38	-	-	-	-	-	-
Resíduos	-	-	-	-	1,02	10,10	-
Quitina	-	-	-	-	0,14	-	0,14
Total	0,65	8,91	0,78	9,69	10,34	10,10	0,23

Balanço de Massa: Desacetilação

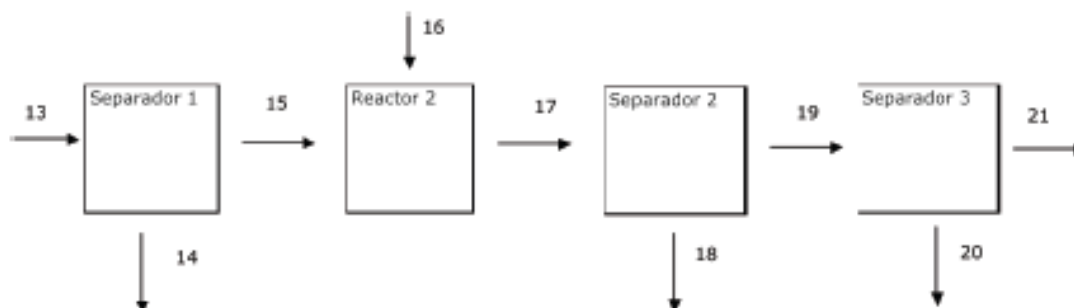


Figura 2.4 - Diagrama esquemático do processo de desacetilação

Tabela 2.5 - Balanço de Massa referente ao processo de Desacetilação

Compostos (kg)	Correntes								
	13	14	15	16	17	18	19	20	21
H ₂ O	0,10	0,10	-	-	-	-	0,08	0,08	-
NaOH 50%	-	-	-	2,05	2,07	1,99	-	-	-
Quitina	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Resíduos	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Quitosano	0,14	-	0,14	-	0,12	-	0,12	-	0,12
Total	0,23	0,10	0,14	2,05	2,19	1,99	0,20	0,08	0,12

2.1.4 Balanços de Energia

O balanço energético num estudo de engenharia permite determinar os calores a fornecer ou a remover para aquecimento ou arrefecimento dos componentes na operação unitária em questão.

A equação geral de conservação da energia é:

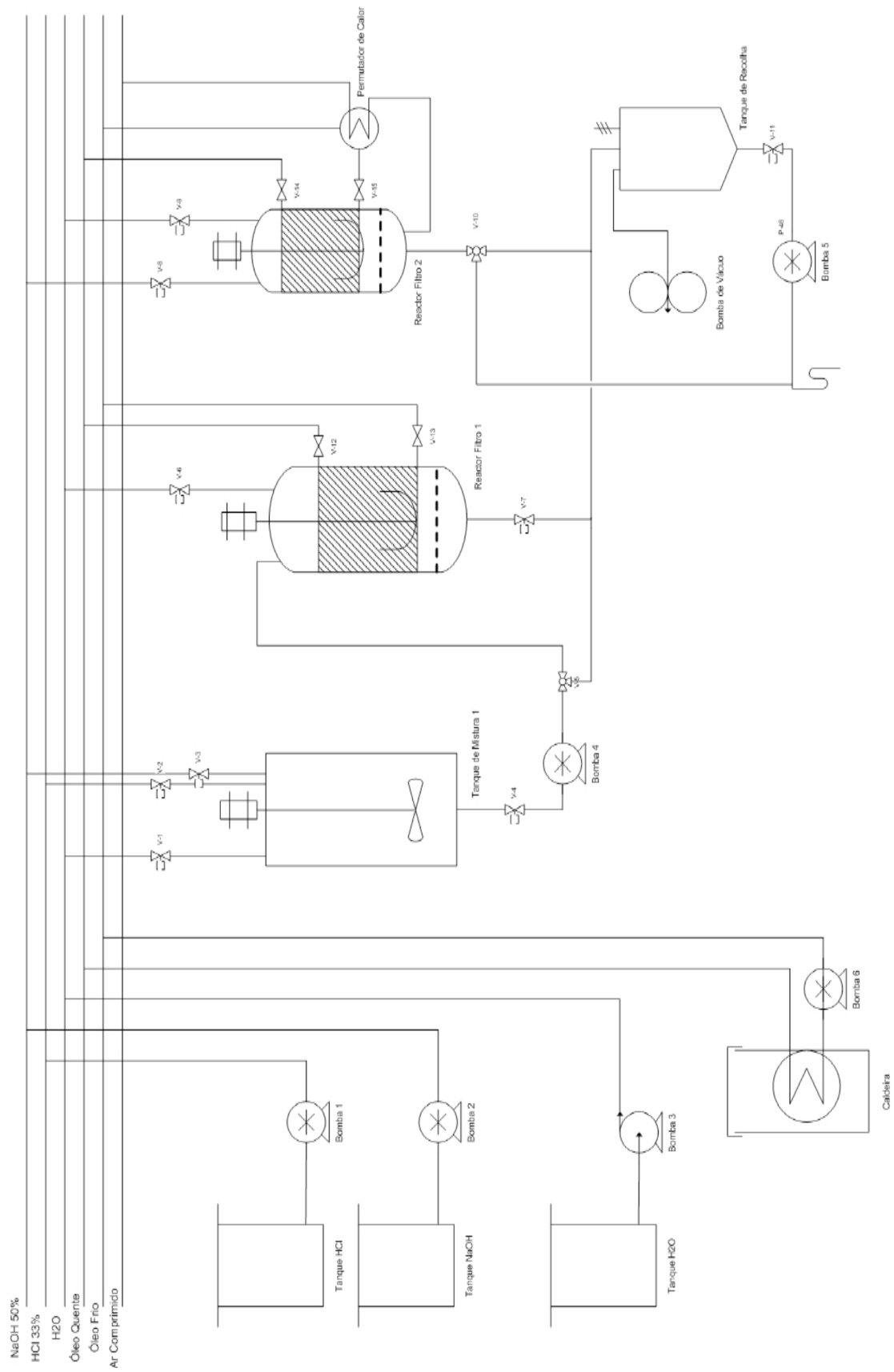
$$\text{Energia de Entrada} = \text{Energia de Saída} + \text{Gerada} - \text{Consumida} + \text{Acumulada}$$

Em estado estacionário o termo de acumulação é nulo.

Convencionou-se que o calor libertado é negativo, e positivo quando fornecido a um sistema. Uma reacção é exotérmica quando liberta energia e endotérmica quando consome.

Os balanços de energia da presente instalação ficaram a cargo da empresa instaladora, uma vez que a caldeira foi construída de raiz por esta empresa.

2.1.5 Diagrama de Tubagens e Processo



2.1.6 Diagrama de Ocupação

No caso de um processo descontínuo é necessário elaborar um programa de ocupação que define o tempo que cada equipamento permanece em funcionamento. Este terá que ter uma base de cálculo que neste caso é a produção de 0,6 kg por semana, correspondente a uma produção de 30 kg por ano. O tempo de trabalho, foi considerado como sendo 8 horas diárias, durante 5 dias semanais e 50 semanas anuais.

Tempo de Ocupação dos Equipamentos

Reactor Filtro 1

Neste equipamento dar-se-ão as reacções de desmineralização e desproteínização, respectivas filtrações e lavagens.

Tabela 2.6 - Especificações de tempo do RF1

Reactor Filtro 1		
Operação		Tempo (min)
Desmineralização	Carga Casca	10
	Carga Solução HCl	7
	Reacção	20
	Filtração	10
Lavagem	Carga H ₂ O	7
	Filtração	10
Desmineralização	Carga Solução NaOH	4
	Aquecimento	40
	Reacção	180
	Filtração	8
Lavagem	Carga H ₂ O	7
	Filtração	10
	Descarga	10
Tempo de Ocupação do Reactor		323
Número de Batches por semana		5

Tabela 2.7 - Especificações de tempo do RF2

Reactor Filtro 2		
Operação		Tempo (min)
Desacetilação	Carga Quitina	10
	Secagem	30
	Carga NaOH 50%	12
	Aquecimento	30
	Reacção	180
	Filtração	10
	Carga H ₂ O	10
	Filtração	10
	Secagem	30
	Descarga	10
Tempo de Ocupação do Reactor		332
Número de Batches por semana		5

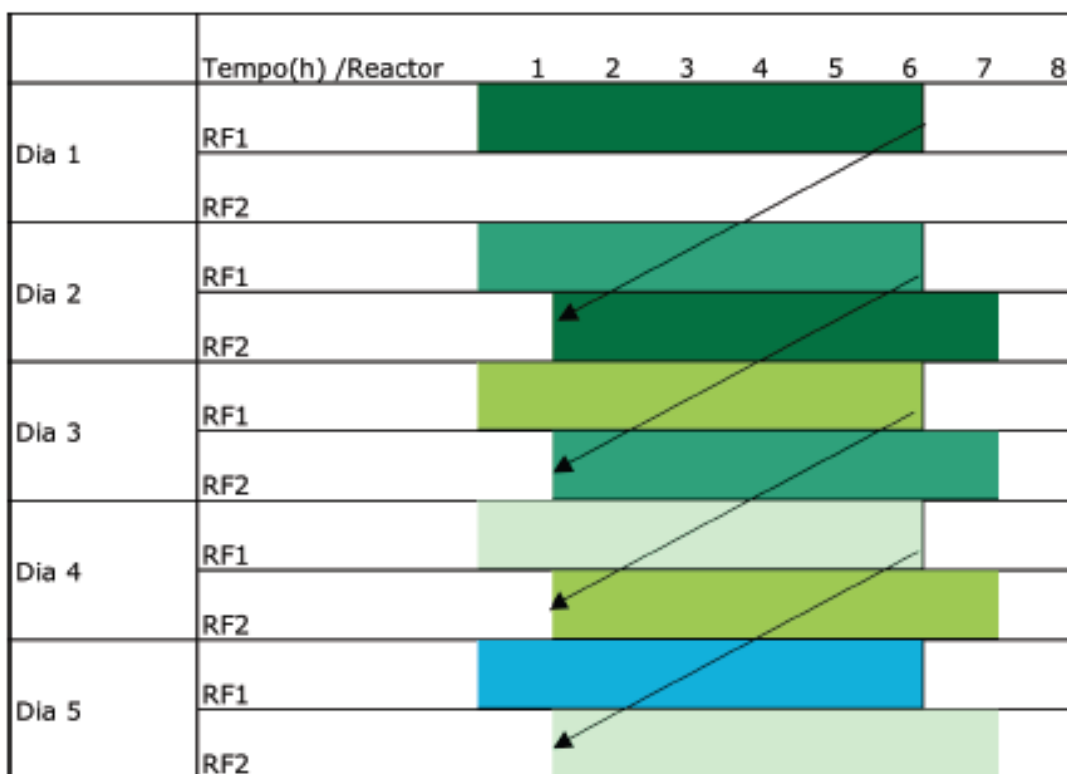


Figura 2.5 - Diagrama de Ocupação

2.1.7 Dimensionamento e Características do Equipamento

Reactor Filtro 1 – RF1

Este reactor é descontínuo e nele procedem-se às duas primeiras reacções de forma sequencial, isto porque o reactor está equipado com um filtro que permite a separação da casca e da quitina dos solventes usados na extracção.

É do tipo tanque agitado, com serpentina para passagem de óleo de aquecimento sendo o seu material de construção polipropileno uma vez a utilização de ácido clorídrico ou hidróxido de sódio requer a escolha de um material que não sofra ataque químico. Por outro lado, a temperatura máxima usada neste reactor é de 70°C, ainda longe da temperatura de transição vítrea deste material. Toda a tubagem utilizada neste reactor foi em PVDF de forma a evitar desgaste químico.

Naturalmente, o dimensionamento dos reactores está dependente do volume da mistura reaccional necessária para a produção de uma determinada quantidade de produto final. De acordo com o balanço de massa, a corrente com volume maior é a corrente 4.

Deste modo, a determinação do volume do reactor é feita através do valor máximo de volume de mistura reaccional entre a inicial e a final. É considerada uma margem de segurança de 20% devido ao aumento do nível de líquido provocado pela agitação.

$$V_{\text{reactor}} = \frac{V_{\text{corrente 4}}}{0,8} (dm^3) \quad \text{(Equação 2.1)}$$

Uma vez que o reactor considerado tem uma forma cilíndrica é possível determinar o raio e a altura a partir do valor do volume:

$$V_{\text{reactor}} = \pi \times r^2 \times h (dm^3) \quad \text{(Equação 2.2)}$$

, em que:

r – raio do reactor;

h – altura do reactor;

Considerou-se ainda que a altura do reactor seria 3 vezes a altura do raio:

$$r = \sqrt[3]{\frac{V_{\text{reactor}}}{3 \cdot \pi}} (m) \quad \text{(Equação 2.3)}$$

Deste modo temos:

Tabela 2.8 - Características do Reactor Filtro 1 – RF1

Reactor Filtro 1, RF1	Características
Material de Construção	Polipropileno
Volume Útil , dm ³	40
Volume do Reactor, dm ³	50
Temperatura Máxima Desmineralização , °C	25
Temperatura Máxima de Desproteinização, °C	70
Altura, m	0,53
Diâmetro, m	0,34
Material do Filtro	Polipropileno
Área do Filtro, dm ²	9,51
Porosidade, µm	100
Tempo de Ocupação, min	323
Agitador	Âncora, Polipropileno
Transferência de Calor	Serpentina, PVDF

Reactor Filtro 2 – RF2

Também este reactor é descontínuo e nele procede-se à desacetilação da quitina produzida no Reactor Filtro 1. Neste reactor é possível realizar igualmente a lavagem, filtração e secagem do polímero.

O reactor é do tipo tanque agitado, com camisa para passagem de óleo de aquecimento sendo o seu material de construção Aço Inox 316, revestido no interior por Teflon. A escolha destes materiais deve-se à utilização de hidróxido de sódio 50% (p/V) a temperaturas da ordem de 80-100°C. O filtro utilizado é uma placa de titânio perfurada.

Naturalmente, o dimensionamento dos reactores está dependente do volume da mistura reaccional necessária para a produção de uma determinada quantidade de produto final, no entanto, para este reactor optou-se por o sobredimensionar para 10L a fim de ser possível realizar produções superiores de quitosano.

As dimensões do presente reactor foram determinadas da mesma forma que o anterior.

Tabela 2.9 - Características do Reactor Filtro 2 – RF2

Reactor Filtro 2, RF2	Características
Material de Construção	Aço 316 + Teflon
Volume Útil, dm ³	10
Volume do Reactor, dm ³	15
Temperatura Máxima Desacetilação, °C	105
Altura, m	0,34
Diâmetro, m	0,23
Material do Filtro	Titânio
Área do Filtro, dm ²	4,22
Porosidade, µm	100
Tempo de Ocupação, min	332
Agitador	Âncora, Aço 316 + Teflon
Transferência de Calor	Camisa

Tanque de Mistura – TM

O Tanque de Mistura serve apenas para realizar as soluções a utilizar pelo RF1, tanto na desmineralização como na desproteinização. O material de construção deste tanque é polipropileno e as suas tubagens são em PVDF. As suas características são as seguintes:

Tabela 2.10 - Características do Tanque de Mistura – TM

Tanque de Mistura - TM	Características
Material de Construção	Polipropileno
Volume Útil , dm ³	40
Volume do Tanque, dm ³	50
Temperatura Máxima, °C	40
Altura, m	0,53
Diâmetro, m	0,34
Agitador	Âncora, Polipropileno

Todos os outros equipamentos foram dimensionados pela empresa instaladora.

2.1.8 Instrumentação, Automação e Controlo

Num processo químico é necessário manter as variáveis do processo dentro de determinados parâmetros de operação e garantir as especificações dos produtos; para isso é necessário monitorizar o desempenho do processo e controla-lo para cumprir os objectivos processuais.

Para o correcto funcionamento da instalação é necessário recorrer a diversos sensores/indicadores que funcionam como “os olhos” do operador. A função de um indicador é receber o sinal de saída medido, envia-lo a um controlador que o compara com o set-point, estabelecido pelo operador, e enviar um sinal ao elemento final de controlo para recolocar a saída no valor pretendido. Na presente instalação o controlo é feito por um computador, ao qual todos os indicadores, válvulas e bombas estão conectados.

Na presente instalação existem diversos indicadores de temperatura:

- Indicadores de Temperatura

Equipamento	Controlo	Tipo
ST1	Indica a Temperatura no interior do RF1, para controlo da válvula de entrada de óleo aquecido;	PT100
ST2	Indica a Temperatura no interior do RF2, para controlo da válvula de entrada de óleo aquecido;	PT100
ST3	Indica a Temperatura no interior da Caldeira, para controlo da temperatura máxima do óleo de aquecimento;	PT100

- Indicadores de Nível

Equipamento	Controlo	Tipo
SN1	Indica o nível de líquido no tanque de mistura, para finalizar a transfega para o Reactor Filtro 1, quando OFF	Bóia Horizontal
SN3	Indica o nível máximo de líquido no interior do Tanque de Mistura para finalizar qualquer operação, quando ON	Bóia Vertical
SN2	Indica o nível no tanque de mistura para finalizar o enchimento do Tanque de Mistura, quando ON	Sensor Contacto
SN4	Indica o nível no Reactor Filtro 1, para finalizar a filtração do RF1, quando OFF	Sensor Contacto
SN5	Indica o nível no interior do Reactor Filtro 1, para finalizar o enchimento do RF1 com água de processo, quando ON	Bóia Vertical
SN6	Indica o nível máximo de líquido no interior do Reactor Filtro 1 para finalizar qualquer operação, quando ON	Bóia, Vertical
SN7	Indica o nível no Reactor Filtro 2, para finalizar a filtração do RF2, quando OFF	Sensor Contacto
SN8	Indica o nível no interior do Reactor Filtro 2, para finalizar o enchimento do RF2, quando ON	Bóia Vertical
SN9	Indica o nível máximo de líquido no interior do Reactor Filtro 2 para finalizar qualquer operação, quando ON	Bóia Vertical
SN10	Indica o nível final do tanque de água de processo, para avisar a necessidade de água de processo, quando OFF	Bóia Horizontal
SN11	Indica o nível final de ácido clorídrico para avisar a necessidade de ácido clorídrico, quando OFF	Bóia Horizontal
SN12	Indica o nível final de hidróxido de Sódio para avisar a necessidade de hidróxido de Sódio, quando OFF	Bóia Horizontal

SN13	Indica o nível no Tanque de Recolha, para iniciar o vazamento deste, quando ON	Bóia Horizontal
------	--	-----------------

- Indicadores de pH;

Equipamento	Controlo
SP1	Indica o pH da solução no Tanque de Mistura, para finalizar a transfega de Ácido Clorídrico ou Hidróxido de Sódio para o Tanque de Mistura, quando $\text{pH} < 1$ ou $\text{pH} > 12$;
SP2	Indica o pH da solução no RF1, para finalizar a transfega de água para o reactor, quando $5 < \text{pH} < 8$
SP3	Indica o pH da solução no RF2, para finalizar a transfega de água para o reactor, quando $\text{pH} < 8$

2.1.9 Planta das Instalações

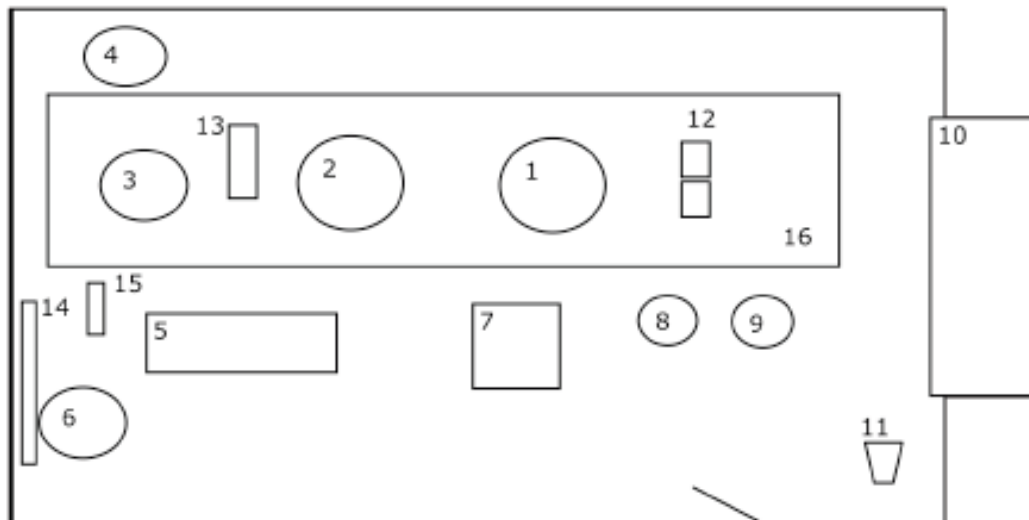


Figura 2.6 - Planta da Instalação

Legenda:

- | | |
|---|-------------------------------------|
| 1- Tanque de Mistura | 13 – Bomba de Vácuo |
| 2 – Reactor Filtro 1 | 14 – Unidade de Purificação de Água |
| 3 – Reactor Filtro 2 | 15 – Bomba Centrifuga |
| 4- Tanque de Recolha | 16 – Sala Limpa |
| 5 – Caldeira | |
| 6 – Tanque de Água de Processo | |
| 7 – Computador de Controlo de Processos | |
| 8 – Tanque de Armazenamento 1 | |
| 9 – Tanque de Armazenamento 2 | |
| 10 – Secador de Pratos | |
| 11 – Moinho de Lâminas | |
| 12 – Bombas Peristálticas | |

Capítulo III

Caracterização Morfológica e Reológica de Soluções e Géis de Quitosano

Adaptado do artigo “Morphological and Rheological Characterization of Chitosan Liquid Crystalline Solutions and Gels” dos autores Hugo Lisboa, João P. Borges, Gonçalo Pereira, Ana M. Ramos, Maria Teresa Cidade

3. Caracterização Morfológica e Reológica de Soluções e Géis de Quitosano

3.1. Introdução

Esta parte do trabalho está focada no estudo da gelificação de soluções aquosas de quitosano em ácido clorídrico e ácido málico, bem como no estudo da formação de mesofases (nemáticas quirais) tanto na fase gel como em solução. Até à data já foram identificados vários polímeros naturais, tanto rígidos como semirígidos, possuindo fases líquido-cristalinas liotrópicas. Inclui-se neste lote, os polipeptídeos (Uematsu et al., 1984), as proteínas (Bernal et al., 1941), os ácidos polinucleícos (Yevdokimov et al., 1988; Robinson, 1961) e os derivados celulósicos (Gray, 1983; Godinho et al., 2002). Tal como estes, o quitosano pertence ao lote dos biopolímeros que podem exibir fases líquido-cristalinas, tendo sido Ogura, em 1982 a relatá-lo pela primeira vez (Ogura, et al., 1982). Desde então a maior parte dos estudos encontram-se vocacionados para derivados de quitosano, principalmente devido a questões de solubilidade. Vários derivados do quitosano apresentam fases líquido-cristalinas liotrópicas (Wu et al., 2001; Dong et al., 2000 e 2004), contudo poucos estudos têm sido dedicados aos efeitos que factores estruturais da molécula têm sobre a concentração crítica (C^*) de formação de mesofases. Prabaharan e colaboradores, realizaram uma monitorização sistemática do comportamento líquido-cristalino do quitosano em diferentes soluções ácidas, e em especial a concentrações elevadas de polímero, onde há formação de géis (M. Prabaharan et al., 2006) Neste trabalho, foram identificadas mesofases liotrópicas em soluções aquosas de ácido fórmico, ácido acético e ácido monocloroacético. Foi descrito ainda que os valores de C^* aumentam com o incremento da concentração de ácido nos solventes, tendo-se atingido valores máximos de 35 e 45 % em peso total, respectivamente em ácido fórmico a 30% (v/v), ácido acético a 50% (v/v) e em ácido monocloroacético a 30% (p/v). Foi ainda relatado, que o valor máximo do passo colestérico (P) diminuí com o incremento da concentração de quitosano nos diversos solventes. Os resultados apresentados pelos autores sugerem que uma solução

aquosa de ácido acético a 30% (v/v), constitui um bom solvente para a produção géis de quitosano com propriedades mesomórficas. Neste capítulo, é relatado o estudo reológico da gelificação do quitosano em soluções aquosas diluídas de ácido málico e clorídrico. Em ambas as soluções foram identificadas texturas em forma de impressão digital características das fases nemáticas quirais (colestéricas), tanto na fase gel como na fase sol, dependendo do ácido usado.

3.2. Parte Experimental

3.2.1 Preparação de soluções de Quitosano

Quitosano (Sigma Aldrich, High Molecular Weight, Mw = 471 000, DA=15%) foi utilizado para produzir soluções a diferentes concentrações com incrementos de 0,4% (p/p) (ou 0,2%(p/p), nalguns casos) em pequenos frascos de vidro. Para solubilização, foram utilizadas soluções aquosas de ácido málico (ACROS, Reagent Grade) 0,15M e ácido clorídrico (Sigma Aldrich, Reagent Grade) 0,1M. Depois de preparadas, todas as amostras ficaram em repouso durante 3 dias para homogeneização.

3.2.2 Microscopia óptica de luz polarizada (POM)

Soluções de quitosano a diferentes concentrações foram observadas usando um microscópio óptico Olympus BH2. As amostras foram observadas com luz polarizada, entre lâmina e lamela, a uma temperatura de 25 °C (controlada por uma platina de aquecimento, Mettler FP82HT).

3.2.3 Reologia

O comportamento reológico das soluções de quitosano foi estudado usando um reómetro rotacional (Bohlin Gemini HRnano), em geometria de cone e prato (ângulo de cone: 2°; diâmetro 40mm), a 25°C. Foram realizadas medidas em regime oscilatório e estacionário, que permitiram a determinação dos módulos de armazenamento e dissipativos, bem como da viscosidade complexa em função da taxa de corte. Todas as medidas foram realizadas em soluções de quitosano tendo sido deste modo possível a determinação da transição sol-gel. No caso das medidas realizadas em estado estacionário, após a estabilização da temperatura, efectuou-se um pre-shear à taxa de 1s^{-1} durante 60s, seguido de 180s de repouso. Todas as medidas foram efectuadas sobre amostras virgens.

3.3. Resultados e discussão

3.3.1 Microscopia Óptica de Luz Polarizada (POM)

Através das observações feitas por POM, às amostras de quitosano/ácido málico e quitosano/ácido clorídrico, foi possível identificar texturas do tipo impressão digital (fingerprints), características de fases líquido-cristalinas nemáticas quirais (colestéricas). Estes estados ordenados foram observados, tanto em soluções como em géis, para o sistema quitosano/ácido málico, enquanto que para o sistema quitosano/ácido clorídrico apenas em estado gel. A figura 3.1a mostra um exemplo das observações feitas por POM, a partir de um gel obtido por adição de 4,4 %(p/p) de quitosano em solução de ácido clorídrico diluído. Texturas semelhantes foram observadas para fases liotropicas colestéricas de quitosano dissolvido em ácido málico diluído. Foi também observada uma bifase, antes da concentração crítica - C^* - (Figura 3.1b), para o sistema quitosano/ácido málico. No caso do sistema quitosano/ácido clorídrico, não foi observada bifase, provavelmente devido ao facto de se formar um gel antes do aparecimento da fase colestérica, tal como se mostrará em seguida (medidas reológicas).

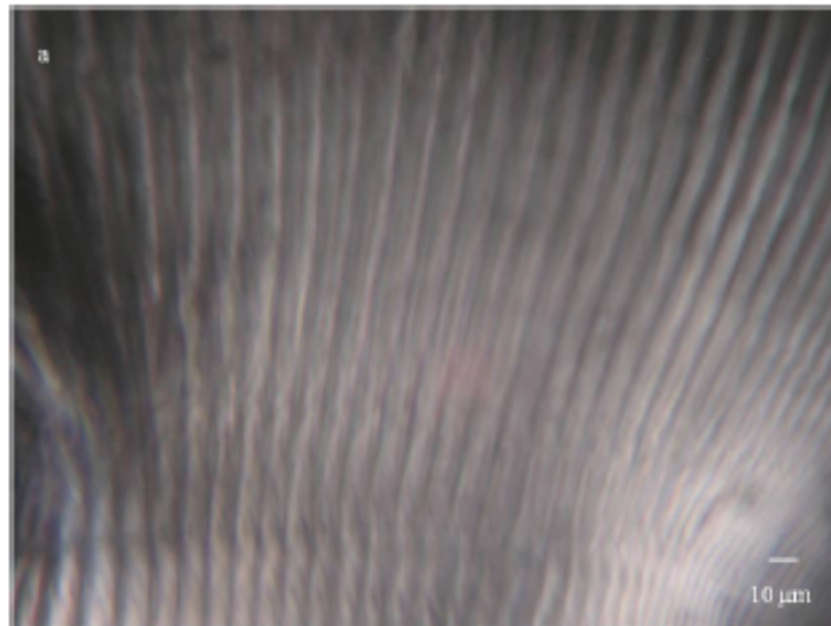
As imagens de POM obtidas foram também usadas para determinar o passo da mesofase colestérica. A variação do passo da hélice da fase colestérica com a fracção volúmica de quitosano nas soluções de ácido málico e clorídrico é apresentada, respectivamente, nas figuras 3.2a e 3.2b. As fracções volúmicas de quitosano foram calculadas a partir das respectivas fracções em peso, considerando que cada solvente possui uma densidade de $1,0 \text{ g.cm}^{-3}$ e o quitosano possui uma densidade igual a 1.42 g.cm^{-3} , valor obtido para membranas de quitosano (Silva et al., 2004). O quitosano em soluções de ácido málico e clorídrico, apresenta fases colestéricas com passo elevado. No entanto, o passo diminui com o aumento da concentração de polímero, verificando-se a seguinte relação:

$$\frac{1}{P} \propto \phi^3$$

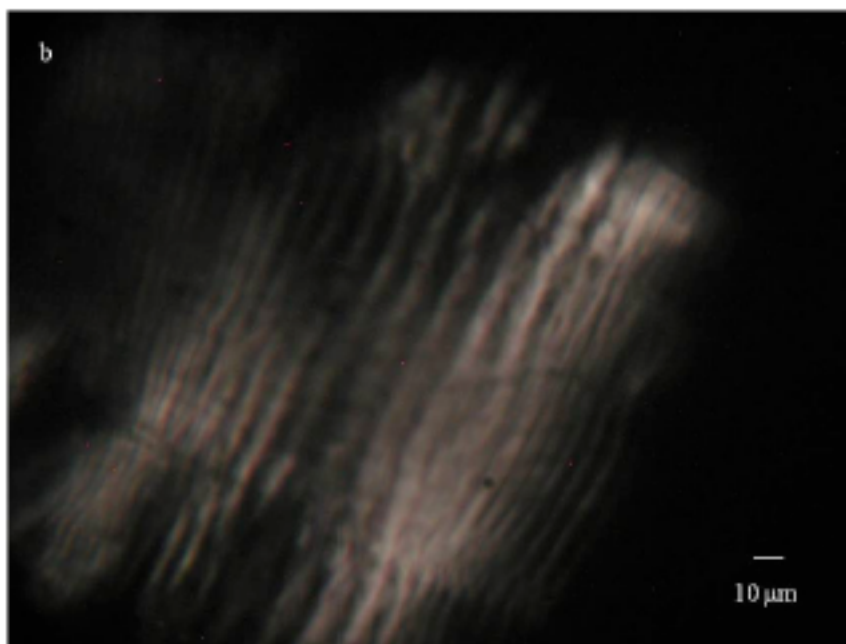
(Equação 3.1)

em que ϕ é a fracção volúmica do polímero. Resultados similares foram reportados para a hidroxipropilcelulose em água (Onogi et al., 1980) e para a

acetoxipropilcelulose em acetona (Bhadani et al., 1983).



a)



b)

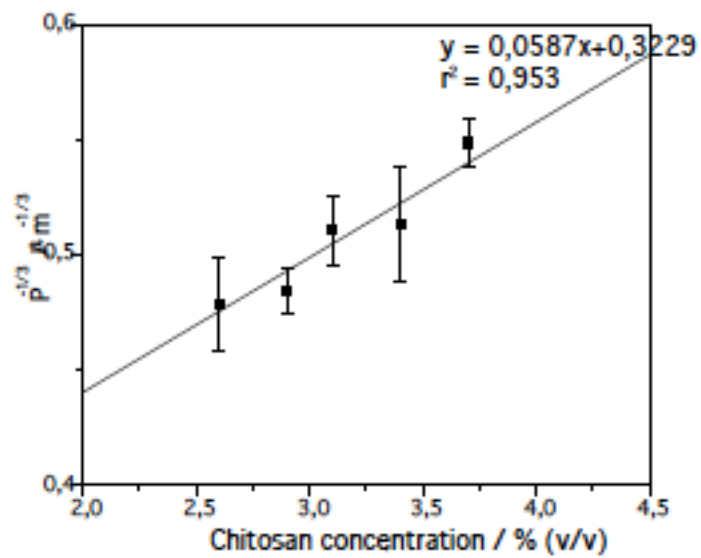
Figura 3.1 – Observações por POM de texturas de quitosano; bifase apresentada por uma solução de quitosano em a) ácido clorídrico (4,4 % p/p de quitosano) e b) em ácido málico (3,8 % p/p de quitosano).

Semelhantes leis de potência, para a variação do passo da fase colestérica com a concentração (traduzida pela fracção volúmica), foram igualmente obtidas para peptídeos:

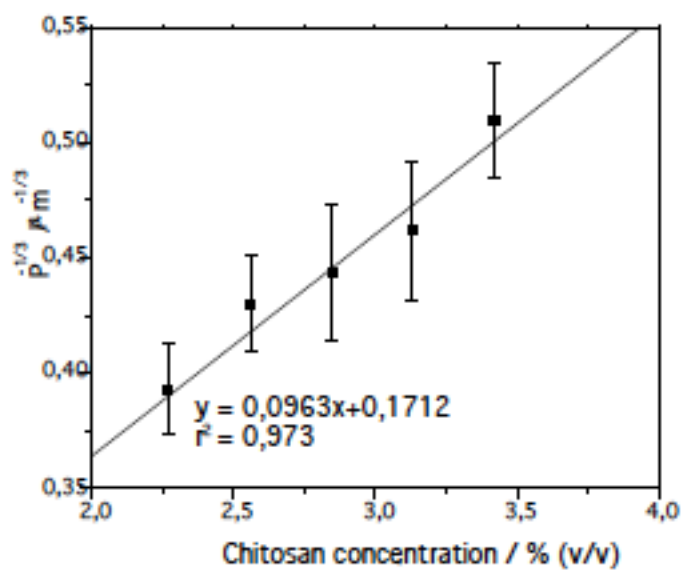
$$\frac{1}{P} \propto \phi^x$$

(Equação 3.2)

onde x é um valor entre 1 e 2 (Toriumi et al., 1981) que depende do tipo de solvente, temperatura e peso molecular.



(a)



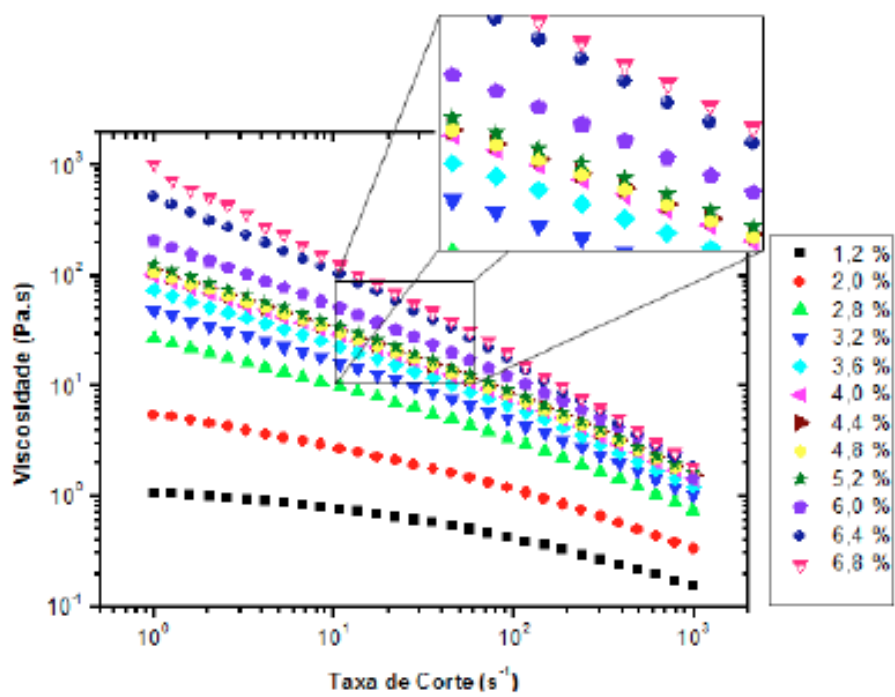
(b)

Figura 3.2 - Variação do passo da hélice da fase colestérica com a fracção volúmica de quitosano, em soluções diluídas de ácido málico (a) e ácido clorídrico (b)

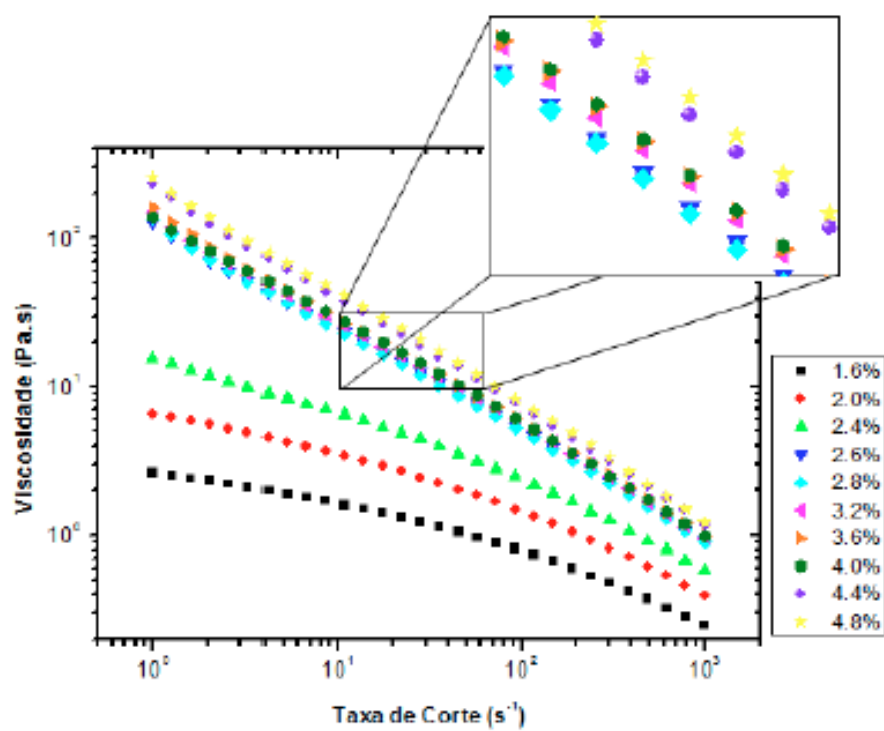
3.3.2 Caracterização reológica

A figura 3.3 mostra o efeito da taxa de corte na viscosidade de diferentes soluções de quitosano, em ácido málico (fig. 3.3a) e ácido clorídrico (fig. 3.3b). Verifica-se um incremento da viscosidade com o aumento da concentração de quitosano em ambos os ácidos, que se explica pela restrição do movimento molecular devido ao aumento do número de interações intra-moleculares e, conseqüente, entrelaçamento das cadeias poliméricas. Para concentrações mais baixas, as soluções exibem um comportamento tipicamente newtoniano, a taxas de corte também baixas. No entanto, a taxas de corte mais altas as mesmas soluções apresentam um comportamento reofluidificante típico de fluidos não newtonianos. O mesmo comportamento é observável para amostras com concentrações mais elevadas em quitosano, deixando-se mesmo de observar o comportamento newtoniano quando se aplicam taxas de corte baixas. Desta forma, observa-se que o efeito reofluidificante é reforçado pelo aumento da concentração de polímero, facto já referido na literatura (Desbriere, 2001; Mucha, 1997) para soluções de quitosano e derivados.

Um decréscimo da viscosidade é observado com o aumento da taxa de corte, sendo tal, atribuído à disrupção das interações moleculares dos entrelaçamentos entre as cadeias poliméricas; isto é, a taxa de junção-disrupção excede a taxa a que os novos entrelaçamentos são formados, e desta forma a mobilidade das cadeias poliméricas aumenta e, por consequência, diminui a viscosidade da solução.



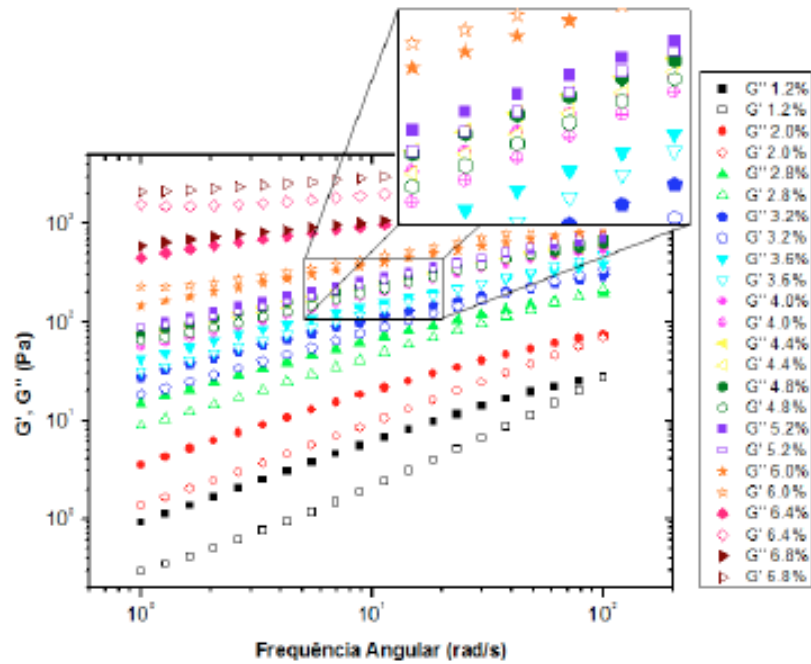
(a)



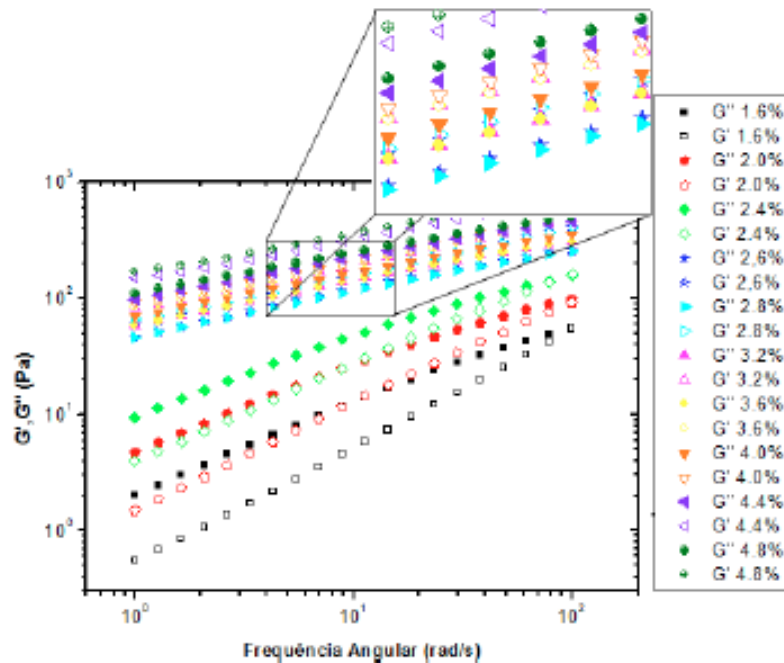
(b)

Figura 3.3 - Efeito da taxa de corte e da concentração de quitosano na viscosidade de soluções de ácido málico (a) e ácido clorídrico (b).

Foram também efectuadas medidas oscilatórias, a baixa amplitude, de forma a investigar o efeito da concentração do quitosano no comportamento dinâmico das soluções aquosas de quitosano nos dois ácidos. A figura 3.4 mostra os módulos de armazenamento (G') e o módulo dissipativo (G''), em função da frequência angular, para diferentes concentrações de quitosano. Tanto G' , como G'' aumentam com o aumento da concentração de quitosano para ambos os sistemas. Para concentrações baixas e baixas frequências predomina o carácter viscoso ($G'' > G'$) mas com o incremento da frequência angular, o módulo de armazenamento cresce mais rapidamente do que o módulo dissipativo, ocorrendo intersecção da curva G' com a curva G'' a uma frequência denominada por frequência de cross-over (β_c); observa-se ainda que a frequências superiores a β_c , o módulo de armazenamento prevalece sobre o módulo dissipativo e o sistema passa a demonstrar um comportamento tipicamente elástico.



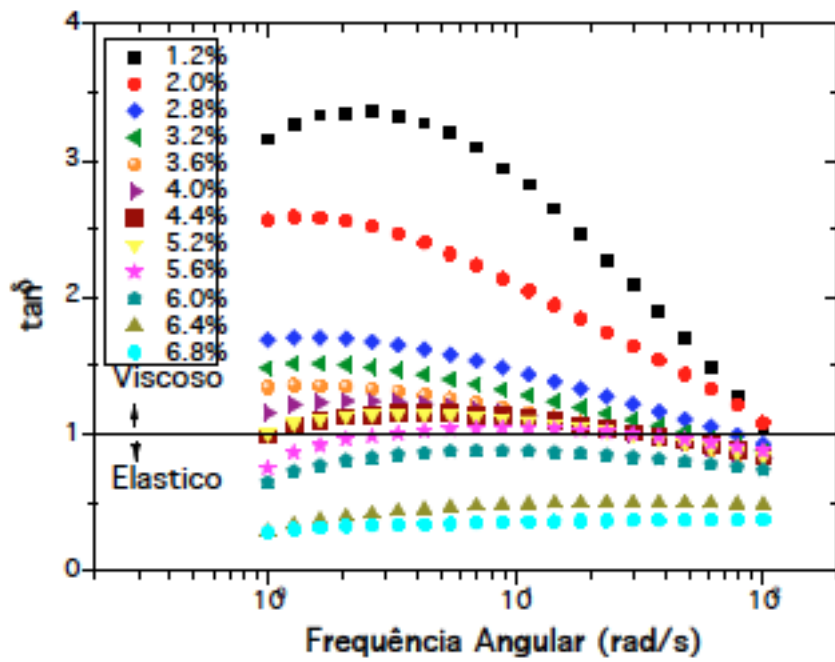
(a)



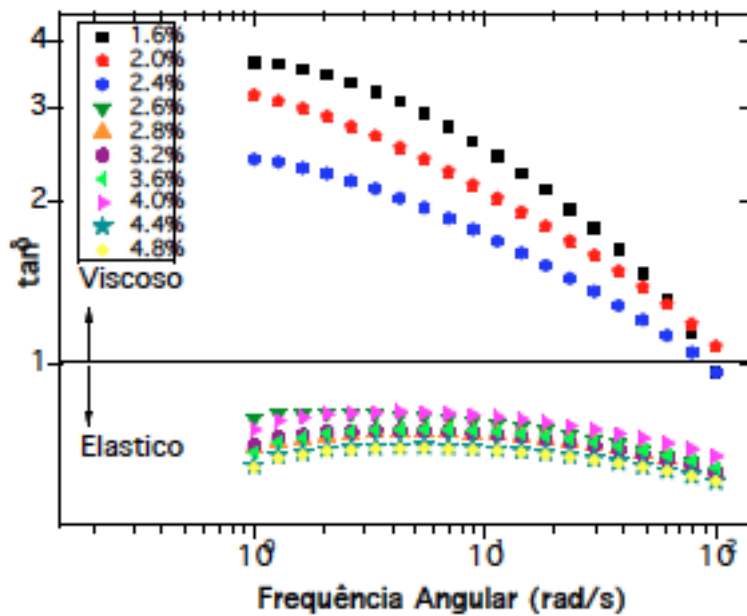
(b)

Figura 3.4 - Efeito da concentração de quitosano no módulo de armazenamento e no módulo dissipativo em função da frequência angular para soluções de ácido málico (a) e de ácido clorídrico (b).

As características dos sistemas com entrelaçamentos são também visíveis na curva da tangente de perdas ($\tan \delta = G''/G'$, onde δ é o ângulo de fase (figura 3.5). Na frequência de cross-over a tangente é igual a 1, estando abaixo deste valor para baixas frequências e acima deste valor para frequências mais altas. Na Fig.3.5, podemos observar, para os dois sistemas, as concentrações de quitosano às quais as soluções se tornam predominantemente elásticas, sendo este valor 6,0% (p/p) para o ácido málico e 2,6% (p/p) para o ácido clorídrico. Valores similares foram obtidos para outras soluções aquosas de quitosano. Desbrières reportou que a transição sol-gel para soluções de quitosano em ácido acético com concentração 0,3M / 0,05 M acetato de sódio ocorria a 43 g/L (cerca de 4,3% p/p) e Iversen et al. [Desbriere, 2002, Iversen et al., 1997) referiram que esta transição ocorria a 3,9 % (p/p) para soluções de quitosano em ácido acético a 1% (v/v).



(a)



(b)

Figura 3.5 - Efeito da concentração de quitosano na tangente de perdas em função da frequência angular, para as soluções de ácido málico (a) e de ácido clorídrico (b).

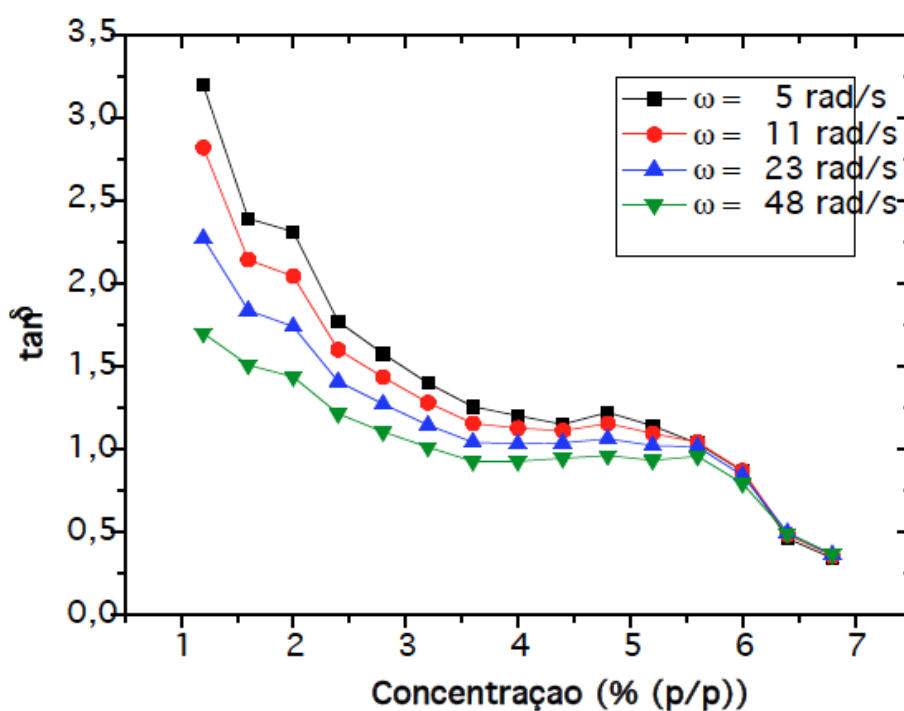
Na tabela 3.1, onde estão registadas as frequências de cross-over e os tempos de relaxação para ambos os sistemas, é possível identificar que para as soluções de ácido málico a frequência de cross-over ocorre à concentração de 2,8 % (p/p). A esta concentração corresponde ainda a frequência de cross-over mais elevada bem como o menor tempo de relaxação, sendo que este valor incrementa de 0.083s para 0.226s para valores de concentração de polímero superiores. Para as soluções de ácido clorídrico, a frequência de cross-over ocorre às concentrações entre 1.6 e 2.4 % (p/p). Tal como é mostrado na tabela 3.1, as frequências de cross-over decrescem com o incremento da concentração de polímero, de 94.6 para 89.9 rad/s, com conseqüente incremento do tempo de relaxação de 66 ms para 70 ms.

Tabela 3.1 – Resumo da concentração, frequência de cross-over e tempo de relaxamento para os dois sistemas de quitosano

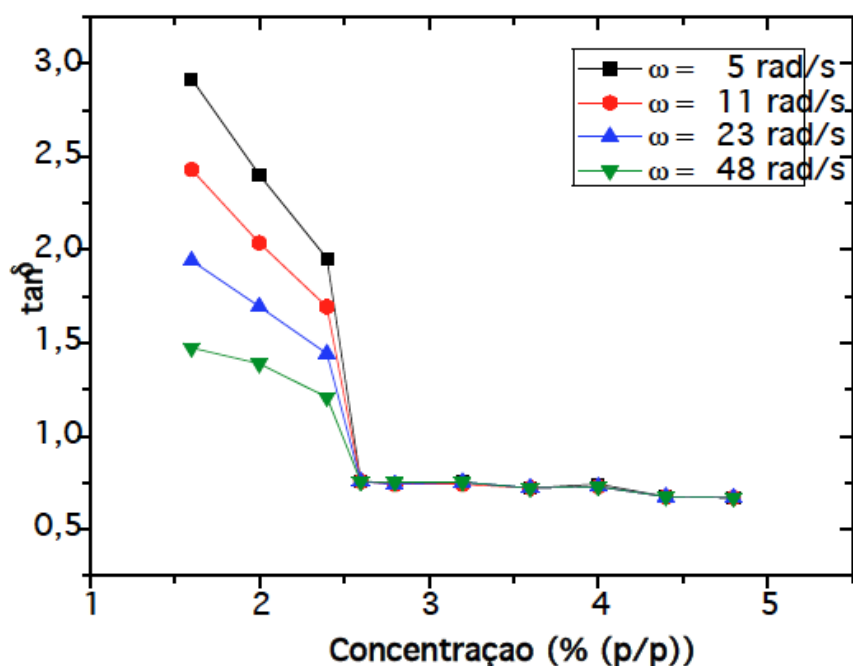
Soluções ácido málico			Soluções de ácido clorídrico		
Concentração (%p/p)	Frequência de cross-over (rad/s)	Tempo de relaxação (ms)	Concentração (%p/p)	Frequência de cross-over (rad/s)	Tempo de relaxação (ms)
2.8	75.5	83	1.6	94.6	66
3.2	51.4	122	2.0	93.8	67
3.6	30.4	207	2.4	89.9	70
4.0	29.3	214	2.6	-	-
4.4	31.6	199	3.2	-	-
4.8	36.7	171			
5.2	27.8	226			
6.0	-	-			
6.8	-	-			

No ponto gel, as curvas G' e G'' torna-se praticamente paralelas e é observado um comportamento em lei de potência ($G' (G'' \sim \omega^m)$) para a frequência. Acima deste ponto, G' torna-se superior a G'' . Esta transição sol-gel é observada para concentrações de polímero acima dos 6.0 % (p/p) para soluções de ácido málico, enquanto que para soluções de ácido clorídrico o valor é de 2.6% (p/p), tal como é possível verificar na figura 3.4(a e b). De forma a efectuar uma determinação mais

precisa desta concentração, a evolução da tangente de perdas em função da concentração de polímero (a diferentes frequências) está representada na figura 3.5. Estas curvas convergem para apenas uma, para concentrações iguais ou superiores à concentração do ponto de gelificação, C_{gel} , da mesma forma como $G'(\#)$ e $G''(\#)$ se tornam paralelas e os valores da tangente de perdas se tornam independentes da frequência. As concentrações C_{gel} encontradas são iguais a 2.6 % (p/p) para as soluções de ácido clorídrico, e muito próximo de 6.0% (p/p) para as soluções de ácido málico.



(a)



(b)

Figura 3.6 – Influência da concentração de quitosano na tangente de perdas em função da frequência angular, para soluções de ácido málico (a) e de ácido clorídrico (b).

As curvas de fluxo, tal como, as curvas obtidas pelo regime oscilatório, Figuras 3.3 e 3.4, respectivamente, dão, também, uma indicação da concentração à qual ocorre a transição de isotropo-anisotropo, bem como, de formação de gel. De facto, uma observação cuidadosa das curvas nas figuras 3.3a e 3.4a, revelam que para o ácido málico, a bifase ocorre a concentrações entre 3.6 e 4.0 % (p/p), com uma concentração crítica (aparência de fase anisotrópica, C^*) entre os 4.0 e 4.4 % (p/p), seguindo-se de um decréscimo da viscosidade para soluções a 4,8% (p/p), e novamente um incremento da viscosidade para concentrações superiores. Esta observação está em consonância com a já bem identificada dependência entre a viscosidade e a transição isotrópica-nemática descoberta em polímeros liquid cristalinos (Doi, 1981; Larson, 1999).

Este fenómeno de diminuição da viscosidade na zona de transição ocorre devido ao facto de as moléculas deslizarem entre elas mais facilmente no estado nemático do que no estado isotrópico, devido à sua orientação. É importante reparar que este sistema liotropico apresenta em repouso uma mesofase colestérica, no entanto, é sabido que a hélice desenrola sob acção de forças de corte, originando desta forma

uma estrutura nemática a taxas de corte inferiores aos valores considerados nesta experiência (Cidade et al., 1995).

O mesmo fenómeno ocorre para as soluções de ácido clorídrico, com C^* entre 2.6 e 2.8 % (p/v). Os tempos de relaxação apresentados na Tabela 3.1, no caso das soluções de ácido málico estão em concordância, tal como esperado, com estes valores de C^* ; de facto os tempos de relaxação aumentam com a concentração até ao valor de 4.0% (p/v), ocorrendo a seguir um decréscimo até 4.8% (p/p) e aumentando novamente para concentrações superiores. No entanto, para as soluções de ácido clorídrico, e uma vez que a fase anisotrópica surge somente já na fase gel, a indicação de C^* não pode ser dada através deste método. Estas concentrações críticas são concordantes com as concentrações determinadas por microscopia óptica. Um ponto de interesse recai no facto de que enquanto para o sistema de ácido málico, a transição isotrópica-nemática ocorre antes da transição sol-gel (em solução), no caso do sistema de ácido clorídrico, a C^* é superior a C_{gel} , o que significa que a fase anisotrópica aparece após a formação de gel. Montembault e colaboradores, demonstraram que o mecanismo de gelificação do quitosano em soluções ácidas é atribuído à formação de uniões físicas devido às interacções hidrofóbicas envolvendo os grupos N-acetil e formação de ligações por pontes de hidrogénio (Montembault et al., .2005a e b).

O balanço entre estas interacções hidrofóbicas e ligações de hidrogénio depende do grau de acetilação (DA). Para baixos DAs, como é o caso do quitosano utilizado no presente trabalho, a densidade de carga inicial do polímero é alta, a quantidade de interacções hidrofóbicas é baixa e as ligações por pontes de hidrogénio desempenham um papel importante no mecanismo de gelificação (Montembault et al., .2005b).

O ácido málico é um ácido orgânico dicarboxílico com três grupos funcionais capazes de criar pontes de hidrogénio quer com o grupo amina quer com os grupos hidroxilo da cadeia de quitosano, facto que não é possível ocorrer para o ácido clorídrico. Desta forma, sendo o ácido málico um ácido fraco, e possuindo a sua molécula um volume elevado, é provável que funcione como um espaçador entre as cadeias poliméricas, reduzindo o espaço de aproximação e evitando a repulsão entre as aminas III (grupo NH_3^+), resultando num C^* superior. Por outro lado a presença desta molécula entre cadeias reduz a possibilidade de formação de pontes de hidrogénio entre os grupos acetilo ainda presentes pelo que a transição sol-gel ocorre mais tardiamente, que no caso do ácido clorídrico.

Para o ácido clorídrico a superior protonação do grupos amida devido ao seu valor

de pKa ser superior é o principal responsável pela ocorrência da C* mais cedo que no caso do ácido málico, existindo ainda a possibilidade do íão Cl- criar ligações de carácter iónico com o grupo NH₃⁺ resultando numa dupla camada hidrofóbica na cadeia. No entanto, o pequeno volume deste grupo não é suficiente para evitar as ligações por ponte de hidrogénio responsáveis pela gelificação prematura.

3.4. Conclusão

No presente capítulo, caracterizaram-se tanto microscopicamente quanto reologicamente, soluções de quitosano em ácido málico e clorídrico, e foi possível determinar as concentrações às quais ocorrem a transição sol-gel (C_{gel}) e ainda as concentrações às quais ocorre a transição isotrópico-anisótropo (nemático quirál ou colestérico), C^* . C_{gel} foi determinado a partir da sobreposição entre o G' e G'' em função da frequência angular, enquanto que a C^* foi determinada pela evolução da curva de viscosidade e tempos de relaxamento, obtidos mais uma vez na sobreposição mencionada. C_{gel} obtido é de 2,6%(p/p) para as soluções de ácido clorídrico, e cerca de 6,0 %(p/p) para soluções de ácido málico.

Relativamente aos valores de C^* , estes encontram-se entre 4,0 e 4,4%(p/p) para soluções de ácido málico e entre 2,6 e 2,8%(p/p) para soluções de ácido clorídrico. No sistema de ácido málico a transição isotrópico-nemático aparece antes da transição sol-gel, isto é, ainda em solução. No entanto, no caso do ácido clorídrico, a C^* é superior que a C_{gel} , o que significa que a fase anisotrópica aparece depois da fase gel ser formada. A explicação para tal facto recai sobre o facto de as forças de cada ácido serem diferentes bem como a capacidade de ambos em formar pontes de hidrogénio com o quitosano.

Texturas em impressões digitais, foram observados através de POM, mostrando que as mesofases apresentadas pelas soluções de quitosano são do tipo nemático quirál. Verificou-se ainda que o passo das referidas mesofases decresce com o aumento da concentração de polímero de acordo com um lei de potência.

3.5 Referências

[Bernal, J. D.; Fankuchen I. J.; X-ray and crystallographic studies of plant virus preparations I. Introduction and preparation of specimens I. Modes of aggregation of the virus particles *J. Gen. Physiol.* **1941**, *25*, 111-146.](#)

[Bhadani, S.N.; Tseng, S.L.; Valente, A.; Gray, D.G.; LYOTROPIC AND THERMOTROPIC LIQUID-CRYSTALLINE PHASE FORMATION FROM FRACTIONS OF A SEMIFLEXIBLE CELLULOSIC POLYMER *Makromol. Chem.*, **1983**, *184*, 1727-1740.](#)

[Chang, J. S.; Chang, K. L.; Tsai, M.L. *J. Appl. Polym. Sci.*, **2007**, *105*, 2670-2675.](#)

[Chenite, A.; Chaput, C.; Combes, C.; Selmani, A.; Jalal, F. BioSyntech Ed., Temperature-controlled pH-dependent formation of ionic polysaccharide gels. Canada Patent US 6344488, 2002](#)

[Cidade, M.T.; Leal, C.R.; Godinho, M.H.; Navard, P.; Martins A.F.; Rheological properties of acetoxypopylcellulose in the thermotropic chiral nematic phase *Mol. Cryst. Liq. Cryst.*, **1995**, *261*, 617-625.](#)

[Desbrières, J. Viscosity of semiflexible chitosan solutions: Influence of concentration, temperature, and role of intermolecular interactions *Biomacromolecules*, **2002**, *3*, 342-349.](#)

[Doi, M.; MOLECULAR-DYNAMICS AND RHEOLOGICAL PROPERTIES OF CONCENTRATED-SOLUTIONS OF RODLIKE POLYMERS IN ISOTROPIC](#)

AND LIQUID-CRYSTALLINE PHASES *J. Polym. Sci., Polym. Phys. Ed.* **1981**, 19, 229-243.

Dong, Y.; Wu, Y.; Wang J.; Wang, M. Influence of degree of molar etherification on critical liquid crystal behavior of hydroxypropyl chitosan *Eur. Polym. J.* **2001**, 37, 1713-1720.

Dong, Y.; Wang, H.; Zheng, W.; Zhao, Y.; Bi, D.; Zhao L.; Li, X.; Liquid crystalline behaviour of chitooligosaccharides *Carbohydr. Polym.* **2004**, 57, 235-240.

Dong, Y.; Yuan, Q.; Wu Y.; Wang, M. Studies on the effect of substitution degree on the liquid crystalline behavior of cyanoethyl chitosan *J. Appl. Polym. Sci.* **2000**, 76, 2057-2061

Fuller, S. W.; Wilkins, M. F.; Brown, G. L. DETERMINATION OF HELICAL CONFIGURATION OF RIBONUCLEIC ACID MOLECULES BY X-RAY DIFFRACTION STUDY OF CRYSTALLINE AMINO-ACID-TRANSFER RIBONUCLEIC ACID *Nature* **1962**, 194,1014-1020

Godinho, M. H.; Fonseca, J. G.; Ribeiro, A. C.; Melo, L. V.; Brogueira, P.; Atomic force microscopy study of hydroxypropylcellulose films prepared from liquid crystalline aqueous solutions *Macromolecules* **2002**, 35, 5932-5936.

Gray, D. G. BIREFRINGENCE OF A POLYMERIC CHOLESTERIC LIQUID-CRYSTAL MEASURED BY REFRACTOMETRY *Appl. Polym. Symp.* **1983**, 37, 179-192.

Guo, B.; Elgsaeter, A.; Stokke B. T.; Gelation kinetics of scleraldehyde-chitosan co-gels *Polymer Gels Networks* 1998, 6, 113-135.

Hulmes, D. J. S. Building collagen molecules, fibrils, and suprafibrillar structures *J. Struct. Biol.* 2002, 137, 2-10.

Iizuka, E. SOME NEW FINDINGS IN LIQUID-CRYSTALS OF SODIUM SALT OF DEOXYRIBONUCLEIC-ACID *Polym. J.* 1977, 9, 173-180.

Iversen, C. Kjoniksen, A. Nyström, B.; Linear and nonlinear rheological responses in aqueous systems of hydrophobically modified chitosan and its unmodified analogue *Polymer Bulletin*, 1997, 39, 747-754.

Khor, E., *Chitin Fulfilling a Biomaterials Promise*, Elsevier Science Ltd, United Kingdom, 2001.

Larson, R.G., in "The Structure and Rheology of Complex Fluids", Oxford University Press, Oxford, 1999.

Majeti N.V.; Kumar, R. (2000) A review of chitin and chitosan applications *Reactive & Functional Polymers*, 46, 1-27.

Montembault, A.; Viton, C.; Domard, A.; Rheometric study of the gelation of chitosan in aqueous solution without cross-linking agent *Biomacromolecules* 2005, 6, 653-662.

Montembault, A.; Viton, C.; Domard, A.; Rheometric study of the gelation of chitosan

in a hydroalcoholic medium [*Biomaterials* **2005**, *26*, 933-943.](#)

[Mucha, M.](#), Rheological characteristics of semi-dilute chitosan solutions
[*Macromolecular Chemistry and Physics*, **1997**, *198*, 471–484.](#)

[Ogura, K.; Kanamoto, T.; Sannan, T.; Tanaka K.; Iwakura, Y.](#) In [*Chitin and Chitosan: Proceedings of the Second International Conference on Chitin and Chitosan*](#),
[Hirano S., Tokura S., Eds; Japanese Society of Chitin and Chitosan:Sapporo,](#)
[Japan, 1982; p.39.](#)

[Onogi Y.; White, J. L.; Fellers, J. L.](#) STRUCTURAL INVESTIGATIONS OF
POLYMER LIQUID-CRYSTALLINE SOLUTIONS - AROMATIC POLYAMIDES,
HYDROXY PROPYL CELLULOSE, AND POLY(GAMMA-BENZYL-L-
GLUTAMATE) [*J. Polym Sci., Polym. Phys. Ed.* **1980**,*18*, 663-682.](#)

[Park, J. W.; Choi, K.-H.; Park, K. K.;](#) ACID-BASE EQUILIBRIA AND RELATED
PROPERTIES OF CHITOSAN [*Bulletin of Korean Chemistry Society* **1983**, *4*,](#)
[68–72.](#)

[Prabaharan, M.; Borges, J. P.; Godinho, M. H.; Mano, J. F.;](#) Liquid crystalline
behaviour of chitosan in formic, acetic, and monochloroacetic acid solutions
[*Materials Science Forum Vols.* **2006**, 514-516, 1010-1014.](#)

[Rinaudo M.](#) (2006) Chitin and chitosan: Properties and applications [*Prog. Polym. Sci.*](#)
[2006, 31, 603–632.](#)

[Robinson C.](#) LIQUID-CRYSTALLINE STRUCTURES IN POLYPEPTIDE

SOLUTIONS [*Tetrahedron*, 1961, 13, 219-234.](#)

[Roberts, G. F.; Taylor K., E. *Makromol Chem*](#) THE COUPLING OF CHITOSAN TO PREFORMED POLYMER BEADS [1989, 190, 951-960.](#)

[Rout, D. K.; Pulapura, S. K.; Gross, R. A.](#) LIQUID-CRYSTALLINE CHARACTERISTICS OF SITE-SELECTIVELY-MODIFIED CHITOSAN [*Macromolecules* 1993, 26, 5999-6006.](#)

[Rout, D. K.; Pulapura, S. K.; Gross, R. A.;](#) GEL SOL TRANSITION AND THERMOTROPIC BEHAVIOR OF A CHITOSAN DERIVATIVE IN LYOTROPIC SOLUTION [*Macromolecules*, 1993, 26, 6007-6010.](#)

[Rout, D. K.; Barman, S. P.; Pulapura, S. K.; Gross, R. A.;](#) CHOLESTERIC MESOPHASES FORMED BY THE MODIFIED BIOLOGICAL MACROMOLECULE 3,6-O-(BUTYL CARBAMATE)-N-PHTHALOYL CHITOSAN [*Macromolecules* 1994, 27, 2945-2950.](#)

[Shumilina, E. V.; Shchipunov, Y.](#) Chitosan-carrageenan gels [*A. Colloid J* 2002, 64, 372-378.](#)

[Silva, R. M.; Elvira, C.; Mano, J. F.; San Román J.; Reis, R. L.](#) Influence of beta-radiation sterilisation in properties of new chitosan/soybean protein isolate membranes for guided bone regeneration [*J. Mat. Sci. Mater. Med.* 2004, 15, 523-528.](#)

[Terbojevich, M.; Cosani, A.; Conio, G.; Marsano, E.; Bianchi, E.;](#) CHITOSAN -

CHAIN RIGIDITY AND MESOPHASE FORMATION [*Carbohydr. Res.* **1991**, *209*, 251-260](#)

[Tolaimate, A.; Desbrieres, J.; Rhazi, M.; Alagui, A.](#) (2003) On the influence of deacetylation process on the physicochemical characteristics of chitosan from squid chitin, [Polymer, 44, 7939–7952.](#)

[Toriumi, H.; Minakuchi, S.; Uematsu, I.](#) CONCENTRATION AND TEMPERATURE-DEPENDENCE OF THE HELICAL TWISTING POWER OF POLY (GAMMA-BENZYL L-GLUTAMATE) LIQUID-CRYSTALS IN M-CRESOL [J. Polym. Sci., Polym. Phys. Ed. 1981, 19, 1167-1169.](#)

[Uematsu I.; Uematsu, Y.](#) POLYPEPTIDE LIQUID-CRYSTALS [Adv. Polym. Sci. 1984, 59, 37-73.](#)

[Wu, Y.; Dong, Y.; Chen, L.; Huang, J.; Li, J.](#); Studies on lyotropic liquid-crystalline N-alkyl chitosans in formic acid [Macromol. Biosci. 2002, 2, 131-134.](#)

[Yevdokimov, Y. M.; Skuridin S. G.; Salyanov V. L.](#) THE LIQUID-CRYSTALLINE PHASES OF DOUBLE-STRANDED NUCLEIC-ACIDS INVITRO AND INVIVO [Liq. Cryst. 1988, 3, 1443-1459](#)

∴

Capítulo IV

Aplicação de Soluções de Quitosano em Cimentos Ósseos.

4. Estudo da Aplicação de Soluções de Quitosano em Cimentos Ósseos

4.1 Introdução

Os cimentos ósseos injectáveis são uma resposta a uma tendência em cirurgias ortopédicas, onde materiais moldáveis e com capacidade de endurecimento in situ são necessários para técnicas minimamente invasivas. Tal facto, permite reduzir o tempo de operação, diminuindo efeitos prejudiciais associados à retracção muscular, menor dor pós operatória e diminuindo o tempo de recuperação do paciente (Hua Liu et al., 2006). Os cimentos usados actualmente de forma mais comum são os de Poli(Metacrilato de Metilo), PMMA. Estes cimentos são sobretudo compostos por metacrilato de metilo (MMA), presente na fase líquida, e PMMA, presente na fase sólida. A fase sólida contém ainda um iniciador da reacção de polimerização do MMA, e assim quando se procede à mistura das duas fases, estas formam uma pasta moldável pronta a ser aplicada no local afectado e que endurece rapidamente. Os rápidos tempos de secagem, as excelentes propriedades mecânicas bem como a facilidade de manuseamento e moldagem, tal qual pastilha elástica, são propriedades ainda inatingíveis por outros cimentos (A. Nzihou et al., 1999, F. C. M. Driessens et al., 1995). No entanto, e apesar destas excelentes propriedades os cimentos acrílicos não são bioactivos nem biodegradáveis e podem originar complicações, ao nível das cirurgias ortopédicas, tais como:

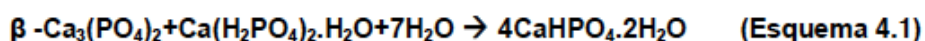
- 1) Necrose do osso e lise óssea devido à alta temperatura, 80-120°C, desenvolvida durante o processo de secagem/endurecimento.
- 2) Retraimento da matéria durante o processo de endurecimento, o que no caso das próteses pode levar à má colocação da pasta na cavidade do osso. A pequena lacuna que pode ficar entre a prótese e o osso é fechada com tecido fibroso que permite um micro-movimento da prótese em relação ao osso e que pode muitas vezes causar osteólise.

Na tentativa de evitar todos os malefícios citados, há muitos anos que se estudam outras alternativas. A mais promissora é ter um cimento à base de fosfatos de cálcio, que endurece in situ. Este material apresenta reconhecida biocompatibilidade e a moldabilidade de um cimento acrílico. Os fosfatos de cálcio, tais como a hidroxiapatite (HAp) e o beta-fosfato tricálcico (β -TCP), são os constituintes principais da parte mineral do osso normal e dentes. Sendo materiais bioativos e osteocondutores, distinguem-se pela formação de um forte laço biológico, permitindo o crescimento e proliferação do osso até ao implante. O β -TCP, por ser biodegradável, à medida que é reabsorvido, permite o crescimento ósseo até à completa substituição do implante, daí que seja o material de eleição para este tipo de produto. Em 1984, Gruninger e os seus colaboradores designaram este novo tipo de produto de “cimento de fosfato de cálcio” (CPC) que, e segundo a sua designação, consiste numa mistura entre sais de fosfatos de cálcio e água, ou uma solução aquosa, para formar uma pasta que possa reagir à temperatura ambiente ou corporal, dando origem a um precipitado que contém um ou mais fosfatos de cálcio e que endurece pelo intercruzamento dos cristais do precipitado (Gruninger, et al., 1984). Este cimento pode então ser aplicado em enxertos ósseos, e na substituição de partes danificadas do sistema ósseo, oferecendo grandes vantagens que se traduzem por uma fácil manipulação e excelente contacto entre o enxerto e o osso. É preparado durante a cirurgia, não necessitando de forma prévia, para além de ser biocompatível e bioactivo. Os CPC também podem servir como sistemas de administração de fármacos, tais como antibióticos, anti-tumurais e anti-inflamatórios (Yu, D., et al., 1992). Para além disto, a grande vantagem dos CPC em relação ao PMMA está relacionada com as baixas temperaturas envolvidas no processo de secagem/endurecimento, não causando a necrose do tecido envolvente, nem da matriz óssea. Durante um certo período de tempo a pasta é moldável, permitindo o fácil manuseio quer para a colocação e utilização do produto numa seringa, quer para moldação e posicionamento do produto no local com as próprias mãos. O produto final, também é composto por fosfatos de cálcio que promovem a osteointegração, o que não acontece com o PMMA. Contudo, as características do produto final podem variar, consoante a composição das fases do cimento, a razão entre a fase líquida e sólida (L/S), a razão molar cálcio/fósforo (Ca/P) e a presença de aditivos.

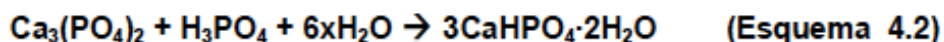
Genericamente, existem dois tipos de CPCs dependendo da constituição final do

produto desejado. Um cimento obtido com pH inferior a 4,2 reage formando fosfato di-cálcico dihidratado (DCPD, bruxite), enquanto que com pH acima de 4,2 se forma hidroxiapatite (HA) (Gbureck et al.,2003).

Como as soluções de quitosano são ácidas, o foco do presente estudo é nos CPCs com composição final em bruxite. Os CPC de Bruxite são muito diferentes dos de apatite. Enquanto que as pastas dos CPC de apatite passam gradualmente de um estado viscoso para uma massa resistente, os CPCs de bruxite são geralmente mais líquidos e endurecem mais rapidamente (Bohner, M., et al., 2008). Mirtchi e Lemaître foram os primeiros a produzir este tipo de cimentos em 1987, onde utilizaram fosfato monocálcico (MCPM, ácido) para reagir com o β -TCP (básico) obtendo como produto final DCPD (neutro) (Mirtchi et al.,1987).



A utilização do ácido ortofosfórico (H_3PO_4) para reagir com um fosfato tricálcico, foi proposto no mesmo ano por Bajpai e colaboradores, onde para além deste testou outros tipos de ácidos carboxílicos e monómeros de baixo peso molecular (Bajpai, et al., 1987). A reacção é traduzida por:



Até agora, há mais formulações propostas, como por exemplo β -TCP+ H_3PO_4 , β -TCP+MCPM e β -TCP+MCPM+CaO (Bohner et al., 1993 e 1997, Lemaître et al., 1987, Constantz et al., 1987). Todos os cimentos de bruxite solidificam por meio de reacções ácido base (equações 4.1 e 4.2). Como o DCPD precipita a pH inferior a 6, a pasta do cimento de bruxite é ácida durante a reacção de endurecimento (Elliott, 1994). Por exemplo, durante a solidificação de um cimento de bruxite composto por β -TCP+MCPM o pH varia de valores próximos de 2, até um pH quase neutro de aproximadamente 6 (Bohner et al., 1997). Ao substituir o MCPM pelo o ácido ortofosfórico, este torna as pastas de cimento muito ácidas durante os primeiros 30s, mas depois o pH segue o perfil obtido com o MCPM. Contudo esta segunda formulação traz algumas vantagens, em relação ao MCPM, nomeadamente: a preparação é mais fácil e mais rápida, permite um melhor controlo da composição química e reactividade e uma melhoria das propriedades físico-químicas (como é o caso de maiores tempos de solidificação, e maior resistência à tracção devido a uma maior homogeneidade da pasta). No entanto, a utilização do ácido ortofosfórico

pode comprometer a biocompatibilidade da formulação do cimento, devido a apresentar baixos valores de pH durante a conformação (Bohner et al., 1997). A bruxite é biocompatível e moderadamente solúvel a pH fisiológico. A sua reabsorção pode ocorrer quer por fagocitose quer por dissolução, a seguir à implantação. Os cimentos de bruxite podem ser largamente ou até totalmente reabsorvidos em apenas 16 a 18 semanas (Ohura et al., 1996, Fraysinnet et al., 1998). Apesar disto, o uso da generalidade dos cimentos de bruxite é limitado, por serem, mecanicamente menos resistentes do que a maioria dos cimentos de apatite (Charriere et al., 2001). Contudo, as propriedades mecânicas tendem a aumentar à medida que o osso volta a crescer (Ikenaga et al., 1998). Uma razão para que a resistência inicial seja menor é que devido a uma reacção de solidificação muito rápida, as pastas de bruxite são geralmente muito líquidas, sendo normalmente misturadas com uma grande razão Líquido/Sólido (L/S), em comparação com a proporção estequiométrica. Isto resulta em alta porosidade e conseqüentemente num cimento menos resistente. Em certos casos, estas podem endurecer em apenas 10s, chegando ao máximo da sua resistência em apenas 1 dia (Bohner et al., 2008). A rápida reacção de solidificação deve-se, provavelmente, ao facto de no final da reacção de endurecimento o pH da pasta aumentar, com a diminuição da solubilidade dos reagentes (Bohner et al., 1997). Para controlar o início da reacção de endurecimento e, conseqüentemente, proporcionar tempo suficiente para que o cirurgião possa aplicar o CPC de maneira segura, é proposta a utilização de inibidores da nucleação e crescimento de cristais (retardadores) (Bohner et al., 2008). Vários aditivos têm sido utilizados para retardar a reacção dos cimentos de bruxite, tais como iões citrato, sulfato, e pirofosfato. Num estudo feito por Grover e colaboradores (Grover et al., 2005) de todos estes iões, os pirofosfatos parecem ser os mais eficazes. Pensa-se que os pirofosfatos podem actuar como agentes retardantes, por se ligarem à superfície dos cristais recentemente formados e, deste modo, inibir a cristalização. Contudo, os iões pirofosfatos, também abrandam a taxa a que o β -TCP é consumido, resultando num aumento do tempo durante o qual o pH do cimento permanece ácido, o que pode comprometer mais uma vez a biocompatibilidade deste tipo de cimentos. A adição de ácidos carboxílicos, tais como o ácido cítrico ou o ácido málico, à fase líquida do cimento, também pode melhorar o tempo de presa, ou seja, o tempo necessário para endurecimento do cimento, bem como, da injectabilidade, e as propriedades mecânicas do cimento (Barralet et al., 2004). Estudos mais recentes, testaram a influência do ácido láctico, málico, cítrico, e tartárico na reacção de solidificação dos cimentos de bruxite, e

verifica-se que todos eles prolongam a reacção de solidificação mas com diferentes efeitos nas propriedades mecânicas (Hofmann et al., 2005).

Como o DCPD é uma fase metaestável, e em condições fisiológicas pode transformar-se em hidroxiapatite deficitária em cálcio (CDHA) por meio de dois processos: dissolução e precipitação. Alguns estudos parecem mostrar que esta reacção de transformação pode levar a reacções inflamatórias, pela libertação de ácido durante esse processo (Bohner et al., 2000). No entanto, Bohner verificou que a adição de pequenas quantidades de iões magnésio ao cimento, actua como um inibidor da precipitação de CDHA prevenindo que isto aconteça, ou seja, reduzindo a possibilidade de inflamação. No mercado já é possível encontrar cimentos de bruxite apesar de serem muito poucos em comparação com os cimentos de apatite. Estes são o ChronOS™ Inject (da Synthes- Norian), Eurobone® (da Kasios), e VitalOs (da CalciphOs).

Face a tudo isto considerou-se que a realização de um compósito entre um fosfato de cálcio e um polímero pudesse dar resposta a alguns problemas levantados, nomeadamente as propriedades mecânicas. O osso humano do tipo cortical apresenta valores de resistência à compressão entre 130 e 180 MPa, ao passo que o osso trabecular (esponjoso) apresenta valores entre 5 e 50 MPa. A ideia inicial seria produzir um CPC que tivesse como principal aplicação cirurgias de vertebroplastia, onde o cimento é injectado para o seio vertebral danificado. Nestas zonas o osso humano é do tipo trabecular. As soluções de quitosano estudadas anteriormente afiguram-se como ideais para a fase líquida do cimento, uma vez que para além do polímero que confere estabilidade mecânica a uma estrutura porosa e contribui significativamente para a melhoria da injectabilidade e coesão final do cimento, existe a presença de ácido málico que como referido serve de retardador da reacção de consolidação, permitindo que o cimento se torne aplicável em cirurgia. As soluções a utilizar encontram-se abaixo do ponto gel (ver capítulo 3), mas acima da concentração crítica de aparecimento da fase nemática quiral, de forma a mimetizar a estrutura do colagénio no osso.

Com vista à optimização do CPC apontam-se como principais parâmetros de estudo, a quantidade de sólido misturado com a solução de quitosano, e a quantidade de quitosano, dissolvido no ácido málico. Outras características podem ser consideradas como o ácido utilizado e a sua concentração, ou mesmo o tipo de fosfato de cálcio inicial usado.

É importante ainda referir as características ótimas de um cimento para aplicação cirúrgica. Segundo Driessens e colaboradores, este tipo de material deve apresentar, para o uso clínico, as seguintes características descritas na tabela seguinte (Driessens et al., 1997) :

Tabela 4.1 - Resumo das Características Ótimas de um Cimento Ósseo

Sigla	Parâmetro	Valor óptimo
t_i	O tempo final da mistura dos componentes	Aproximadamente 1min;
t_s	Tempo de solidificação ou tempo de presa	Mínimo: 5min Máximo: 20min;
t_M	Tempo final de manipulação ou injectabilidade	Máximo: 7min
σ_c	Resistência à compressão	5 – 50 MPa
-	Temperatura desenvolvida	Máximo: 37°C
-	pH	(6.5 ≤ pH ≤ 8.5).

No esquema seguinte apresenta-se de que forma se relacionam os vários tempos envolvidos na preparação do cimento:

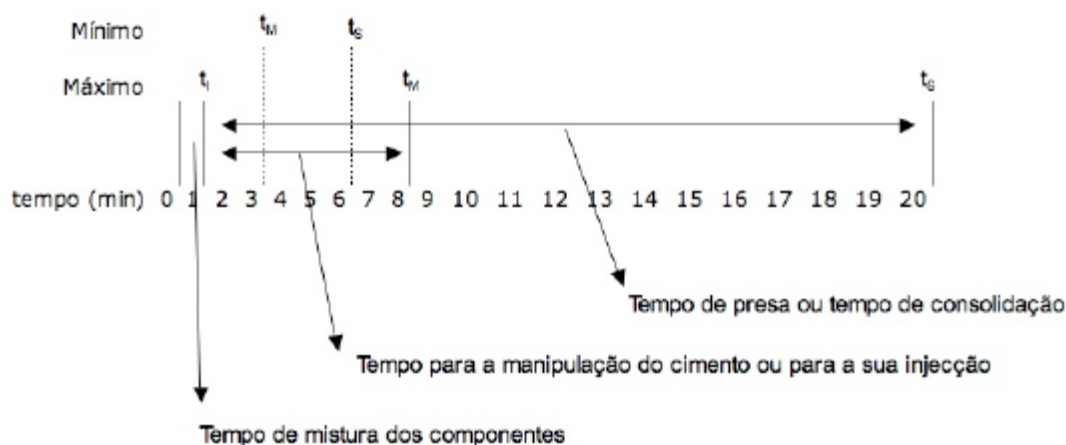


Figura 4.1 – Esquema explicativo da ordem dos tempos na reacção do cimento

4.2 Parte Experimental

4.2.1 Materiais

Os cimentos desenvolvidos no presente estudo consistem em dois componentes ou fases sendo um deles um cerâmico em pó e o outro um líquido. O pó de ceramic usado foi o β -TCP (Plasma Biotat Ltd, UK, 95% Cristalinidade) com um diâmetro de partícula de 5 μ m. Para a fase líquida, usou-se DL-ácido málico (Acros, ND). O quitosano foi adquirido à Sigma-Aldrich e possui um peso molecular médio de 471 000 e um grau de desacetilação de 85%.

4.2.2 Preparação dos cimentos ósseos

Uma solução aquosa de ácido málico 20% foi preparada para a dissolução de quitosano com concentrações que variam de 1 a 5% (p/v). Após complete dissolução, uma determinada quantidade de β -TCP foi adicionada à solução aquosa, de acordo com a razão líquido/sólido apresentada na tabela 4.2, e misturado vigorosamente durante um minuto de forma a formar uma pasta homogénea.

Tabela 4.2 – Preparação de Cimentos Ósseos

Amostra	Concentração de quitosano (% p/v)	Razão Líquido/Sólido* (mL/g)
A	1	1
B	3	0.75
C	5	0.5

* As razões líquido/sólido são as mesmas para todas as amostras.

4.2.3 Tempo de Presa ou solidificação, ts

Actualmente, existem dois métodos standard para se estudar a consistência e endurecimento do cimento, são eles: o método das agulhas Gilmore [Standard Test Method for Time-of Setting of Hydraulic-Cement Paste by Gillmore Needles (ASTM: C 266-89)] e o método das agulhas de Vicat [Standard Test Method for Time of Setting of Hydraulic Cement by Vicat Needle (ASTM C 191-92)]. Ambos consistem numa inspecção visual da superfície do cimento, após uma indentação com uma agulha que poderá ser de Vicat (Komath et al., 2000) ou Gilmore (Sarda et al., 2002; Apelt et al.,2004). Quando, após a indentação, a agulha já não deixar marca então considera-se que o cimento se encontra solidificado. No momento final da adição dos componentes do cimento ósseo, inicia-se a contagem. Após 2 minutos, a pasta é colocada sob uma agulha de Vicat (VNA-01), com uma extremidade circular e carregada com uma massa de 300g. A agulha é libertada sobre o topo da pasta para evitar a aceleração gravitacional com intervalos de tempo de 30s. Quando a extremidade da agulha falha em fazer uma marca circular perceptível na pasta, o tempo de presa é registado. Este procedimento foi repetido 3 vezes para cada formulação.

4.2.4 Teste de Compressão

Preparam-se amostras cilíndricas com um diâmetro de 5.0mm e 10.0mm de altura. A resistência à compressão foi medida usando uma máquina universal de tracção (Instron, modelo 4507). Os ensaios foram realizados a uma velocidade de 5mm/min. As medidas foram efectuadas 24h após o tempo de presa e repetidos 5 vezes para cada formulação.

4.2.5 Injectabilidade

Foi medida a pressão necessária para remover o cimento ósseo do interior de uma seringa de plástico de 5mL. O equipamento usado foi uma máquina universal de tracção (Instron model 4507) com uma célula de carga de 500N. Os ensaios foram realizados a uma velocidade de 60 mm/min. Este procedimento foi realizado com

intervalos de tempo de 2 minutos para cada injeção até o valor de 100N ser ultrapassado. O ensaio foi ainda repetido 3 vezes para cada formulação. No tratamento dos resultados foi usada a equação 4.1.

$$\% \text{Injectabilidade} = \left[1 - \left(\frac{\text{carga necessária para esvaziar a seringa}}{100 \text{ N}} \right) \right] \times 100 \text{ (Equação 4.1)}$$

4.2.6 Difracção de Raios-X (DRX)

Foram realizados difractogramas de cimentos com 24h e 3 semanas, armazenados a 37°C e 55% de humidade. Os ensaios foram realizados num difractómetro Phillips PW 1830, para posições 2θ entre 20° e 45° e com um passo de 1°.

4.2.6 Microscopia Electrónica de Varrimento (SEM)

Dois cimentos foram observados, usando um equipamento Zeiss DSM 963. As amostras foram revestidas a ouro antes da observação por SEM.

4.2.7 Medição da Temperatura

De forma a seguir a evolução da temperatura do cimento ao longo do tempo, um termopar ligado a um voltímetro, foi mergulhado e mantido no interior da pasta de cimento durante 25min.

4.2.8 Testes de Citotoxicidade

A citotoxicidade foi avaliada recorrendo ao teste do MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2-5-brometo de difeniltetrazol) em extractos. Este consiste essencialmente em colocar o material a ser testado (indirectamente) em contacto com uma cultura de células e, em tempo apropriado, observar as alterações celulares que este material ocasiona. Este teste é um método quantitativo e que permite a avaliação da função mitocondrial. O MTT é um sal de tetrazol que é reduzido por enzimas desidrogenases, nas células viáveis formando cristais de formazana solúveis em etanol. Este funciona como um indicador colorimétrico da actividade metabólica celular, sendo a sua forma oxidada amarela e a forma reduzida púrpura. Para o teste, as células (linha celular de fibroblastos L929) foram plaqueadas em placas de

24 poços, contendo em cada poço $1,6 \times 10^3$ células e seguidamente incubadas a $(37 \pm 2)^\circ\text{C}$ em atmosfera húmida com 5% CO_2 . Prepararam-se extractos dos diferentes materiais (incubando o material com meio de cultura a 37°C durante 24 horas), nos quais as células foram plaqueadas, e cuja a actividade metabólica foi determinada após 48 horas. Como controle negativo utilizaram-se células com meio adicional de 10% de soro fetal, para proporcionar um meio óptimo ao seu desenvolvimento e desta forma não se obter qualquer resposta citotóxica. Para além deste, efectuou-se um controlo positivo (meio com 0,01 M de fenol), utilizado para se obter uma resposta reprodutível da percentagem de células viáveis. Por fim, adicionou-se o corante MTT, que em presença de células viáveis, é reduzido a um produto de cor púrpura, permanecendo amarelo no caso de a viabilidade ser reduzida ou quase inexistente. O corante precipitado é diluído em isopropanol e ácido clorídrico e a leitura da densidade óptica (DO) é medida a 570nm com filtro de referência de 655nm. Para cada material efectuaram-se cinco réplicas assim como do controlo de células. No controlo positivo o número de réplicas foi de 3. Por fim a percentagem de viabilidade celular é obtida com base nas leituras de absorvância e através da comparação da percentagem de células vivas presentes em cada amostra com o controlo de células.

4.3. Resultados e discussão

A atractividade dos CPCs depende em muito da sua facilidade de manuseamento durante a prática cirúrgica. Estes devem ganhar consistência, num tempo relativamente curto mas que permita ao cirurgião efectuar, a implantação no local e sem que haja atrasos na cirurgia, o que poderia até comprometer a saúde do doente. O quitosano, sendo um biopolímero, biocompatível e biodegradável torna a sua incorporação num cimento ósseo vantajosa por diversas razões de natureza biológica, sendo uma delas o facto de esta macromolécula ser degradada pela lisosima comprovando a sua biodegradabilidade (Xiupeng Wang et al., 2006). Nas formulações de cimento estudadas verificou-se um tempo de presa máximo de 23 minutos e um tempo mínimo de 3 minutos, sendo a razão quantidade de solução ácida/ quantidade de β -TCP (razão L/S) a que mais influência possui (Tabela 4.3). Em termos teóricos, a reacção de endurecimento começa por se realizar devido à quelação do cálcio com o ácido carboxílico, passando para uma segunda fase de formação do fosfato de cálcio final, encontrando-se o tempo de presa entre estas duas etapas. Foi ainda verificado que inicialmente o cimento atravessa um período em que é possível moldá-lo como se este se tratasse de pastilha elástica.

Tabela 4.3 – Efeito da concentração de polímero no tempo de presa

	Quitosano (% p/v)	Tempo de Presa (min)		
		L/S=1	L/S=0.75	L/S=0.5
A	1	18	10	3
B	3	20	12	4
C	5	23	16	5

Os dados do presente trabalho sugerem que o aumento do tempo de presa pode ser atribuído à presença de quitosano uma vez que este aumenta com o teor em quitosano. Foram obtidos resultados semelhantes por Yokoyama e colaboradores em cimentos de bruxite com quitosano (Yokoyama et al., 2002). Uma possível justificação para este fenómeno poderá ser a presença de cargas positivas na

superfície das cadeias de quitosano que provocam forças de repulsão entre as

cadeias poliméricas e as moléculas de cálcio, promovendo melhor distribuição e mantendo desta forma o cimento trabalhável durante mais tempo (Alves Rocha, 2006). Leroux e colaboradores, em 1999, afirmam que o quitosano adsorve os novos cristais de bruxite inibindo a sua formação e crescimento (Leroux et al., 1999). Em termos de aplicação cirúrgica, os tempos de presa deverão ser curtos, cerca de 15 minutos, de forma a ser possível a sua aplicação mas também que, uma vez introduzidos, sejam estruturalmente estáveis e possuam capacidade mecânica para suportar alguma carga (Zou et al., 2008). A gama de tempos mais interessante para aplicação cirúrgica, na forma injectável é obtida para uma razão líquido/sólido de 0,75 (mL/g). Em termos de comportamento mecânico verifica-se que o incremento tanto da quantidade de polímero quanto do fosfato de cálcio induz um aumento na resistência à compressão (Figura 4.2). Também se verifica que a presença de quitosano tem uma influência superior sobre a resistência à compressão o cimento. Tal facto pode ser explicado pelo aumento de coesão do cimento devido à presença de polímero que, funcionando como uma cola, permitirá uma mais eficiente distribuição de cargas pela amostra (Hatin et al. ,1998; Wiupeng Wang, et al, 2006). Outro factor poderá ser a diminuição de porosidade da amostra e consequente aumento da densidade.

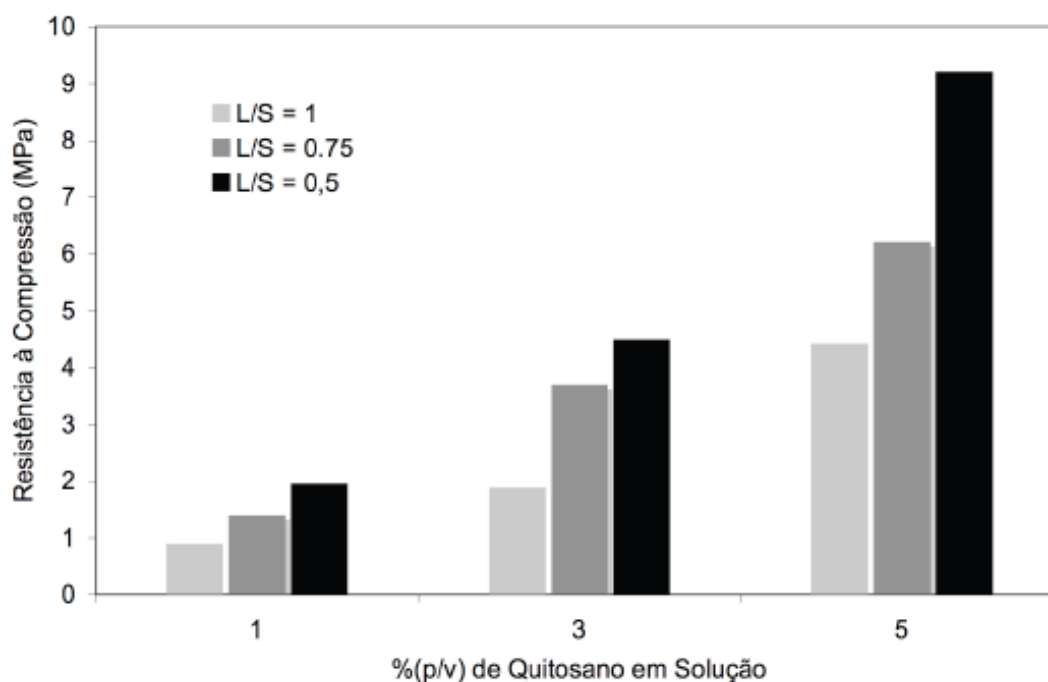


Figura 4.2 - Resistência à compressão de diferentes CPCs

Os módulos de compressão apresentados são semelhantes aos blocos de hidroxiapatite sinterizada, com valores entre 2-11MPa (Shuchanek et al., 1998), e superiores aos módulos de compressão do osso trabecular humano, com valores a rondar 3.5MPa (Damien et al., 1991), sendo que estes se encontram ainda longe do necessário para o osso humano compacto, 135MPa e também de valores apresentados na literatura, com valores de 30MPa para o bio-cimento comercial CEMENTEK (Leroux et al., 1999). A solubilidade do α -TCP na solução inicial pode ser justificativa deste facto. Boudeville e colaboradores referem que a solubilidade inicial dos elementos que compõem o cimento é determinante para a formação da estrutura do fosfato de cálcio final e, conseqüentemente, das suas propriedades mecânicas (Boudeville et al., 1999). Segundo Gbureck e colaboradores, a solubilidade do β -TCP é diminuída pela sua cristalinidade, pelo que a utilização de β -TCP com 95% de cristalinidade pode ser uma das razões para a diminuição do módulo de compressão (Gbureck et al., 2003).

A injectabilidade de um cimento ósseo é importante para aplicações em cirurgias minimamente invasivas. O cimento aplicado desta forma não deverá possuir uma carga de aplicação acima dos 100N, representando uma pressão de cerca de 10Kgf disponível na mão humana. Dois outros factores são igualmente importantes para esta forma de aplicação, os fenómenos de filter pressing e a capacidade do cimento se moldar à cavidade a preencher. No primeiro é importante que o cimento se mantenha agregado durante a injeção, não ocorrendo separação das fases líquida e sólida. Para o segundo, é importante que o cimento seja injectado durante a fase de moldação, de forma a que ocupe na totalidade a cavidade e se mantenha coeso no seu interior. De notar que pelas figuras 4.3 (a, b e c) é possível verificar que o cimento, para formulações acima da razão de 0,75mL/g, se mantém injectável até perto do tempo de presa, com valores máximos de 90N próximo do tempo de presa. Para as mesmas formulações, foi possível ainda verificar que existe um período de tempo onde a força necessária para injectar o cimento sofre pequenas alterações, entre 10-20N, traduzindo-se por ser o período de tempo anterior ao tempo de moldação, determinado por inspecção manual.

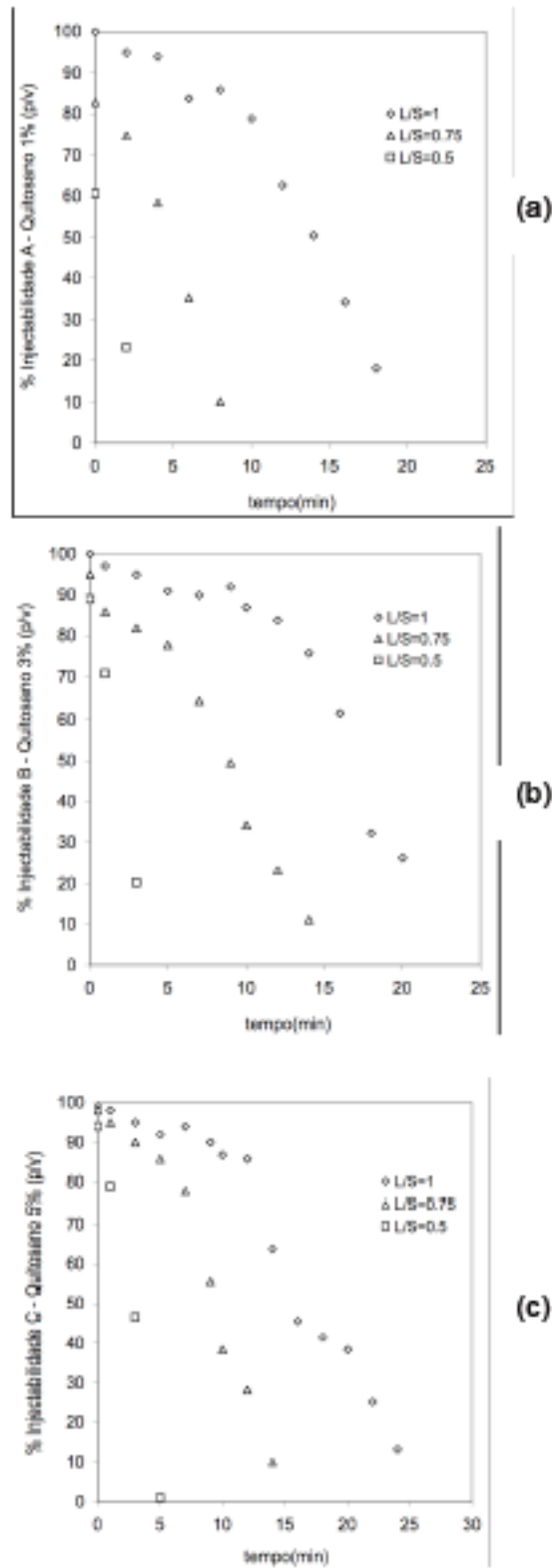
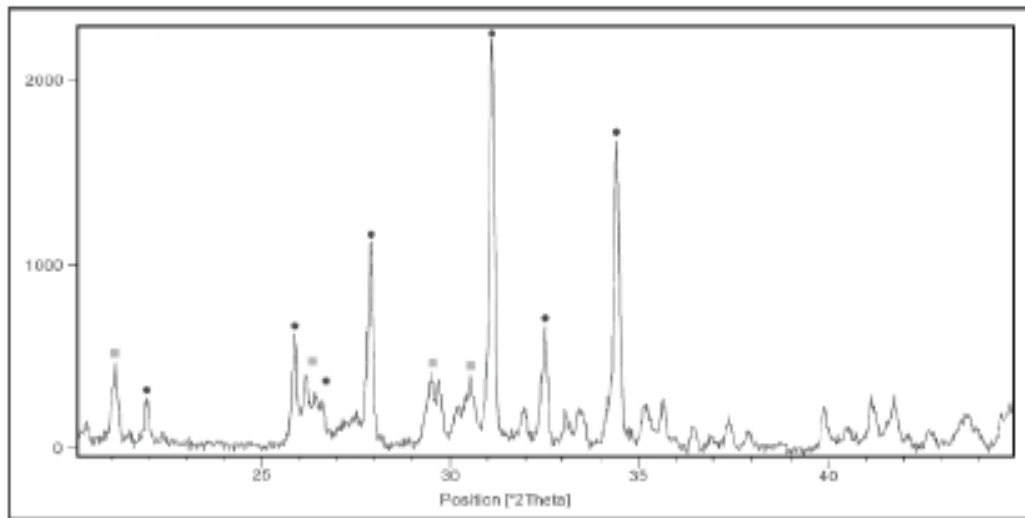


Figura 4.3 – Injetabilidade dos cimentos com 1% (a), 3% (b) e 5% (p/v) (c) de quitosano e diferentes razões L/S.

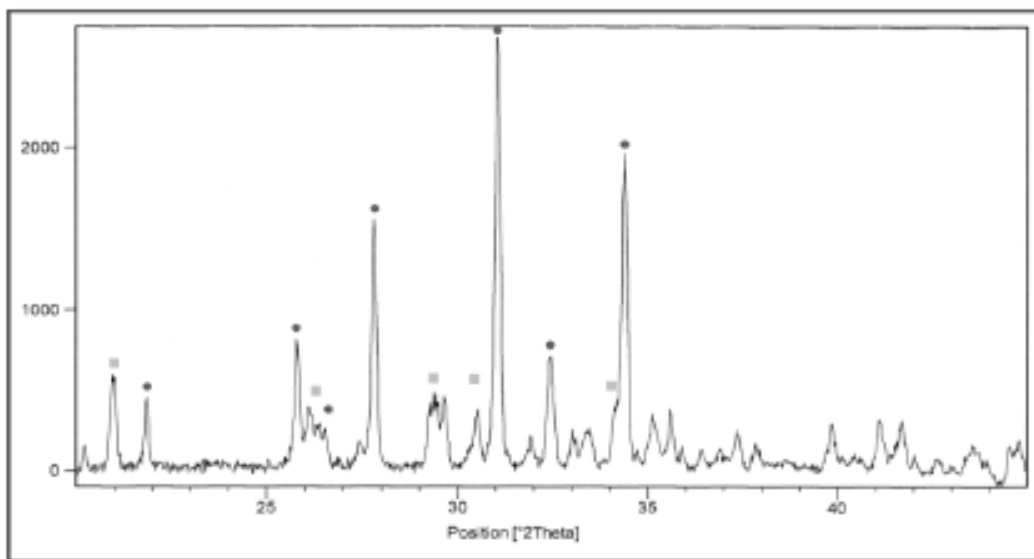
À partida, a introdução de um polímero no cimento significa que este tornará a formulação mais viscosa, pelo que, a injectabilidade do cimento poderia ser afectada. No entanto, verificou-se que os fenómenos de injectabilidade são melhorados pelo aumento da concentração de polímero na fase líquida, sendo o tempo de injeção encurtado pelo aumento da fracção sólida do cimento. Tal facto pode ser explicado pela ocupação de espaço pelas cadeias poliméricas no interior do cimento, com carga electrostática idêntica, facilitando o escoamento das partículas sólidas (fosfato de cálcio) presentes no mesmo. Igualmente, a adsorção das partículas de fosfato de cálcio evita a acumulação de líquido junto das partículas sólidas o que aumenta o tempo de presa (t_s) mas também o tempo de manuseabilidade (t_m), ou como verificado, o tempo correspondente ao patamar óptimo de injectabilidade (Alves Rocha et al., 2006). Nos presentes ensaios a totalidade do cimento foi removido da seringa, não se tendo verificado, através de uma inspecção visual, qualquer acumulação de cimento no interior desta, encontrando-se o cimento perfeitamente intacto à saída. O equipamento de tracção foi restringido para uma força máxima de carga de 150N, valores que somente foram atingidos para lá do tempo de presa, sendo que para estes valores parte do cimento ficou retido no interior da seringa, porque a máquina parou.

A partir dos resultados obtidos por difracção de raios-x (DRX), figura 4.4, foi possível confirmar que houve formação de bruxite, como seria de esperar pelo valor de pH. No entanto, seria de esperar uma conversão total do β -TCP em DCPD, sendo que tal não sucedeu nem ao fim de 24h nem ao fim de 3 semanas. A ausência de conversão total do β -TCP pode estar relacionada com a quantidade de ácido usada, uma vez que o anião do ácido málico estabelece ligações quelantes com o ião cálcio, não o deixando disponível para reagir e formar bruxite (Leroux et al., 1999).

O complexo formado desta forma acaba por precipitar, sendo esta a estrutura observada nos ensaios de DRX. Por outro lado, a amostra com 3 semanas foi armazenada seca a 37°C, especulando-se se na presença de fluidos fisiológicos pudesse ter sido convertida em bruxite.



(a)

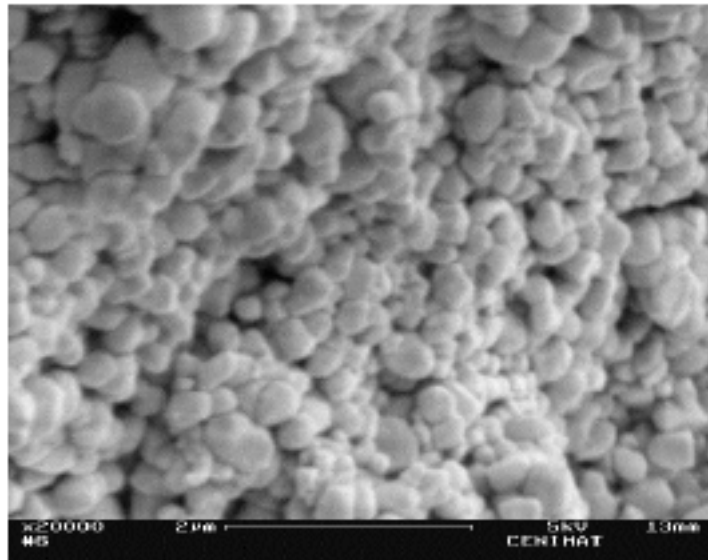


(b)

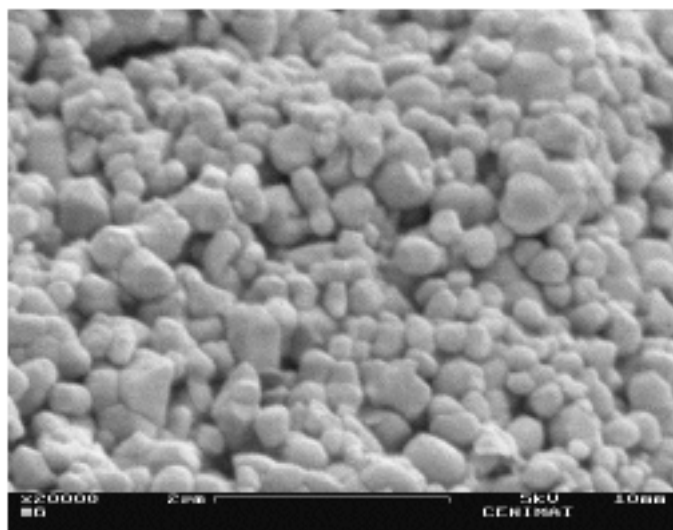
Figura 4.4 – Difractograma do cimento após 24h (a) e 3 semanas (b) ● β -TCP □ DCPD

Nas observações por SEM procurou-se verificar se o cimento possuía porosidade, uma vez que este é um factor determinante para a osteointegração e angiogénese, necessárias à formação de novo tecido ósseo. Verifica-se, pelas figuras 4.5 (a) e (b), que o cimento possui porosidade. Sendo o quitosano um biopolímero que se degrada no interior do corpo humano pela acção da enzima lisozima, e sendo esta degradação superior à degradação da qualquer outro componente do cimento, é

expectável que gradualmente a porosidade no interior do cimento aumente. Assim facilita-se a osteointegração e formação de novo tecido sem que exista uma brusca perda de características mecânicas. A presença de porosidade é também uma das razões para a obtenção dos valores baixos de resistência mecânica à compressão.



(a)



(b)

Figura 4.5 – Imagem SEM da superfície do CPC B: L/S=1 (a) e L/S=0,75 (b)

Na figura 4.6 apresenta-se, a título de exemplo, a variação da temperatura durante a preparação dos diferentes cimentos (diferentes quantidades de quitosano), com

razão L/S igual a 1. Os outros cimentos apresentam uma evolução da temperatura semelhante à registada na figura 4.6,

Da observação da figura 4.6, é possível verificar que a reacção de mistura dos fosfatos de cálcio com a solução ácida de quitosano é do tipo exotérmica devido ao

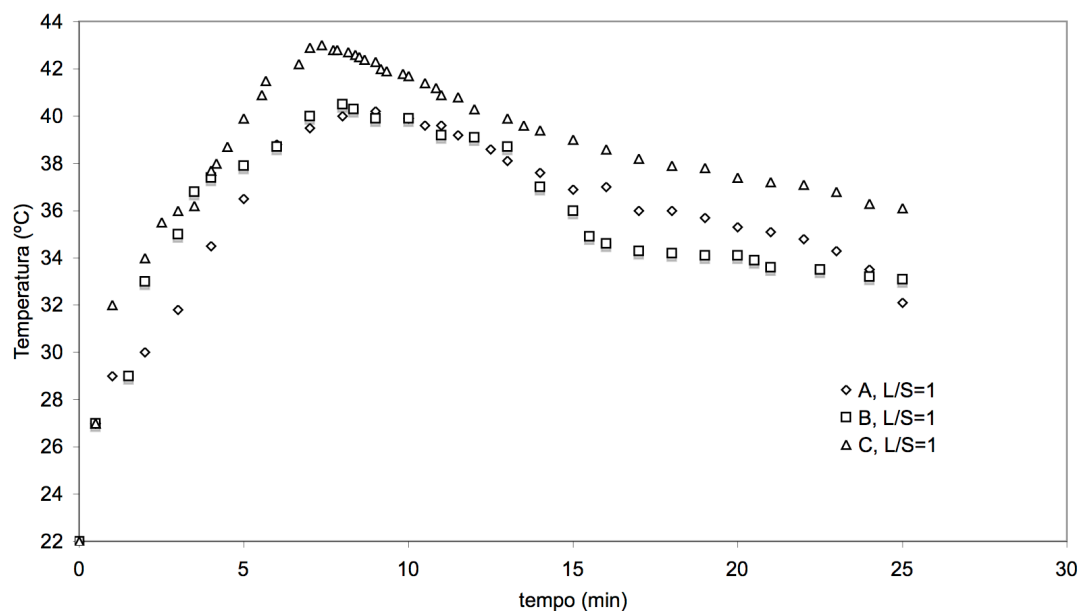


Figura 4.6 – Variação da temperatura ao longo da preparação do cimento

aumento de temperatura durante a sua preparação. A temperatura do cimento pouco ultrapassa os 42 °C, estando dentro dos limites óptimos para a sua aplicação no interior do corpo humano, sem que tal comprometa os tecidos envolventes.

Verifica-se ainda que, a quantidade de quitosano presente no cimento influencia de forma pouco significativa a temperatura da pasta do cimento.

Os testes de citotoxicidade foram efectuados com o intuito de testar a viabilidade celular, isto é, o número de células que se encontram viáveis após o contacto com o produto. Estes foram realizados de acordo com a norma ISO 10993-5.. Nestes testes começou por se medir a viabilidade de todas as formulações e razões L/S, pelo método de MTT em extracto. As amostras de cimento foram esterilizadas com etanol de síntese 96% durante 21h, ficando a incubar durante 24h a 37°C. Em seguida colocou-se o meio de extracção em contacto com as células durante 42h.

Os resultados obtidos são apresentados na tabela 4.4.

Tabela 4.4 - Resultados do teste de citotoxicidade (% de viabilidade celular) dos 3 CPC em função da razão L/S

Amostras	L/S=1	L/S=0.75	L/S=0.5
A	3,16	1,69	1,34
B	1,12	1,82	1,66
C	1,61	1,69	1,34
Controlo Positivo		2,37	

Em todas as amostras verifica-se que a viabilidade é muito reduzida, sendo os valores da mesma ordem de grandeza do controlo positivo, não se registando grandes diferenças em termos de razão L/S nem da quantidade de quitosano.

Contudo estes resultados podem dever-se ao facto da reacção não estar completa o que faz com que tanto o CPC como o meio de extracção apresentem um pH muito baixo causando morte celular. Após estes primeiros resultados procederam-se a novos testes, para tentar compreender a extensão da reacção e a sua influência na viabilidade do cimento. Nestes utilizou-se apenas um CPC: aquele que reuniu as melhores propriedades ao longo dos testes anteriores, ou seja, o B com a razão L/S de 0,75. Contudo, neste caso variou-se o tempo após o qual se adicionou o meio de extracção à amostra e o método de incubação. No final algumas das reacções foram paradas, colocando-se as amostras em etanol e secando-se a 50°C, para ver se isso também poderia interferir com a viabilidade. A designação de cada amostra de CPC e as condições a que cada uma foi mantida é apresentado na tabela 4.5.

Tabela 4.5 - Designação e condições a que cada amostra foi mantida antes dos testes de citotoxicidade

Amostra	Condições
1	O CPC foi preparado e mantido durante 4 dias a 37°C e 55% de Humidade Relativa
2	O CPC foi preparado e mantido durante 4 dias a 37°C e em soro fisiológico.
3	O CPC foi preparado e mantido durante 4 dias a 37°C e em soro fisiológico, no final a reacção foi parada com etanol.
4	O CPC foi preparado e mantido durante 3 meses à temperatura ambiente.
5	O CPC foi preparado e mantido durante 3 meses à temperatura ambiente, no final a reacção foi parada com etanol.

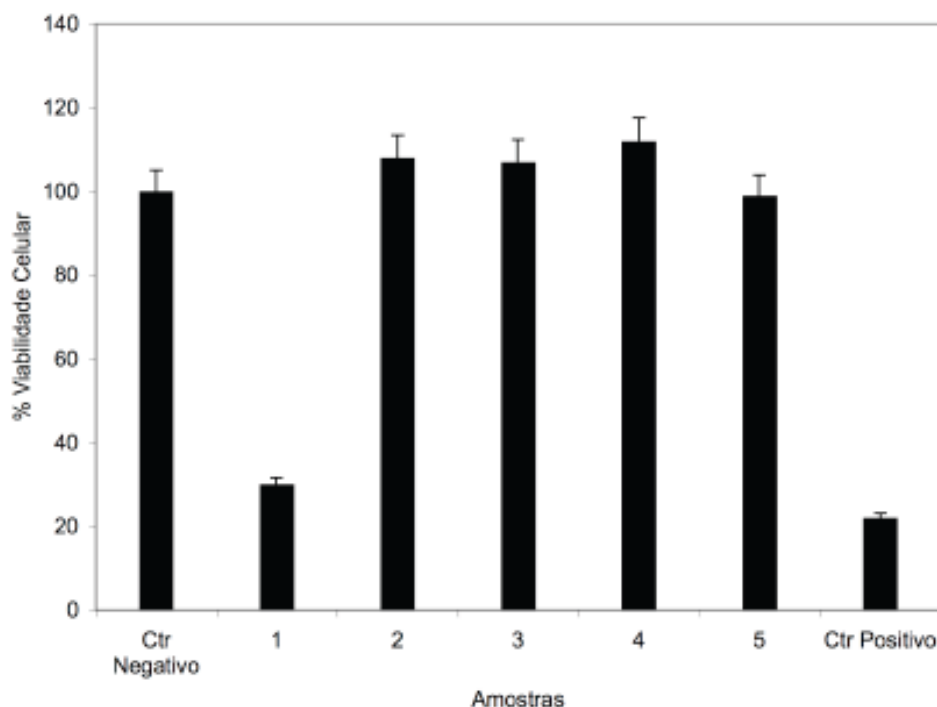


Figura 4.7 – Avaliação da viabilidade celular

Observando os valores da figura 4.7, verifica-se que o único caso onde a viabilidade continua a ser reduzida é aquele que secou apenas a uma Humidade relativa de 55%. Qualquer uma das outras amostras, quer com apenas 4 dias, quer com 3 meses apresentam uma viabilidade tão ou mais elevada do que o controlo negativo (100%), ou seja, o número de células que se obteve no final foi, na maioria dos casos, superior ao número inicial, o que significa que nesta situação o material não têm qualquer efeito citotóxico. O facto de se usar o etanol para se parar a reacção parece não ter relação directa com a viabilidade. A resposta citotóxica, como nos sugerem os primeiros resultados, deve-se provavelmente à utilização de uma grande concentração de ácido, que faz com que o pH inicial da pasta seja muito baixo. Contudo o pH deverá aumentar e estabilizar perto de 6, uma vez que este é o pH de equilíbrio para um cimento de bruxite (DCPD) composto inicialmente por !-TCP, como foi referido anteriormente, página 141.

As medições de pH, efectuadas ao longo do tempo encontram-se representadas na figura 4.8. Verificou-se que para todos os CPC, na altura da mistura dos componentes, a pasta é extremamente ácida com o pH a rondar 3.1, devido à presença de ácido málico. Após uma hora, as amostras foram colocadas em soro fisiológico e efectuaram-se novas medições, mudando-se o soro todos os dias.

Verificou-se uma tendência de subida de pH, tendo o mesmo estabilizado para valores perto de 6 (5,8) ao fim de 6 dias.

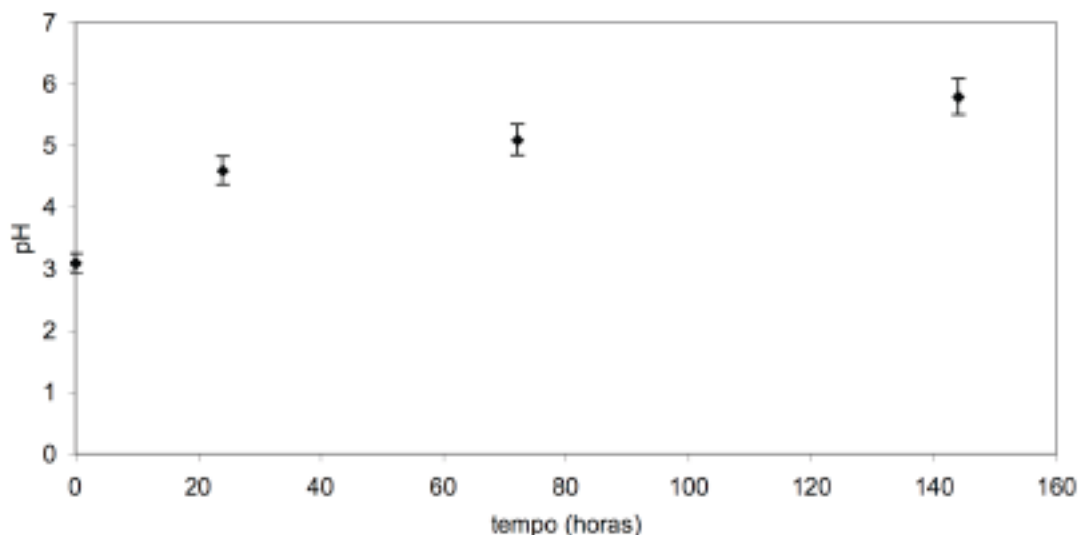


Figura 4.8 - Evolução do pH para o CPC B, L/S=0,75

Assim, não é de estranhar que este apresente uma resposta citotóxica durante os primeiros dias em que está em contacto com fluídos pois o pH é muito baixo, levando a alguma morte celular. No entanto, como nos sugerem os resultados da segunda experiência, onde se deixou as amostras a “envelhecer” em soro fisiológico, verificou-se que, passados apenas 4 dias, este já não provoca qualquer resposta citotóxica e até permite o crescimento celular (viabilidade acima de 100%). Assim apesar da toxicidade inicial do CPC, não se deve excluir à partida a sua utilização porque com o tempo este torna-se completamente viável, daí que a resposta in vivo deva ser avaliada. Isto é, em certa medida, o que acontece com os cimentos de PMMA. O monómero MMA é citotóxico ao início, causando igualmente morte celular, contudo este cimento é amplamente utilizado. Por outro lado, a elevada temperatura desenvolvida durante a polimerização deste monómero induz também necrose de tecido ósseo.

4.4 Conclusão

Foi possível produzir um cimento ósseo biocompatível, com propriedades mecânicas próximas do osso humano trabecular. Considera-se ainda que o cimento produzido possui características de operação ótimas em termos de tempo de presa ou solidificação (t_s) e injectabilidade, com valores até 23 minutos de solidificação e patamares de injectabilidade até 10min com valores abaixo dos 2Kgf. A presença de componentes totalmente biocompatíveis como o β -TCP e o quitosano, aliados a uma estrutura porosa sugerem que o produto deva permitir uma excelente osteointegração.

Tabela 4.6 - Resumo dos parâmetros obtidos em comparação com os de referência

Parâmetro	Valor Ótimo	Valor Obtido
t_i	Aprox. 1min	30s-1min
t_s	Mínimo: 5min Máximo: 20min	Cimentos L/S=0.75, 10,12,16 min
t_u	Máximo: 5min	Máximo: 5min
σ_c	5 – 50 MPa	2 – 12 MPa
T	35 - 45 °C	Máximo: 42°C
pH	(6.5 - 8.5).	1º dia – 3,1 6º dia – 5,8

De forma a alargar o espectro de aplicação deste cimento é determinante o incremento das propriedades mecânicas, essencialmente a resistência à compressão. Sugerem-se como soluções para o aumento destes valores a utilização de uma fase de fosfato de cálcio amorfa e, para a fase polimérica, a utilização de um polianião. Este polianião que estabelecerá ligações do tipo covalente com o ião cálcio, permitindo a precipitação do fosfato de cálcio final na superfície das cadeias poliméricas. No entanto, a quantidade de polianião não poderá ser demasiadamente elevada de forma a não prejudicar a estequiometria da reacção de formação do fosfato de cálcio final. Pode-se especular ainda que a inclusão de partículas

nanométricas, tanto cerâmicas como poliméricas, possa resultar num incremento de propriedades mecânicas, uma vez que, poder-se-á formar um maior número de ligações por pontes de hidrogénio. Este aumento dever-se-á sobretudo ao incremento de área de contacto entre estas partículas, por serem nanométricas.

4.5 Referências

- Andrianjatovo, H.; Lemaître, J.; (1995) Effects of polysaccharides on the cement properties in the monocalcium phosphate/ β -tricalcium phosphate system. *Innov Tech Biol Med*, Vol. 16S, pp. 140–147.
- Alves, H.; Santos, L.; Bergmann, C.; (2008) Injectability evaluation of tricalcium phosphate bone cement. *J Mater Sci: Mater Med* 19:2241–2246
- Alves, H.; Bergmann, C.; Santos, L.; (2006) Additives Influence on the Injectability of Tricalcium Phosphate Bone Cement *Revista Matéria*, v. 11, n. 3, pp. 324 – 331,
- Apelt, D.; El-Warrak AO, Zlinszky K, Bettschart-Wolfisberger R, Böhner M, Matter S, Auer JA, von Rechenberg B (2004) *In vivo behavior of three different injectable hydraulic calcium phosphate cements*. *Biomaterials*, Vols. 25 (7-8), pp. 1439–1451
- Bajpai P.; Fuchs C.; McCullum D.; (1987) Development of tricalcium phosphate ceramic cements. Quantitative characterization and performance of porous implants for hard tissue applications, Vol. 953, pp. 377-388
- Barralet, J.; E., Grover, L.; Gbureck, U.; (2004) Ionic modification of calcium phosphate cement viscosity. PartII : hypodermic injection and strength improvement of brushite cement. *Biomaterials*, Vol. 25, pp. 2197–2203.
- Boudeville, P.; Serraj, S.; Leloup, J.M.; Margerit, J.; Pauvert B.; Terol, A.J.; (1999) *J.Mater. Sci. Mater. Med.*,10:99
- Böhner, M.; vanLanduyt, P; Merkle, HP.; 1997) Composition effects on the pH of a hydraulic calcium phosphate cement. *J Mater Sci: Mater Med* , Vol. 8 , pp. 675–681.
- Böhner, M.; (2000) Calcium orthophosphates in medicine: from ceramics to calcium phosphate cements, *Injury*, Vol. 31, pp. SD 37-47.

- Bohner, M.; Gbureck, U.; Barralet, J.; (2005) Technological issues for the development of more efficient calcium phosphate bone cements: A critical assessment *Biomaterials* 26, 6423–6429
- Bohner, M.; Lemaitre, J., Ring, T. Hydraulic properties of tri-calcium orthophosphate—phosphoric acid—water mixtures. [ed.] P. Duran e J.F. Fernandez, Castellon de la Plana : Faenza Editrice Iberica S.L., pp. 95–100, (1993)
- Bohner, M.; Gbureck, U.; (2008) Thermal reactions of brushite cements. *J Biomed Mater Res Part B*, Vol. 84B, pp. 375-385.
- Brown, W.E.; Tung, M.S.; (1983) Characterization and modification of electrochemical properties of teeth *J Dent Res* 62,672
- Brown, W.; Chow L.C. (1986) A new calcium phosphate water setting cement. In: Brown PW (ed) *Cements research progress*. American Ceramic Society, Westerville, p 352
- Burguera, E.F.; Hockin, H.; Xu, K.; Sun, L.; (2008) *Journal of biomedical Materials Research Part B- Applied Biomaterials* 84B, 2, 493-502
- Buchanan, F.; Gallagher, L.; Jack, V.; Dunne, N.; (2007) Short-fibre reinforcement of calcium phosphate bone cement *Proceedings Institution Mechanical Engineering Part H: J Engineering Medicine* 221:203
- Cama, G.; Barberis, F.; Botter, R.; Cirillo, P.; Capurro, M.; Quarto, R.; Scaglione, S.; Finocchio, E.; Mussi, V.; Valbusa, U.; (2009) *Acta Biomaterialia* Volume 5, Issue 6, Pages 2161-2168
- Charriere, E; Terrazzoni, S; Pittet, C, (2001) Mechanical characterization of brushite and hydroxyapatite cements. *Biomaterials*, Vol. 22, pp. 2937–2945.
- Cherng, A; Takagi, S; Chow, LC; (1997) Effects of hydroxypropyl methylcellulose and other gelling agents on the handling properties of calcium phosphate cement. *J Biomed Mater Res*, 35, 273–7.

- Constantz, BR; Barr, BM; Ison, IC, (1998) Histological, chemical, and crystallographic analysis of four calcium phosphate cements in different rabbit osseous sites. *J Biomed Mater Res*, Vol. 43, pp. 451– 461.
- Comuzzi, L.; Ooms, E.; Jansen, J.; (2002) Injectable calcium phosphate cement as a filler for bone defects around oral implants: an experimental study in goat. *Clinical Oral Implants Research* : s.n., Vol. 13, pp. 304–311.
- Damien, C.; Parson, J.; (1991) Bone graft and bone graft substitutes: A review of current technology and applications. *J Appl Biomater*, 2:187–208.
- Dorozhkin, S.; (2008) Calcium orthophosphates, *J Mater Sci* 43:3028–3057
- Driessens, F.; Planell, J.; Gil, F.; (1995) Calcium phosphate Bone cement. *Encyclopedic Handbook of Biomaterials and Bioengineering: Applications*, Vol. 2, pp. 855,
- Driessens, F.;(1999) Chemistry and applied aspects of calcium orthophosphate bone cements. *Concepts and clinical applications of ionic cements*. September 8, Arcachon, France
- Driessens, F.; Verbeeck, R.; (1988) Relation between physico-chemical solubility and biodegradability of calcium phosphates. *Amsterdam* : Elsevier, pp. 105-111.
- Driessens, F.; (1997) Calcium phosphates and ceramics bone cements vs. acrylic cements. *Anales de Química*, Vol. 93, pp. S38-S43.
- Frayssinet, P; Gineste, L; Conte, P, (1998) Short-term implantation effects of a DCPD-based calcium phosphate cement. *Biomaterials*, Vol. 19, pp. 971–977.
- U. Gbureck, O. Grolmsa, J.E. Barraletb, L.M. Groverb, R. Thulla Mechanical activation and cement formation of b-tricalcium Phosphat. *Biomaterials* 24 (2003) 4123–4131

GRUNINGER, SE; SIEW, C; CHOW, L Evaluation of the biocompatibility of a new calcium phosphate setting cemen., J. Dent. Res, Vol. 63, p. 200 (1984).

Grover, LM; Gbureck, U; Young, AM, Temperature dependent setting kinetics and mechanical properties of b -TCP-pyrophosphoric acid bone cement. J Mater Chem, Vol. 15, pp. 4955– 4962, (2005).

Ikenaga, M; Hardouin, P; Lemaitre, J, Biomechanical characterization of a biodegradable calcium phosphate hydraulic cement: a comparison with porous biphasic calcium phosphate ceramics. J Biomed Mater Res, Vol. 40, pp. 139– 144, (1998).

ISO 10993-5: *Biological Evaluation of Medical Devices*

Hansen C., McQueen, D., Friis, E., Cooke, F., Widenhouse C., (2008) The Journal of Arthroplasty Volume 23, Issue 2, February 2008, Pages 279-2867.

Hatim, Z. Elaboration et E´ tude de Ciments et Ce´ramiques Phosphocalciques a Usage Orthopedique. Toulouse: These de l’Institut National de Toulouse; 1998.

Hofmann, M., (2005) Carboxylic acids as brushite bone cement setting retardants. Naples: Proceedings of the 19th European Conference on Biomaterials. pp. 411– 418.

Komath, M.; Varma, H. K.; Sivakumar, R.; (2000) *On the development of an apatitic calcium phosphate bone cement*. Bull. Mater. Sci., Vol. 23, pp. 135-140.

Liu H., Li H., Cheng W., Yang Y., Zhu M., Zhou M. Acta Biomaterialia 2 (2006) 557– 565

Leroux, L., Hatim, Z., Freche M., Lacout L., (1999) Effects of various adjuvants (lactic acid, glycerol, and chitosan) on the injectability of a calcium phosphate cement Bone 25 31

- Lemaitre, J., Mirtchi, A. e Mortier, A. Calcium phosphate cements for medical use: state of the art and perspectives of development. *Silicates Industriels*, Vols. 9-10, pp. 141-146, (1987).
- Khairoun I, Boltong MG, Driessens FCM, Planel JA (1997) *Biomaterials* 18:1535
- Monma H. Materials chemistry of calcium phosphate cement. *J Jpn Soc Biomater* 1997;15:24–30.
- Munting, E., Mirtchi, A. A. e Lemaître, J. Bone repair of defects filled with a phosphocalcic hydraulic cement: an in vivo study. *J Mater Sci Mater Med* , Vol. 4, pp. 337–344, (1993).
- Nzihou, A; Sharrock, P; Ricard, A Reaction kinetics and heat transfer studies in thermoset resins, *Chemical Engineering Journal* 72 (1999) 53-61.
- Ohura, K; Bohner, M; Hardouin, P Resorption of, and bone formation from, new beta-tricalcium phosphate-monocalcium phosphate cements: an in vivo study. *J. Biomed. Mater. Res.* , Vol. 30, pp. 193–200, (1996).
- Perioli, L., Ambrogi V., Venezia L., Pagano, C., Ricci M., Rossi, C., 2008, Chitosan and a modified chitosan as agents to improve performances of mucoadhesive vaginal gels *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 66, 1, pág.:141 -145
- Rinaudo M. (2006), *Progress in Polymer Science* Volume 31, Issue 7, July 2006, Pages 603-63
- Sarda, S.; (2002) *Kinetic study of citric acid: Influence on calcium phosphate bone cements as water-reducing agent*. *J. Biomed. Mater. Res*, Vol. 61, pp. 653-659
- Santos L., Carrodeguas R., Boschi A., de Arruda A. (2003) alpha-tricalcium phosphate cement: "in vitro" cytotoxicity *J Biomed Mater Res A* 65A:244
- Suchanek W, Yoshimura M. Processing and properties of hydroxyapatite- based

biomaterials for use as hard tissue replacement implants. *J Mater Res* 1998;13:94–117.

Takagi, S.; L.C. Chow, S. Hirayama, F. C. Eichmiller, 2003 Properties of elastomeric calcium phosphate cement-chitosan composites *Dental Materials* Volume 19, Issue 8, December, Pages 797-804

Takechi M, Miyamoto Y, Ishikawa K, Toh T, Yuasa T, Nagayama M, Suzuki K. Initial histological evaluation of anti-washout type fast-setting calcium phosphate cement following subcutaneous implantation. *Biomaterials* 1998;19:2057–63.

Von Gonten A., Kelly J., Antonucci J. (2000) Load-bearing behavior of a simulated craniofacial structure fabricated from a hydroxyapatite cement and bioresorbable fiber-mesh. *J Mater Sci Mater Med* 11:95

Villacampa A., Garca-Ruiz J.,(2000) Synthesis of a new hydroxyapatite-silica composite material *J Cryst Growth* 211:111

Wang X., Chen L., Xiang H., Ye J., Influence of Anti-Washout Agents on the Rheological Properties and Injectability of a Calcium Phosphate Cement *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* 2007, 81, 2, 410-418

Xu H., Quinn J., Takagi S., Chow L.C. (2002) Processing and properties of strong and non-rigid calcium phosphate cement *J Dent Res* 81:219

Khairoun I, Driessens FCM, Boltong MG, Planell JA, Wenz R (1999) Addition of cohesion promoters to calcium phosphate cements *Biomaterials* 20:393

Yokoyama, A., Yamamoto, S., Kawasakia, T., Kohgob, T., Nakasuc, M.; (2002) Development of calcium phosphate cement using chitosan and citric acid for bone substitute materials *Biomaterials* 23 1091–1101

YU D, WONG J, MATSUDA Y, Self-setting hydroxyapatite cement: a novel skeletal drug delivery system for antibiotics, *J. Pharm Sci*, Vol. 81(6), pp. 529–31,

(1992).

Zhang Y, Xu H., Takagi S., Chow LC (2006) In-situ hardening hydroxyapatite-based scaffold for bone repair J Mater Sci Mater Med 17:437

Zhang Y, Xu HHK (2005) Effects of synergistic reinforcement and absorbable fiber strength on hydroxyapatite bone cement J Biomed Mater Res A 75A:832

Capítulo V

Produção de Nanofibrilas de Quitina à Escala Laboratorial

5. Produção de Nanofibrilas de Quitina à Escala Laboratorial

5.1 Introdução

Em 2002, Eugene Khor, considerou que a quitina ainda era um material em espera. Foi descoberta há dois séculos, mas ao invés de outros materiais semelhantes, a quantidade de estudos realizados sobre esta molécula ainda é considerado pequeno face a sua potencialidade. (Khor, 2002)

O quitosano é o derivado mais importante da quitina, e ocupou um lugar de destaque devido à sua superior solubilidade. No entanto, a quitina tem encontrado campos de aplicação à escala nano, mais propriamente no reforço de estruturas poliméricas (Marchessault et al., 1959, Dufresne, 2008). A esta escala, a sua baixa solubilidade deixa de ser um factor negativo para passar a ser um benefício uma vez que as nanofibrilas de quitina, formam suspensões coloidais em água.

5.1.1 Produção de Nanofibrilas de Quitina

Em 1993, Revol et al., propôs um método para a produção de nanofibrilas de quitina sendo para tal necessário executar uma hidrólise ácida da β -quitina. Genericamente, 1g de quitina seca é adicionada a 10 mL de HCl 3M, durante 1 hora à temperature de 110°C. O produto então obtido é submetido a uma etapa de lavagem, em que são executadas centrifugações sucessivas com substituição do sobrenadante. Quando o sistema atinge o pH de 2, uma suspensão coloidal surge espontaneamente, com um aspecto translúcido. A partir deste momento, conservando-se os sobrenadantes é possível separar as nanofibrilas das restantes partículas de quitina. Prosseguindo com diálise contra água, é possível obter uma suspensão coloidal com pH de 7, sendo possível ainda liofilizar de forma a obter nanofibrilas secas. Poderá ser necessário aplicar um tratamento com ultrasons, num período máximo de 1 min, para forçar a dispersão de partículas. Mais tarde, Belamie et al., propôs que a etapa de lavagem fosse realizada somente na diálise, não indicando o procedimento para

a separação dos nanofibrilas das restantes partículas de quitina. É indicado ainda, pelos autores que ocorre cerca de 30-40% de perda de massa durante o processo devido à dissolução de partículas no ácido (Revol et al., 1993; Belamie et al., 2004). A α -quitina possui uma estrutura altamente cristalina (capítulo I), com pequenas fracções amorfas. Estas fracções funcionam como defeitos na estrutura onde ocorre clivagem pela acção do ácido, formando-se monocamadas cristalinas das partículas que são mais resistentes ao ataque ácido. Desta forma é esperado a formação de estruturas lamelares quitinosas, constituídas de cadeias lineares de baixo grau de polimerização (Robin et al., 1974).

Para que uma fibrila seja considerada nanofibrila, esta terá que ter pelo menos uma das dimensões inferior a 100nm. Neste caso, uma típica nanofibrila de quitina com origem da casca de camarão ou caranguejo, possui diâmetros na ordem dos 10 a 20nm e comprimentos superiores a 300nm. Armand Morin e colaboradores produziram nanofibrilas pelo mesmo método que Revol e Marchessault, mas com quitina proveniente dos tubos de vermes *Riftia*, uma origem considerada rara uma vez que estes tubos se encontram no fundo de oceanos. As nanofibrilas desta fonte, possuem um factor de forma (razão comprimento/diâmetro, L/D) muito elevado. Estas nanofibrilas apresentam comprimentos que chegam 2200 nm e factores de forma superiores a 120. Os factores de forma das fontes habituais de quitina as cascas de crustáceos, situa-se na ordem dos 15 (Morin et al., 2002).

Tabela 5.1 - Resumo das dimensões de nanofibrilas de quitina obtidas de diferentes fontes (adaptado de Dufresne, 2008)

Fonte	Comprimento (nm)	Diamêtro (nm)	Factor de Forma	Referência
Tubos de Vermes <i>Riftia</i>	2200	18	122	Morin et al., 2002
Caranguejo	80-350	8-12	10-30	Nge e tal, 2003 Ymin Fan et al., 2009
Camarão	200-500	10-15	17- 28	Goodrich et al., 2007 J. Junkasem et al., 2009
Cartilagem de Lulas	150-800	10	15-80	Paillet et al., 2001

Outros métodos para a produção de nanofibrilas de quitina, foram introduzidos por Ymin Fan e colaboradores, na tentativa de obter, com um elevado rendimento, nanofibrilas totalmente individualizadas. Para tal, apresentam dois métodos alternativos, um usando a TEMPO (2,2,6,6 – Tetrametilenopipredina – 1- oxyl) para mediar a oxidação. Neste processo a percentagem de perdas é reduzida para 10%, não ocorre desacetilação, e a estrutura cristalina bem como a cristalinidade da molécula fica intacta. Após a reacção, é necessário apenas aplicar um tratamento com ultrasons para dispersar as partículas obtidas, sendo que estas apresentam diâmetros de 8nm e comprimentos de 340nm. Mais tarde, o mesmo autor propôs a produção de nanofibrilas em água com pH entre 3-4 durante 5 dias, seguido de tratamento com ultrasons de 1min. Neste estudo as partículas de quitina foram, inicialmente, parcialmente desacetiladas através de um tratamento com NaOH a 8,25M formando-se grupos desacetilados na superfície das fibrilas de quitina. Os grupos amina II (NH₂) na superfície das nanofibrilas de quitina, a pH abaixo de 6 tornam-se amina III (NH₃⁺) e estas cargas positivas obrigam a separação das fibrilas em nanofibrilas por repulsão (Ymin Fan, 2008 e 2010).

5.1.2 Modificação Química

Não existem muitos estudos dedicados à modificação química das nanofibrilas de quitina. Li e colaboradores, N-sulfonaram nanofibrilas de quitina, por reacção heterogénea com Tri-Etilamina/SO₃ ou Piridina/SO₃. Na caracterização feita por TEM, verificou-se que a reacção não provocou grande alteração no perfil dos bastonetes, nem da sua homogeneidade, embora se tenha verificado maior agregação de nanofibrilas. Este estudo revelou ainda que para valores de substituição superiores a 3, as suspensões formam estruturas nemáticas quirais, com passos de hélice de 40µm (Li et al., 1997).

Feng e colaboradores, produziram bio-nanocompósitos a partir do enxerto de nanofibrilas de quitina em cadeias de policaprolactona. Para tal, misturaram nanofibrilas de quitina a diferentes concentrações, na reacção de polimerização da caprolactona, tendo depois realizado filmes por injeção. Da caracterização destes filmes, a integração das nanofibrilas revelou aumento da tensão de ruptura, extensão à ruptura e ainda um aumento da hidrofobicidade (Feng et al., 2009). A desacetilação das nanofibrilas de quitina, é uma modificação química feita por

alguns autores. Lertwattanaseri e colaboradores, modificaram com sucesso as nanofibrilas para graus de desacetilação próximos de 95%. No entanto, a partir de técnicas como TEM e difracção de raio-X verificaram que os bastonetes formados perderam cristalinidade e rigidez, tendo-se agregado e formado uma matriz continua (Lertwattanaseri et al., 2009).

5.1.3 Fases Líquido-Cristalinas

Quando em água, as nanofibrilas de quitina, em forma de bastonetes, atingem uma concentração crítica, ocorrendo uma separação em duas fases, sendo uma isotrópica e outra anisotrópica. É reconhecido que estas moléculas de quitina possuem uma pequena percentagem de grupos desacetilados, que quando em contacto com ácidos formam a chamada amina III, ou NH_3^+ , devido à presença de protões de hidrogénio. Tal como exemplificado na figura 5.1, esta presença provoca a formação de uma dupla camada eléctrica, impenetrável em volta da nanofibrila que aumenta o diâmetro de cada uma. Quando duas nanofibrilas, com a mesma dupla camada, se aproximam, ocorre repulsão e é criada uma ordem orientacional devido à repulsão das partículas rígidas e empacotadas aquando do aumento da concentração destas em solução (Revol et al., 1993; Nge et al., 2003).

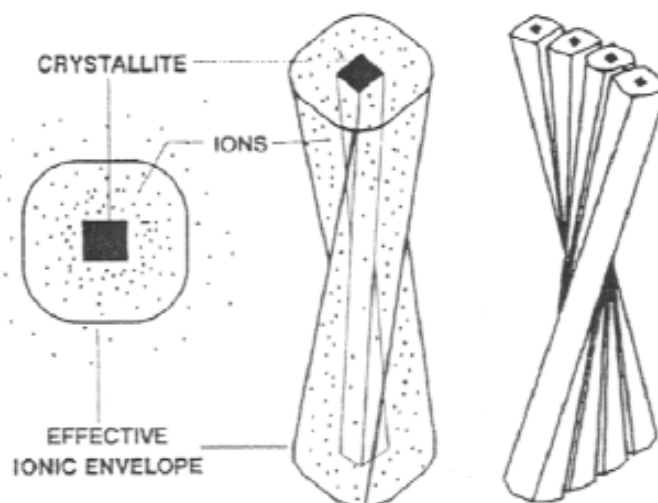


Figura 5.1 – Representação esquemática da dupla camada eléctrica em redor das nanofibrilas (Revol et al., 1993)

Nge e colaboradores, em 2003, fotopolimerizaram poli (ácido acrílico) (PAA) misturado com nanofibrilas de quitina de forma a “congelarem” e preservarem as

características ópticas das mesofases geradas pelas nanofibrilas. A partir de

ensaios de Difracção de raio-X, os autores afirmam que é possível induzir alinhamento das nanofibrilas por cisalhamento e por via magnética, para concentrações acima de 10% em quitina.

5.1.4 Aplicações

Tipicamente, as nanofibrilas de quitina possuem áreas superficiais elevadas, com valores na ordem dos 400 m²/g, e pesos moleculares na ordem dos 2 000 000, com valores de desacetilação perto dos 10%. Estas nanofibrilas podem ser integradas em biopolímeros, e polímeros sintéticos, sem aumento da viscosidade, podendo ser moldadas em objectos por tratamentos térmicos e até reter água a pH fisiológico. (Goodrich et al., 2008, Morganti et al., 2008)

No entanto, não existem estudos concretos relativos a aplicações práticas das nanofibrilas exceptuando a sua aplicação em reforço de estruturas poliméricas. Esta questão será abordada no capítulo VI do presente trabalho.

5.2 Produção e caracterização de nanofibrilas de quitina

5.2.1 Procedimento de produção de nanofibrilas de quitina

Genericamente, 1 g de quitina é adicionada a 10mL de HCl 3M, deixando-se reagir durante 90 minutos à temperatura de 110°C, com refluxo e agitação acima de 1200 rotações por minuto (rpm). Em seguida, deixa-se arrefecer o sistema e coloca-se a mistura reaccional em tubos de centrifugação. Centrifuga-se a mistura reaccional acima de 50 000 rpm e remove-se o sobrenadante. Adiciona-se H₂O a cada um dos tubos e realiza-se nova centrifugação à mesma velocidade. Repete-se este procedimento até o pH do sobrenadante ser igual a 2, verificando-se, neste momento, que parte das nanofibrilas fica em suspensão. O sobrenadante é então guardado e o procedimento anterior é repetido até que se deixe de observar suspensão de nanofibrilas. Os sobrenadantes guardados são tratados com ultrasons durante 1 minuto, de forma a dispersar as nanofibrilas, e depois dialisados contra água até pH neutro. Após esta etapa a suspensão coloidal apresentava uma acumulação de nanofibrilas no fundo do saco de diálise. Optou-se por liofilizar a suspensão de forma a obter nanofibrilas de quitina para uso posterior. Com o intuito de aumentar o rendimento da operação, e uma vez que parte da quitina separada por centrifugação não se fraccionou em nanofibrilas, optou-se por repetir mais duas vezes este procedimento com o resíduo da operação.

Tabela 5.2 - Condições reaccionais usadas para produção de nanofibrilas de quitina

Nanofibrilas de Quitina	Reagente	Concentração (M)	Tempo (min)	Rácio g/mL	Temperatura (°C)	Etapas
NFCH	HCl	3,0	90	1/10	110	1

5.2.3 Caracterização

Métodos Experimentais

- Microscopia Electrónica de Transmissão (TEM)

Preparou-se uma amostra de 10 mL, com 0,02 % p/p de nanofibrilas de quitina dispersos em etanol sob acção de ultrasons durante 1 min. Posteriormente mergulhou-se uma grelha de carbono na solução e retirou-se o excesso de liquid com papel de filtro. O equipamento usado foi um microscópio Hitachi, modelo H8100, tendo a amostra sido observada a 100 kV com um filamento LaB6 (hexaboreto de lantânio). Para determinar o factor de forma, usou-se o software de análise de imagem Image J (Wayne Rasband, National Institutes of Health), versão 1.43u, de uso público.

- Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Para a realização dos espectros FTIR das nanofibrilas de quitina utilizou-se o mesmo método e equipamento referidos no capítulo I.

5.3 Resultados e discussão

Através do método de produção utilizado, obteve-se cerca de 10% de conversão de quitina em nanofibrilas. Em termos comparativos, os únicos valores referidos na literatura são relativos ao trabalho de Ymin Fan e colaboradores, para o processo TEMPO, com cerca de 90% de conversão. A taxa de conversão de quitina em nanofibrilas é baixa, mas provavelmente razoável para o método empregue (Fan et al., 2008). O valor de 10% pode ser justificado pelo tempo de hidrólise empregue ser de apenas 90min, pela possibilidade de nanofibrilas ficarem presas em outras fibras de quitina ou pela possibilidade de dissolução no solvente utilizado. A característica principal das nanofibrilas de quitina são as suas dimensões, sendo o factor de forma, o principal indicador usado para caracterizar estas partículas nanométricas (Dufresne, 2008). Para tal, as nanofibrilas de quitina foram observadas por TEM de forma a determinar as suas dimensões. A figura 5.2 mostra uma imagem de TEM, de uma dispersão de nanofibrilas de quitina em etanol.

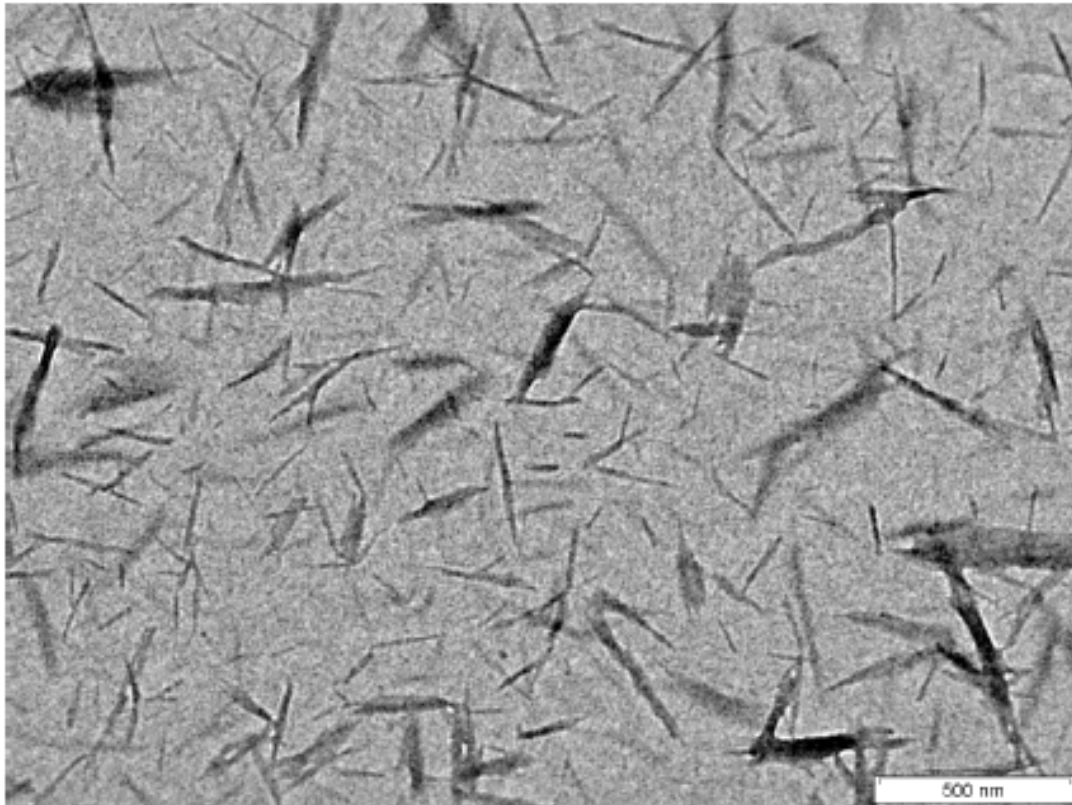
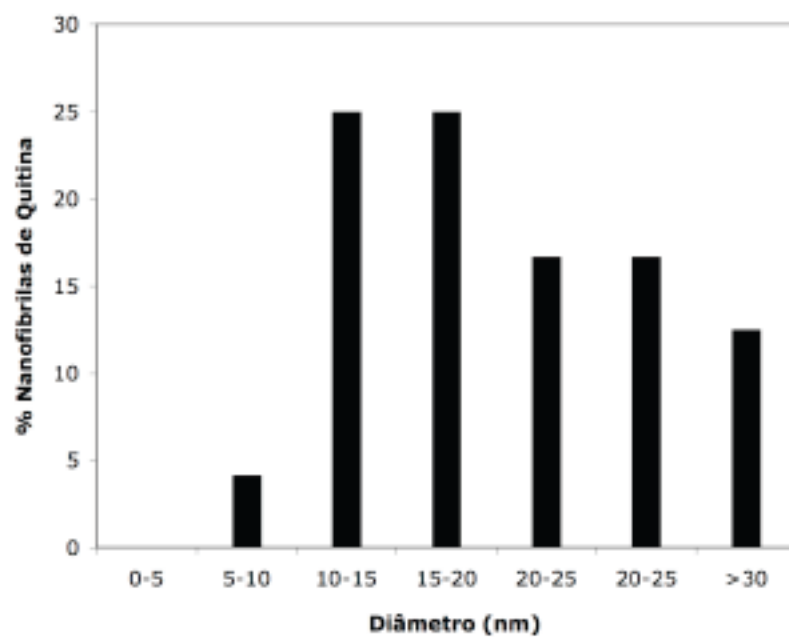
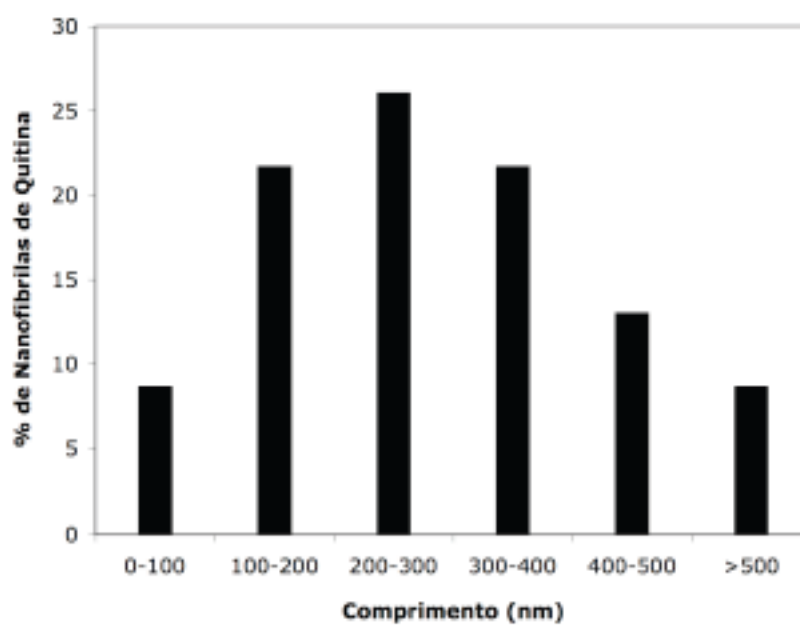


Figura 5.2 - Imagem TEM das nanofibrilas de quitina obtidas após 90min de hidrólise ácida

Do resultado da análise das imagens, é apresentada na figura 5.3 (a) e (b) a distribuição do tamanho das nanopartículas.



(a)



(b)

Figura 5.3 – Histogramas referentes à distribuição do diâmetro (a) e do comprimento (b) das Nanofibrilas

Tabela 5.3 – Dimensões das nanofibrilas produzidas

	Comprimento Médio (nm)	Desvio Padrão	Diâmetro Médio (nm)	Desvio Padrão
NFCH1	303,4	115	19,9	6,79
Factor de forma	15,9 ± 5,8			

Os valores foram determinados a partir da análise de 3 imagens diferentes, tendo-se analisado pelo menos 20 nanofibrilas de quitina por imagem. As nanofibrilas, na forma de bastonete, apresentam uma distribuição de tamanhos aproximadamente normal. O valor de 15,9 obtido para o factor de forma, está em conformidade com o que foi obtido por diversos autores para a β -quitina proveniente da casca de camarão (ver tabela 3.1, pág. 98).

Para melhor compreender as interações que podem ocorrer à superfície do material, considerou-se importante determinar a constituição química das nanofibrilas tendo-se por isso recorrido a espectroscopia de infravermelho.

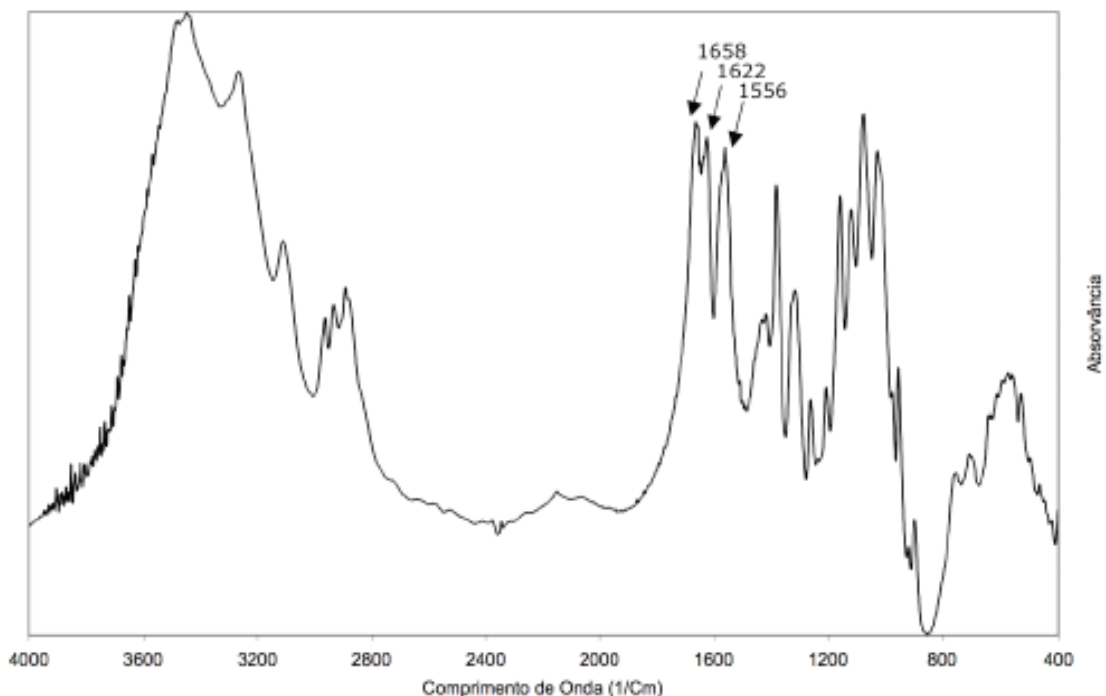


Figura 5.4 - Espectro de infravermelho das nanofibrilas produzidas

O espectro de infravermelho mostra a presença dos três picos típicos da alfa-quitina, observados para os números de onda de 1658, 1622 e 1556 cm^{-1} correspondentes à absorção do grupo carbonilo (J. Blackwell, 1988). Importa ainda referir a ausência do pico a 1540 cm^{-1} , que comprova a ausência de absorção por proteínas (Gaill et al., 1997). Os valores de DD muito baixos (consideravelmente inferiores a 50%), apresentados na tabela 5.4, são típicos da quitina.

Tabela 5.4 – Grau de desacetilação das nanofibrilas produzidas

Amostras	DD (%)
Quitina	4,47
NFCH1	16,97

É sabido que este polímero nunca se encontra totalmente acetilado, sendo normal apresentar uma pequena percentagem de grupos desacetilados. No entanto, comparando o valor de desacetilação da quitina e das nanofibrilas de quitina, observa-se que a hidrólise ácida tem influência no grau de desacetilação. Esta situação está em conformidade com o que foi observado por Alsak Einbu e colaboradores, 2007, que indicam, que tal facto se deve à protonação e clivagem da ligação N-acetilo, concorrente da ligação glicosídica entre as unidades repetitivas do polímero (Einbu et al., 2007).

5.4 Conclusão

No presente capítulo estudou-se a produção de nanofibrilas de quitina, um produto da hidrólise ácida da β -quitina, proveniente da casca de camarão. As nanofibrilas apresentam um factor de forma de 16, e um grau de desacetilação perto de 17%. Este estudo revela-se importante pela introdução de mais uma matéria-prima disponível para a empresa CERAMED, bem como, devido ao potencial que estas estruturas nanométricas podem revelar tem termos de aplicação no reforço de polímeros. Na tabela 5.5 faz-se o resumo das características das nanofibrilas produzidas.

Tabela 5.5 – Sumário das características das nanofibrilas produzidas

Matéria Prima	Fonte	Grau de desacetilação	Factor de Forma
Nanofibrilas de quitina	<i>Penaeus Monodon</i>	16,5 \pm 5%	15,9 \pm 5

5.5 Referências

- Einbu, A.; Grasdalen, H.; Varum, K.M.; (2007) Kinetics of hydrolysis of chitin/chitosan oligomers in concentrated hydrochloric acid, *Carbohydrate Research* 342 1055–1062
- Belamie, E.; Davidson, P.; Giraud-Guille, M. M.; (2004) Structure and chirality of the nematic phase in α -chitin suspensions *J. Phys. Chem. B* 108 14991–5000
- Blackwell, J.; (1988) *Methods Enzymol.*, 161 (Part B), 435.
- Dubief, D.; Samain, E.; Dufresne, A.; (1999) Polysaccharide microcrystals reinforced amorphous poly(β -hydroxyoctanoate) nanocomposite materials, *Macromolecules* 32, pp. 5765–5771
- Dufresne, A.; (2008) Polysaccharide nanocrystal reinforced Nanocomposites, *Can. J. Chem.* 86: 484–494
- Fan, Y.; Saito, T.; Isogai, A.; (2008). Chitin nanocrystals prepared by TEMPO mediated oxidation of α -chitin. *Biomacromolecules*, 9, 192–198.
- Fan, Y.; Saito, T.; Isogai, A.; (2009). TEMPO-mediated oxidation of β -chitin to prepare individual nanofibrils. *Carbohydr. Polym.*, 77, 832–838.
- Feng, L.; Zhou, Z.; Dufresne, A.; Huang, J.; Wei, M.; An, L.; (2009) Structure and Properties of New Thermoforming Bionanocomposites Based on Chitin Whisker-Graft-Polycaprolactone *Journal of Applied Polymer Science*, Vol. 112, 2830–2837
- Gaill, F.; Persson, J.; Sugiyama, J.; Vuong, R.; Chanzy, H.; (1992) *J. Struct. Biol.*, 109, 116.
- Goodrich, J.D.; Winter, W.T.; (2008) Alpha-Chitin Nanocrystals Prepared from

Shrimp Shells and Their Specific Surface Area Measurement, *Biomacromolecules*, 8, 252-257

Khor, E.; (2002). Chitin: a biomaterial in waiting. *Current Opinion in Solid State and Materials Sci.*, 6, 313-317.

Morin, A.; Dufresne, A.; (2002) Nanocomposites of Chitin Whiskers from *Riftia* Tubes and Poly(caprolactone), *Macromolecules*, 35, 2190-2199

Nge, T.T.; Hori, N.; Takemura A.; Ono, H.; (2003) Phase Behavior of liquid crystalline chitin/acrylic acid liquid mixture. *Langmuir*, 19, 1390-1395

Nair, K.G.; Dufresne, A; (2003a) Crab shell chitin whisker reinforced natural rubber nanocomposites. Processing and swelling behavior. *Biomacromolecules*, 4, 657-665

Nair, K.G.; Dufresne, A.; (2003b) Crab shell chitin whiskers reinforced natural rubber nanocomposites. Mechanical behavior. *Biomacromolecules*, 4, 666-674

Nair, K.G.; Dufresne, A.; (2003c) Crab shell chitin whiskers reinforced natural rubber nanocomposites. Effect of chemical modification of chitin whiskers. *Biomacromolecules*, 4, 1835-1842

Lertwattanaseri, T.; Ichikawa, N.; Mizoguchi, M.; Tanaka, Y.; Chirachanchai, S.; (2009) Microwave technique for efficient deacetylation of chitin nanowhiskers to a chitosan nanoscaffold *Carbohydrate Research* 344 331–335

Lu, Y.; Weng, L.; Zhang, L.; (2004) Morphology and properties of soy protein isolate thermoplastics reinforced with chitin whiskers. *Biomacromolecules*, 5, 1046-1051

Li, J.; Revol, J.F.; Marchessault, R.H.; (1997) Effect of N-sulfonation on the colloidal and liquid crystal behavior of chitin crystallites. *Journal of colloid and interface science*, 192, 447-457.

Robin, J.P.; Mercier, C.; Charbonnière, R.; Guilbot, A.; (1974) Lintnerized starches. Gel filtration and enzymatic studies of insoluble residue from prolonged acid treatment of potato starch, *Cereal Chemistry* **51**, pp. 389–406.

Revol, J.F.; Marchessault, R.H.; (1993) *In vitro* chiral nematic ordering of chitin crystallites *Int. J. Biol.Macromol.* **15** 329–35

Capítulo VI

Estudo da Aplicação de Nanofibrilas de Quitina no Reforço de
Filmes de PVA

6. Estudo da aplicação de nanofibrilas de quitina no reforço de filmes de PVA

6.1 Introdução

Com referido anteriormente, a casca de marisco é um desperdício da indústria alimentar, encontrando-se disponível em grandes quantidades a baixo custo. Em consequência, novos materiais derivados destes recursos são actualmente considerados “eco-friendly” não só devido à sua biodegradabilidade, mas também porque a sua utilização evita o uso de outros materiais que não sejam desperdício. Considera-se que o uso de aditivos naturais como as nanofibrilas de quitina, provenientes das referidas fontes, representa um investimento importante para preservação do meio ambiente podendo ser também interessante em termos industriais, caso os compósitos que daí resultem possuam melhores comportamentos, sobretudo a nível da absorção de água e das propriedades mecânicas (Lu et al., 2004).

A inclusão das nanofibrilas em diversas matrizes poliméricas, tanto sintéticas como naturais, mostrou-se benéfica no reforço de propriedades mecânicas, na melhoria da capacidade de absorção de água ou na estabilidade térmica. O melhoramento substancial das propriedades mecânicas está acima de tudo relacionado com a

interface criada entre o polímero e a nanofibrilas ou com a força das interacções nanofibrila-nanofibrila (Dubief et al., 1999). Lu e colaboradores, reforçaram filmes obtidos a partir de proteínas de soja com nanofibrilas de quitina, sendo esta mistura processada por liofilização seguida de prensagem a quente na presença de 30% de glicerol. Os nanocompósitos assim produzidos foram caracterizados com recurso a ensaios de tracção, calorimetria e teste de inchamento. As percentagens de nanofibrilas estudadas foram de 0 a 20%, e em termos de resultados verificou-se um

aumento de 26 para 158 MPa para o módulo de Young, um incremento de 3.3 para 8.5 MPa, em termos da tensão de ruptura, e um decréscimo da extensão à ruptura de 205% para 29%. Registou-se ainda um decréscimo da taxa de inchamento devido ao carácter hidrofóbico das nanofibrilas de quitina. Estes autores explicam que a melhoria de propriedades mecânicas se deve à formação de ligações por ponte de hidrogénio entre as nanofibrilas e as proteínas de soja, bem como a formação de pontes de hidrogénio entre as nanofibrilas (Lu et al., 2004). Outros trabalhos referem um melhoramento significativo da “performance” dos materiais devido à formação de uma rede entre nanofibrilas, promovida por pontes de hidrogénio, o que ocorre acima do limiar de percolação, ponto em que esta rede assume preponderância sobre o restante material (Morin et al., 2002, Nair et al., 1999, Garcia-Ramirez et al., 1995,1996, Dufresne et al., 1999,2000).

O termo percolação foi primeiramente introduzido por Hammersley em 1957, e refere-se a um modelo geométrico estatístico. Este modelo pode ser aplicado a qualquer sistema onde se preveja que exista a possibilidade de conexão entre os constituintes. Em trabalhos com nanofibrilas de celulose foi provado que o material atinge a percolação acima de uma fracção volúmica crítica (Flandin et al., 2000). Este limiar de percolação é a diferença entre a conexão de um número finito de elementos para uma conexão com um número infinito de elementos (Samir et al., 2005). Os factores que influenciam este limite, são o factor de forma das nanofibrilas, a possibilidade de ocorrerem interacções entre partículas e a sua orientação. Quando aplicado a nanofibrilas de celulose, este modelo permite descrever o aumento incomum do comportamento mecânico, uma vez que pressupõe a formação de uma rede rígida entre as nanofibrilas. A aplicação deste modelo envolve três passos:

- 1) A determinação do limiar de percolação, através da equação 6.1.. Esta equação foi deduzida, por análise estatística, assumindo que as

partículas têm uma forma cilíndrica e que se tocam na extremidade formando uma rede infinita. Estes pressupostos permitiriam estabelecer a relação entre a fracção volúmica de partículas e o factor de forma:

$$v_{RC} = \frac{0,7}{(L/D)}$$

(Equação 6.1)

em que v_{RC} é o limiar de percolação, L o comprimento das nanofibrilas e D o diâmetro das mesmas (Favier et al., 1997b).

2) O segundo passo, é a determinação do módulo de Young do agente de reforço, ou seja, no presente trabalho das nanofibrilas de quitina. A determinação é usualmente feita pelo estudo de filmes compostos somente por nanofibrilas, sendo óbvio que os valores obtidos para o módulo de Young assim determinados são diferentes dos obtidos para uma nanofibrila isolada. A fonte das nanofibrilas bem como o método de produção e as interacções que se estabelecem entre elas influenciam o valor do módulo de Young. Valores entre 6-15 GPa são usuais para as nanofibrilas de celulose, ao passo que para nanofibrilas de quitina é usual verificarem-se valores entre 0.5 – 2 GPa (Samir et al., 2005; Morin et al., 2002).

3) A descrição do compósito envolve a descrição de um modelo que comporte as 3 fases, ou seja, a matriz, o agente de reforço em percolação e o agente de reforço sem percolação. Ouali e colaboradores, adaptaram o modelo fenomenológico série-paralelo de Takayanagi, e apresentaram um modelo em que a rede de percolação está em paralelo com a série composta pela matriz e as nanofibrilas não percolantes, tal como descrito na figura 6.1. A partir deste modelo, o módulo de Young do compósito pode ser expresso através da seguinte equação:

$$E_c = \frac{(1 - 2\psi + \psi v_r) E_S E_R + (1 - v_r) \psi E_R^2}{(1 - v_r) E_R + (v_r - \psi) E_S} \quad \text{(Equação 6.1)}$$

em que R e S designam a fase rígida e a fase “soft”, ou seja, respectivamente, o reforço e a matriz do material compósito. O parâmetro φ é um factor de correcção da fracção volúmica de nanofibrilas envolvida na percolação e pode ser determinada a partir da seguinte equação:

$$\psi = 0, \quad v_r \leq v_{rc}$$

$$\psi = v_r \left(\frac{v_r - v_{rc}}{1 - v_{rc}} \right)^{0,4}, \quad v_r > v_{rc}$$

(Equação 6.3)

Em que v_r é a fracção volúmica das nanofibrilas e v_{rc} o limiar de percolação (ou seja, a fracção volúmica acima da qual se dá a percolação das nanofibrilas), determinada pela equação 6.1.

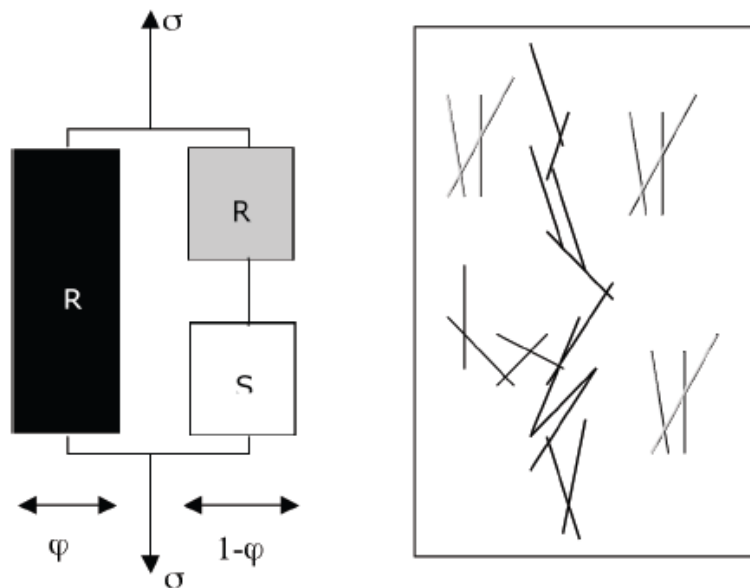


Figura 6.1 – Representação esquemática do modelo série-paralelo, em que R é a fase composta por nanofibrilas e S a fase composta pelo polímero (Adaptado de Samir et al., 2005). A preto representa-se a fracção de reforço em percolação, e a cinzento a fracção não percolante do mesmo.

Outro modelo extensivamente utilizado em engenharia para a modelação de

propriedades mecânicas de compósitos, é o modelo de Halpin-Tsai (Halpin et al., 1976). Apesar de apresentar algumas limitações, possui de uma forma simples a capacidade de calcular constante elásticas do material em questão. As equações de Halpin-Tsai foram formuladas para compósitos de fibras contínuas alinhadas, a partir do modelo auto-consistente generalizado de Hermans e das relações de Hill (Hermans, 1967; Hill, 1963). A forma geral destas equações é a seguinte:

$$\frac{M_c}{M_m} = \frac{1 + \xi \cdot B \cdot \nu_R}{1 - B \cdot \nu_R} \quad \text{(Equação 6.4)}$$

e

$$B = \frac{\frac{M_r}{M_m} - 1}{\frac{M_r}{M_m} + \xi} \quad \text{(Equação 6.5)}$$

em que M_r e M_m representam, respectivamente, o módulo do reforço (as fibras) e o módulo da matriz (quer seja módulo de compressibilidade, K , de Young, E , ou de corte, G).

Foi ainda provado por Halpin e Kardos que as equações de Halpin-Tsai poderiam ser aplicadas a compósitos reforçados por fibras curtas, pelo que no presente trabalho as vamos aplicar a compósitos reforçados por nanofibrilas (Halpin et al., 1976). Usando o parâmetro ξ , que é função da geometria do reforço e da direcção de aplicação da carga, as equações acima podem ser usadas para avaliar os módulos do compósito.

Neste trabalho, em que nos interessa estimar o módulo de Young na direcção da aplicação da carga, este parâmetro toma o valor da equação 6.6.

$$\xi = 2 \times \frac{L}{D} \quad \text{(Equação 6.6)}$$

Uma importante modificação das equações de Halpin-Tsai (equações 6.4 e 6.5) foi proposta por Nielsen (Nielsen, 1970). As equações originais mostraram-se inexactas para elevadas fracções volúmicas de reforço, como consequência do facto de o modelo de Hermans não ter em conta o limite existente para a fracção máxima de fibras admitida em sistemas reais (Hermans, 1967). Desta forma Nielsen propõe a seguinte modificação às equações de Halpin-Tsai:

$$\frac{M_c}{M_m} = \frac{1 + \xi \cdot B \cdot v_R}{1 - B \cdot \Omega \cdot v_R} \quad \text{(Equação 6.7)}$$

onde,

$$\Omega = \frac{1 - \Phi_m}{\Phi_m^2} \cdot v_R \quad \text{(Equação 6.8)}$$

A introdução do parâmetro Ω tem em conta a fracção máxima de reforço, Φ_m , admitida por um sistema compósito. Esta fracção é função do tipo de empacotamento do reforço tomando, por exemplo, o valor 0,785 para um empacotamento cúbico e o valor 0,907 para um empacotamento hexagonal (Nielsen et al., 1994). Estes valores elevados são típicos de compósitos de fibras contínuas alinhadas. No caso dos compósitos deste trabalho, onde as nanofibrilas geralmente se dispõem aleatoriamente, Φ_m pode tomar valores consideravelmente mais baixos (Nielsen et al., 1994). Devido à incerteza relativamente à fracção máxima de reforço e à sua dependência quer do alinhamento do reforço, quer do factor de forma do mesmo, Φ_m é usado como um factor empírico de ajuste nas equações de Halpin-Tsai.

O poli(álcool vinílico), PVA, é um polímero produzido a partir da reacção de desacetilação do poli(acetato de vinilo), figura 6.2, sendo bastante útil por ser um polímero hidrofílico, totalmente solúvel em água. Possui excelente capacidade de formação de filmes, bem como óptimas resistências química e mecânica (Martien, 1986). No entanto, estas propriedades ocorrem apenas no estado seco, uma vez que este polímero é bastante hidrofílico e a absorção de água diminui

consideravelmente as suas propriedades, chegando mesmo a dissolver-se novamente. Esta característica limita substancialmente o seu campo de aplicação, sendo normal executar reticulação química, nomeadamente através do uso de glutaraldeído, um composto químico bastante tóxico (J.S Park et al., 2001). O PVA é ainda biocompatível e biodegradável, sendo estas características bastante apreciadas para a sua utilização em compósitos com outros biopolímeros, nomeadamente o quitosano, a celulose ou a policaprolactona para a produção de dispositivos médicos com o objectivo de substituir pele ou cartilagem (V. Sedlarik et al., 2006, E. Mangala et al., 2003 , J.S. Park et al., 2001).

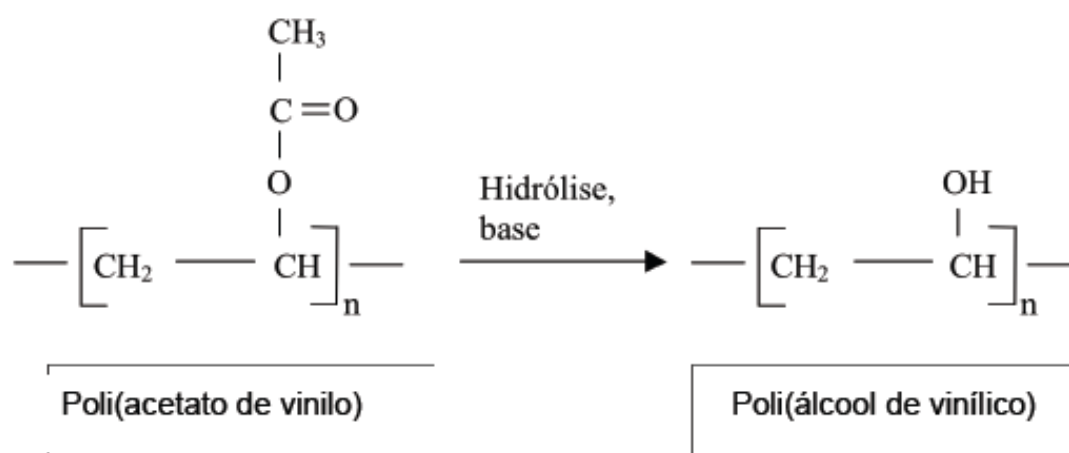


Figura 6.2 - Esquema reaccional de formação de poli(álcool vinílico)

Os compósitos produzidos por inclusão de nanofibrilas em PVA poderão ser úteis não só para aplicações médicas, mas também para outras áreas, nomeadamente em engenharia química, onde filmes como estes foram aplicados para a separação de misturas de água-etanol, imobilização de enzimas, separação de proteínas ou remoção de metais em águas poluídas (M. Beppu et al., 2007, B. Duan et al., 2006, D. Musale et al. 2000, J. Shen et al. 2007). Nestes casos, características como as resistências química e mecânica são determinantes para o comportamento de membranas de separação.

O presente capítulo tem como objectivo o estudo do reforço de filmes de PVA com nanofibrilas de quitina, bem como a melhoria de características como a resistência à água, com possíveis aplicações em cosmética, na produção de embalagens biodegradáveis e em processos de separação (Engenharia Química).

6.2 Parte Experimental

6.2.1 Produção de filmes de PVA reforçados com nanofibrilas de quitina

Foram preparadas soluções aquosas de PVA (ACROS, 95% de Hidrólise, Mw=95 000) . Para dissolução completa em água destilada, elevou-se a temperatura a 80°C e deixou-se durante 1h com agitação magnética e refluxo. Após este tempo deixou-se a solução em repouso durante a noite. Para a produção dos filmes de PVA reforçados com nanofibrilas, dispersaram-se diferentes quantidades de nanofibrilas de quitina (NFCH, L/D=15,9, DD=16%) em soluções aquosas de PVA 2%(p/v). De forma a dispersar as nanofibrilas, as soluções foram sujeitas a ultrasons durante 1min. Prepararam-se soluções contendo 0, 1, 2, 4, 6 (p/v) de NFCH. Os filmes foram produzidos com o auxílio de uma régua calibrada sobre uma superfície de Teflon-. Os filmes obtidos secaram ao ar e, posteriormente, foram destacados do suporte.

6.2.2 Caracterização

• Ensaio de tracção

Os ensaios de tracção dos filmes produzidos foram realizados numa máquina de tracção Rheometric Scientific, modelo Minimat – Firmware 3.1., à temperatura ambiente. Foram traccionadas, uniaxialmente 15 amostras, de 5 x 2 mm, a uma velocidade de 5 mm/min. Das curvas de tracção foram obtidos, o módulo de Young (E), a tensão de ruptura ou resistência à tracção (σ_u) e a extensão à ruptura (ϵ_u).

Todos os resultados foram obtidos com um grau de confiança de 95 % para a média.

- Calorimetria diferencial de varrimento, DSC

Ensaio de calorimetria foram realizados em 10mg de cada amostra, num equipamento NETZSCH DSC 204F1 Phoenix. Optou-se por realizar uma primeira etapa até 110°C, de forma a remover excesso de humidade que possa estar contida nos filmes de PVA. Os termogramas são referentes à segunda etapa de aquecimento de 25 a 250°C, feitos com uma velocidade de aquecimento de 10°C/min, e a partir desta obtiveram-se os valores das temperaturas de transição vítrea (T_g) e de fusão (T_f) do polímero.

6.3 Resultados e Discussão

Visualmente, os filmes com nanofibrilas revelam uma crescente opacidade em comparação com o filme de PVA, e uma total homogeneidade. A opacidade é função da quantidade de nanofibrilas presente num filme. Durante a lenta evaporação do solvente aquando da formação dos filmes, a viscosidade da solução mantém-se baixa permitindo a ocorrência de rearranjos na posição das nanofibrilas. Um dos principais motivos para a inclusão de aditivos em polímeros é a melhoria da sua processabilidade. Aditivos plastificantes são embebidos entre as cadeias poliméricas, ocupando espaço entre elas e diminuindo por isso a temperatura de transição vítrea (T_g). Desta forma o polímero aditivado torna-se mais macio e flexível a temperaturas inferiores, sendo possível processá-lo a temperaturas mais baixas, o que se traduz em economia do processo. No entanto, características mecânicas

como a tensão à ruptura são geralmente diminuídas. A temperatura de transição vítrea é a medida da energia necessária para permitir o movimento das cadeias poliméricas. A esta temperatura o polímero torna-se mais macio e quando uma força lhe é aplicada as cadeias facilmente escorregam entre elas. Na figura 6.3, está representado o termograma típico do PVA, sendo a T_g determinada no ponto de inflexão da primeira alteração do declive e a T_f no pico endotérmico.

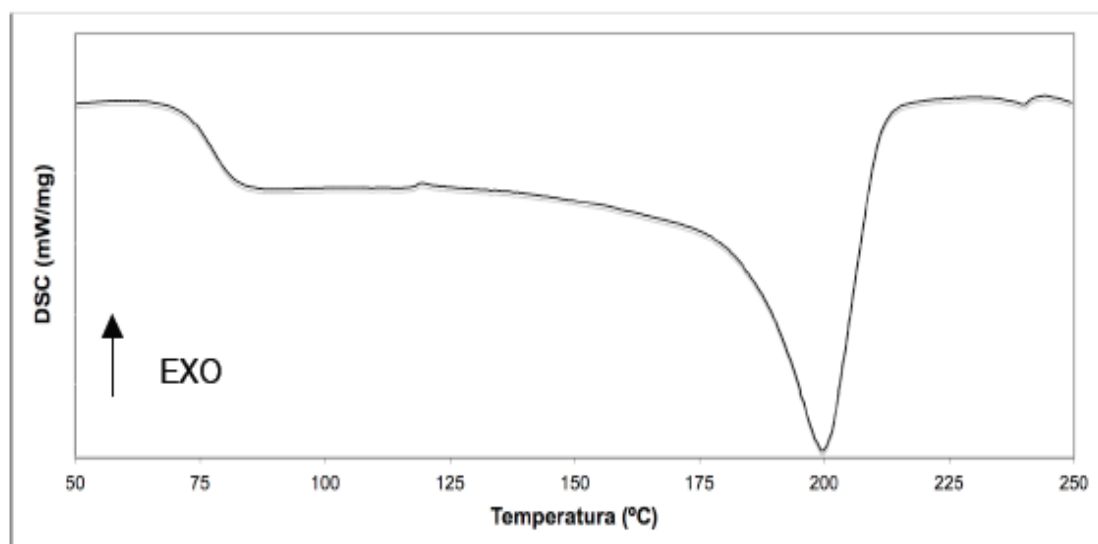


Figura 6.3 – Termograma de DSC do Filme de PVA

No presente trabalho registaram-se alterações significativas na temperatura de transição vítrea, ao passo que na temperatura de fusão, os valores são praticamente idênticos, tal como descrito na Tabela 6.1. A temperatura de transição vítrea de filmes puros de PVA é de 74,7°C e com apenas 2%(p/v) de nanofibrilas, este valor passa para 119°C, sendo este um incremento de 45°C. Para as amostras com nanofibrilas as diferenças no valor de transição vítrea são menores, e ocorrem num intervalo de 20°C. Atendendo a estes resultados, considera-se que as nanofibrilas possuem um efeito anti-plastificante no seio do PVA. Os motivos para tal podem estar relacionados com o estabelecimento de ligações por ponte de hidrogénio entre os grupos hidroxilo e acetilo da quitina e os grupos hidroxílicos do PVA, ficando as cadeias poliméricas adsorvidas e restringidas na superfície das nanofibrilas. A energia necessária para o rompimento destas ligações pode ser a justificação para o aumento da T_g (Smith et al., 2003).

Tabela 6.1 - Propriedades térmicas dos filmes de PVA/NFCH

Amostra	T _g (°C)	T _f (°C)
PVA + 0% NFCH	74	199
PVA + 2% NFCH	119	208
PVA + 4% NFCH	122	210
PVA + 6% NFCH	138	>250°C

Estes resultados estão em concordância com a literatura para outro tipo de interações, onde habitualmente se registam aumentos da temperatura de transição vítrea, nomeadamente para interações entre matrizes de amido com nanofibrilas de celulose, onde ocorre imobilização de cadeias amorfas de amido que resulta num efeito de anti-plastificação (Dufresne, 2008; Anglès, 2000; Angellier et al., 2006, Averous et al., 2001). A explicação dos resultados obtidos no presente trabalho pode ser semelhante, uma vez que a estrutura das nanofibrilas de celulose é muito semelhante à estrutura das nanofibrilas de quitina (Dufresne, 2008).

No que se refere às temperaturas de fusão, as diferenças registadas não são muito significativas, podendo-se deduzir que o motivo seja o facto de para esses valores de energia térmica fornecida, devido à elevada entropia, as cadeias se encontrarem “livres” e por esse motivo fora da influência das nanofibrilas, acabando por ter um comportamento típico de uma amostra pura. Este resultado, bem como a sua justificação, estão em concordância com praticamente toda a literatura (Dufresne, 2008). Verifica-se ainda que para a amostra de 6% o material degrada-se, não sendo possível detectar a temperatura de fusão do filme compósito.

O efeito anti-plastificante relativo ao processamento de polímeros não constitui uma desvantagem em termos da produção dos presentes filmes, uma vez que, o único método utilizado para a produção dos filmes foi por evaporação do solvente, um método produtivo considerado lento mas que permite a formação da já referida rede de interações quitina-quitina. Procurou-se desta forma aproveitar a vantagem que este processo apresenta em termos do melhoramento das propriedades mecânicas. Existem outros métodos, tais como prensagem a quente ou liofilização, em que o estabelecimento desta rede é dificultado, o que resulta num menor incremento de propriedades mecânicas, nomeadamente o módulo de Young e a tensão de fractura (Nair et al., 2003).

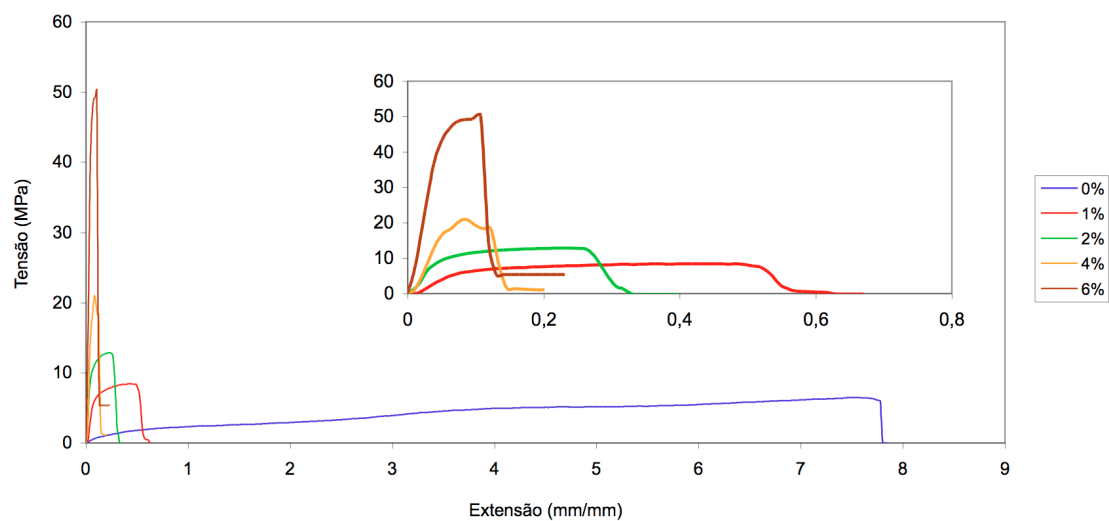


Figura 6.4 – Curvas de tracção típicas dos filmes compostos PVA/Nanofibrilas de Quitina

Na figura 6.4 apresentam-se as curvas de tracção típicas para as várias concentrações de nanofibrilas presentes na matriz polimérica. É possível verificar que o comportamento mecânico em termos de deformação plástica é totalmente alterado pela inclusão de nanofibrilas. Valores de extensão à ruptura de cerca de 800% baixam para 60% com a inclusão de apenas 1% de nanofibrilas.

Os filmes de PVA possuem claramente uma zona de deformação elástica e uma zona de deformação plástica. Nesta zona de deformação plástica ocorre a organização das suas cadeias ao longo do eixo de tracção, sendo a energia dissipada nesta organização e por isso não ocorre aumento da tensão necessária para traccionar a matriz. Com o aumento da concentração de nanofibrilas ocorre

também um aumento de cristalinidade registado por diversos autores, devido ao carácter rígido e cristalino das nanofibrilas de quitina (Anglés et al., 1999, Dufresne, 2008).

A inclusão de elementos cristalinos na matriz polimérica é responsável pela diminuição da capacidade de deformação das matrizes, uma vez que a presença de nanofibrilas de quitina dificulta o alinhamento das cadeias de PVA, devido à sua rigidez. A disrupção das ligações por pontes de hidrogénio entre cadeias de PVA e consequente formação de novas ligações, desta vez com as nanofibrilas de quitina, reduz a capacidade de organização e orientação das cadeias poliméricas presents

na matriz.

O módulo de Young (E) é um parâmetro mecânico que revela a resistência que um dado material possui à deformação em regime elástico. Este parâmetro estabelece a correlação entre a tensão necessária para deformar o material (σ) e a correspondente deformação (ϵ), em regime elástico (lei de Hooke):

$$\sigma = E \times \epsilon \quad \text{(Equação 6.5)}$$

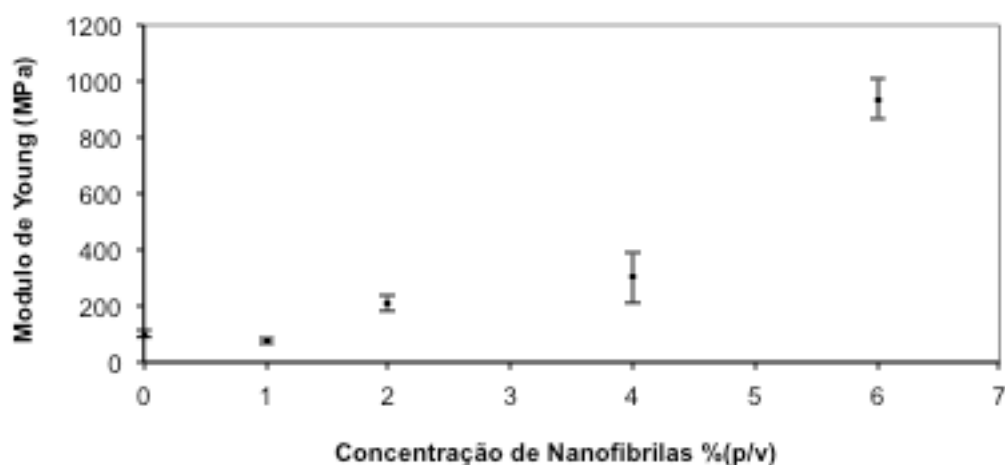


Figura 6.5 - Representação do módulo de Young em função da concentração de nanofibrilas de quitina

Analisando a figura 6.5, confirma-se que as nanofibrilas reforçam mecanicamente as matrizes de PVA. Acima da fracção volúmica de 4% ocorre um incremento drástico do módulo Young, que deverá estar associado a fenómenos de percolação, uma vez que o valor de teórico de 4,4% foi identificado como sendo o limiar crítico de percolação. Acima do valor de percolação, o estabelecimento de uma rede de nanofibrilas poderá ser responsável pelo aumento do módulo de Young. Na tabela 6.2, são apresentados os valores dos parâmetros mecânicos dos filmes compósitos em estudo.

Tabela 6.2 - Parâmetros mecânicos dos filmes compósitos PVA/Nanofibrilas de Quitina

Amostra	Tensão de Ruptura (MPa)	Deformação à Ruptura (%)
PVA	6.3 ± 0.2	746 ± 33.9
PVA + 1% NFCH	6.8 ± 1.5	65.6 ± 2.5
PVA + 2% NFCH	10.6 ± 2.6	43.1 ± 5,6
PVA + 4% NFCH	23.5 ± 2.3	15,9 ± 1.7
PVA + 6% NFCH	49.8 ± 4.5	10,3 ± 0.3

Tal como referido na introdução do presente capítulo, existem na literatura diversos modelos que permitem estimar o comportamento mecânico de compósitos poliméricos reforçados. De forma a verificar se de facto ocorre formação de uma rede de percolação no reforço com nanofibrilas de quitina, utilizou-se o modelo fenomenológico série-paralelo com um factor de correcção para o limiar de percolação, proposto por Ouali (Ouali et al.,1991). Os parâmetros usados no modelo são os apresentados na tabela 6.3.

Tabela 6.3 – Valores utilizados no modelo série-paralelo para estimar o módulo de Young

Parâmetro	Valor
E_S	100 MPa
E_R	2000MPa (Morin et al., 2002)
V_{RC}	0,044 (determinado para um factor de forma de 15,9, a partir da equação 6.1)

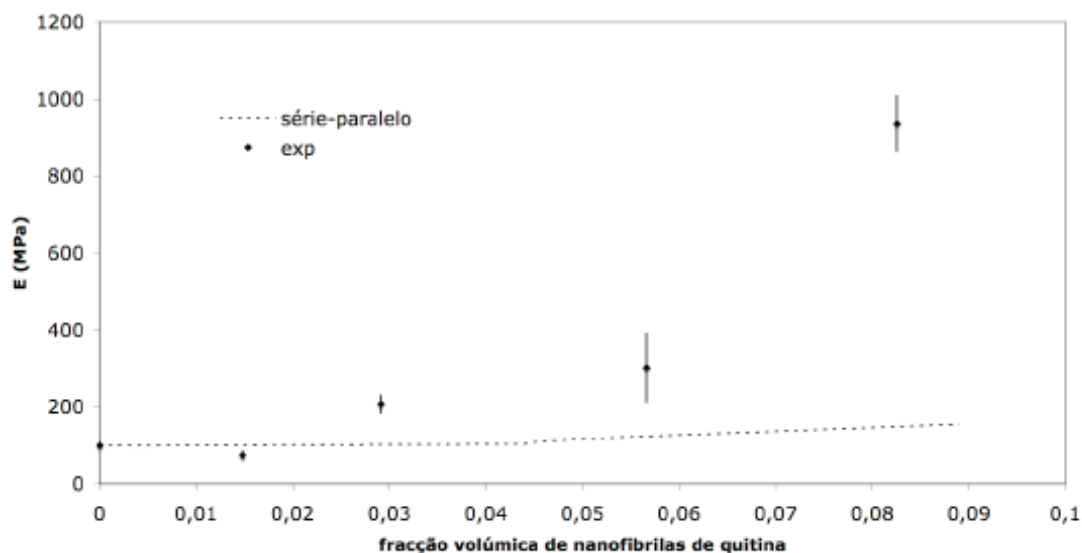


Figura 6.6 - Comparação entre os valores do módulo de Young obtidos experimentalmente e através do modelo fenomenológico série-paralelo

Como se pode observar na figura 6.6, este modelo não permite obter valores concordantes com os obtidos experimentalmente. É importante referir que este modelo é amplamente utilizado para a modelação de dados experimentais de compósitos reforçados com nanofibrilas de celulose. Em consequência, uma das explicações para o insucesso no ajuste deste modelo, poderá ser a base da formação da rede de percolação. Esta rede é formada devido à formação de ligações por pontes de hidrogénio entre as nanofibrilas de celulose. Para as nanofibrilas de quitina, possivelmente estas ligações são dificultadas pela presença de grupos acetilo e grupos amina, na superfície, resultando em menores interações entre os microcristais de quitina.

A ineficácia do modelo em ajustar os resultados experimentais pode, igualmente, estar relacionada com o facto de a ocorrência de uma rede de percolação ser tanto mais provável quanto maior for a diferença entre os módulos de Young da matriz e das nanofibrilas de quitosano. Morin e colaboradores verificaram que este modelo se mostrou incapaz em prever o módulo de Young de compósitos PCL/nanofibrilas de quitina, exactamente por a diferença entre os módulos de Young da matriz e das fibras não ser significativa (Morin et al., 2002). De facto, quando os módulos de Young das duas fases são próximos (diferença de uma ordem de grandeza ou inferior), a influência da fase rígida percolante é negligenciável para concentrações de reforço baixas, tais como as usadas no presente trabalho. Neste caso, as propriedades mecânicas não sofrem uma variação abrupta, tal como previsto no

modelo de percolação, e dependerão da homogeneidade do compósito (Morin et al., 2002). Desta forma, usou-se o modelo de Halpin-Tsai com o objectivo de prever as propriedades mecânicas dos compósitos PVA/nanofibrilas de quitina. Os valores dos parâmetros do modelo, usados na modelação, encontram-se listados na tabela 6.4. Conforme se pode observar, através das figuras 6.6 e 6.7., a partir das equações de Halpin-Tsai (modificadas por Nielsen) obtêm-se valores para o módulo dos filmes compósitos muito próximos dos valores médios obtidos experimentalmente. Este facto sugere que o empacotamento das nanofibrilas de quitina desempenha um papel mais importante relativamente ao reforço da matriz polimérica. Aliás, a boa correlação entre os valores experimentais do módulo de Young e os obtidos pelo modelo parece sugerir a inexistência de qualquer fenómeno de percolação nestes compósitos. O baixo valor da fracção máxima de nanofibrilas (Φ_m , tabela 6.4) é previsto por Nielsen e colaboradores (Nielsen et al., 1994), para compósitos de fibras curtas dispostas aleatoriamente no espaço, tais como os aqui estudados.

Tabela 6.4 – Valores dos parâmetros utilizados no modelo Halpin-Tsai (tal como modificado por Nielsen) para estimar o módulo de Young

Parâmetro	Valor
E_S	100 MPa
E_R	2000 MPa (Morin et al., 2002)
ξ	31.8 (determinado para um factor de forma de 15,9, a partir da equação 6.6)
Φ_m	0,17

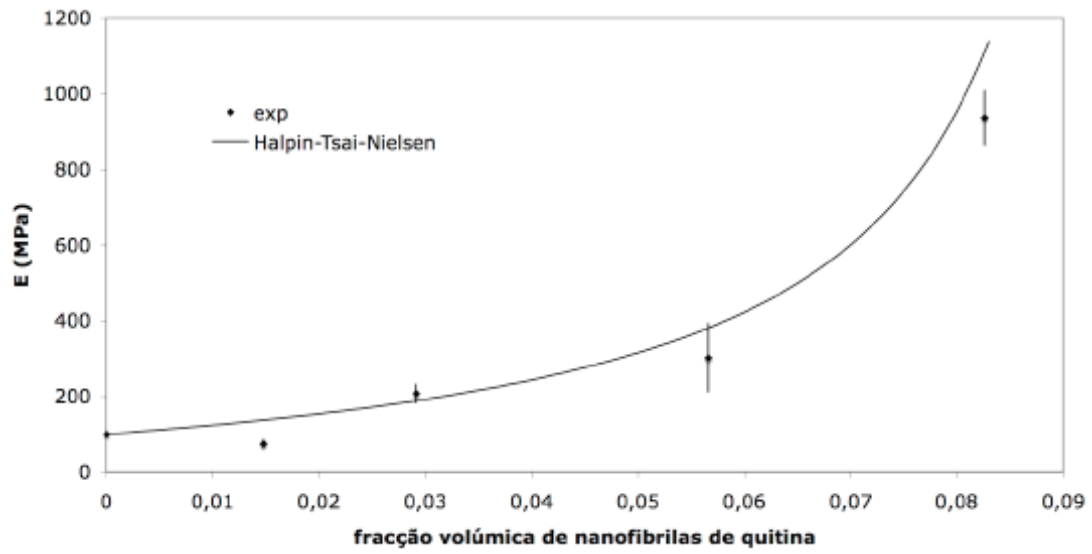


Figura 6.7 - Comparação entre os valores do módulo de Young obtidos experimentalmente e através do modelo Halpin-Tsai-Nielsen

6.4 Conclusão

No presente capítulo fez-se o estudo das propriedades térmicas e mecânicas de filmes de PVA reforçado por nanofibrilas de quitina (filmes compósitos). Na caracterização térmica verificou-se um incremento da temperatura de transição vítrea na ordem de 45°C, logo para concentrações de 2%(p/v) em nanofibrilas, ao passo que a temperatura de fusão não sofreu alterações. Verificou-se que inclusão das nanofibrilas em filmes de PVA possuem um efeito anti-plastificante, ocorrendo um aumento significativo da T_g , do módulo de Young e da resistência à tração. Verificou-se ainda que a capacidade de deformação das matrizes de PVA foi substancialmente reduzida pela introdução das nanofibrilas. A utilização de partículas nanométricas faz supor a possível formação de uma rede de nanofibrilas percolante que seja responsável pelas propriedades mecânicas dos filmes compósitos. Na tentativa de confirmar esta possibilidade, procurou-se estimar os valores do módulo de Young com um modelo que prevê a formação da referida rede de percolação. Verificou-se que os valores teóricos não são concordantes com os experimentais, sugerindo que a rede de percolação não é a principal responsável pelo reforço das matrizes. Através do ajuste de equações de Halpin-Tsai, modificadas por Nielsen, verificou-se que é o empacotamento das nanofibrilas o principal responsável pelas propriedades mecânicas dos compósitos.

6.5 Referências

Angellier, H.; Molina-Boisseau, S.; Dole, P.; Dufresne, A.; (2006) Thermoplastic starch–waxy maize starch nanocrystals nanocomposites, *Macromolecules* **7**, 531–539.

Anglès, M.N.; Salvadó, J.; Dufresne, A.; (1999), Steam-exploded residual softwoodfilled polypropylene composites, *Journal of Applied Polymer Science* **74**, 1962–1977.

Anglès, M.N.; Dufresne, A.; (2000), Plasticized starch/tunicin whiskers nanocomposites. 1. Structural analysis, *Macromolecules* **33**, 8344–8353.

Anglès, M.N.; Dufresne, A.; (2001), Plasticized starch/tunicin whiskers nanocomposites. 2. Mechanical behavior, *Macromolecules* **34**, 2921–2931.

Beppu, M. M.; Vieira, R. S.; Aimoli, C. G.; Santana, C. C. (2007), Crosslinking of chitosan membranes using glutaraldehyde: Effect on ion permeability and water absorption *J. Membr. Sci.*, 301, 126–130.

Dufresne, A.; Cavaille, J. Y.; Dupeyre, D.; Garcia-Ramirez, M.; Romero, J. (1999) Morphology, phase continuity and mechanical behavior of polyamide 6/chitosan blends. *Polymer*, 40, 7, 1657.

Dufresne, A.; Vignon, M.R.; (1998), Improvement of starch film performances using cellulose microfibrils, *Macromolecules*, **31**, 2693–2696.

Dufresne, A.; Vincendon, M.; (2000) Poly(3-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxyoctanoate) blends: morphology and mechanical behavior *Macromolecules*, 33, 3008.

- Dufresne, A.; (2008) Polysaccharide nanocrystal reinforced Nanocomposites, Canadian Journal of Chemistry, 86, 484–494.
- Duan, B.; Yuan, X.; Zhu, Y.; Zhang, Y.; Li, X.; Zhang, Y.; Yao, K. (2006) A nanofibrous composite membrane of PLGA-chitosan/PVA prepared by electrospinning. European Polymer Journal, 42 (9) 2013–2022.
- Favier, V.; Canova, G. R.; Shrivastava, S. C; Cavaille J. Y.; Mechanical Percolation In Cellulose Whisker Nanocomposites Polymer Engineering And Science, October 1997a, Vol. 37, No. 10
- Favier, V.; Dendievel, R.; Canova, G.; Cavaille, J. Y.; Gilormini, (1997b) P. Simulation and modelling of 3D percolating structures: case of latex matrix reinforced by a network of cellulose fibers. Acta Mater., 45 (4) 1557-1565
- Flandin, L.; Bidan, G.; Brechet, Y.; Cavaille, J. Y. (2000) New nanocomposite materials made of an insulating matrix and conducting fillers: processing and properties. Polym. Compos., 21 (2) 165-174.
- Garcia-Ramirez, M.G.; Cavaille, J. Y.; Dufresne, A.; Tekely, P.; (1995) Cellulosepolyamide- 66 blends 2. Mechanical Behaviour, Journal of Polymer Science, Part B: Polymer Physics, 33, 2109- 2117
- Garcia-Ramirez, M.; Cavaille, J. Y.; Dufresne, A.; Dupeyre, D.; (1996) Cellulosecopolyamide 6,6/9 blends, Journal of Applied Polymer Science, 59
- Goodrich, J.D.; Winter, W.T.; (2008), Alpha-Chitin Nanocrystals Prepared from Shrimp Shells and Their Specific Surface Area Measurement, Biomacromolecules 2007, 8, 252-257.
- Hammersley, J. M. Proc. Cambridge Philos. Soc. 1957, 53, 642.
- Halpin, J. C.; Kardos, J. L.; (1976) Polym. Eng. Sci., 16(5), 344
- Hermans, J. J.; (1967) Proc. Koninklijke Nederlandse Akademie van

Wetenschappen, Ser. B 70, 1.

Hill, R. (1963) *J. Mech. Phys. Solids*, 11, 357

W. Helbert, J. Y. Cavaille, A. Dufresne; (1996) Thermoplastic Nanocomposites Filled With Wheat Straw Cellulose Whiskers. Part I: Processing and Mechanical Behavior, *Polymer Composites*, 17 (4)

Park, J.S.; Park, J.W.; Ruckenstein, E.; (2001) Thermal and dynamic mechanical analysis of PVA/MC blend hydrogels, *Polymer*, 42, 4271-4280.

Kristo E.; Biliaderis, C.G.; (2006) Water sorption and thermo-mechanical properties of water/sorbitol-plasticized composite biopolymer films: caseinate– pullulan bilayers and blends, *Food Hydrocolloids*, 20, 1057–1071.

Lu, Y.; Weng, L.; Zhang, L; (2004) Morphology and properties of soy protein isolatethermoplastics reinforced with chitin whiskers. *Biomacromolecules*, 5, 1046-1051.

Mangala, E.; Suresh Kumar, T.; Baskar, S.; Panduranga, K.; (2003) Development of Chitosan/ Poly(vinyl alcohol) Blend Membranes as burn dressings, *Trends in Biomaterials Artificial Organs*, 17,1, 34-40.

Mathew, A.P.; Dufresne, A.; (2002) Morphological investigation of nanocomposites from sorbitol plasticized starch and tunicin whiskers, *Biomacromolecules* 3 , 609–617.

Martien, FL; (1986) *Encyclopedia of polymer science and engineering*, Vol. 17. NewYork: Wiley, 1986. p. 167.

Morin, A.; Dufresne A.; (2002) Nanocomposites of chitin whiskers from *Riftia* tubes and poly(caprolactone). *Macromolecules*, 35, 2190-2199

Musale, D.A.; Kumar, A.; (2000) Solvent and pH resistance of surface crosslinked chitosan/poly(acrylonitrile) composite nanofiltration membranes, *Journal of Applied Polymer Science*, 77, 1782–1793.

- Nge, T.T.; Hori, N.; Takemura, A.; Ono, H.; (2003) Phase Behavior of liquid crystalline chitin/acrylic acid liquid mixture. *Langmuir*, 19, 1390-1395.
- Nge, T.T.; Hori, N.; Takemura, A.; Ono, H.; Kimura, T.; (2003) Synthesis and FTIR spectroscopic studies on shear induced oriented liquid crystalline chitin/poly(acrylic acid) composite. *Journal of Applied Polymer Science* 90, 1932-1940.
- Nge, T.T.; Hori, N.; Takemura, A.; Ono, H.; Kimura, T.; (2003) Synthesis and orientation study of a magnetically aligned liquid-crystalline chitin/poly(acrylic acid) composite. *Journal of Polymer Science, B: Polymer Physics*, 41, 711-714.
- Nair, K.G.; Dufresne, A.; (2003a) Crab shell chitin whisker reinforced natural rubber nanocomposites. Processing and swelling behavior. *Biomacromolecules*, 4, 657-665.
- Nair, K.G.; Dufresne, A.; (2003b) Crab shell chitin whiskers reinforced natural rubber nanocomposites. Mechanical behavior. *Biomacromolecules*, 4, 666-674.
- Nair, K.G.; Dufresne, A.; (2003c) Crab shell chitin whiskers reinforced natural rubber nanocomposites. Effect of chemical modification of chitin whiskers. *Biomacromolecules*, 4, 1835-1842.
- Nielsen, L. E.; (1970) *J. Appl. Phys.*, 41(11), 4626.
- Nielsen, L. E.; Landel, R. F.; (1994). *Mechanical Properties of Polymers and Composites*, Marcel Dekker, Nova Iorque, 2^a Ed.
- Nishio, Y.; Suzuki, H.; Sato, K.; (1994) Molecular orientation and optical anisotropy induced by the stretching of poly(vinyl alcohol)/poly(N-vinyl pyrrolidone) blends, *Polymer*, 35, 7.
- Ouali, N.; Cavaille, J. Y.; Perez, (1991) *J. Plast. Rubber Comput. Process. Appl.*, 16, 55.

- Robin, J.P.; Mercier, C.; Charbonnière, R.; Guilbot, A.; (1974) Lintnerized starches. Gel filtration and enzymatic studies of insoluble residue from prolonged acid treatment of potato starch, *Cereal Chemistry* 51, 389–406.
- Smith, J.S.; Bedrov, D.; Smith, G.D.; (2003) A molecular dynamics simulation study of nanoparticle interactions in a model polymer–nanoparticle composite, *Composite Science and Technology* 63,1599–1605.
- Sriupayo, J.; Supaphol, P.; Blackwell J.; Rujiravanit, R.; (2005) Preparation and characterization of β -chitin whisker-reinforced chitosan nanocomposite films with or without heat treatment, *Carbohydrate Polymers* 62, 130–136.
- Shen, J.; Wu, L.; Qui, J.; Gao, C.; (2007) Pervaporation separation of water/isopropanol mixtures through crosslinked carboxymethyl chitosan/polysulfone hollow-fiber composite membranes *Journal of Applied Polymer Science*, 103, 1959–1965.
- Sedlarik, V.; Saha, N.; Kuritka, I.; Saha P.; (2006) Characterization of Polymeric Biocomposite Based on Poly(vinyl alcohol) and Poly(vinyl pyrrolidone) *Polymer Composites* 27,147–152.

Capítulo VII

Perspectivas Futuras

7. Perspectivas Futuras

O presente trabalho teve como objectivo aproveitar resíduos alimentares e com eles desenvolver materiais que podem ser aplicados tanto em dispositivos médicos como noutra tipo de aplicações em Engenharia (p.ex., na produção de compósitos).

Considera-se que isto traduz uma mais valia tanto do ponto de vista ecológico como do ponto de vista económico, uma vez que a casca de camarão é uma material prima classificada como desperdício. Como o presente trabalho é um relato das diversas etapas dos objectivos propostos, importa rever em que medida cada etapa pode ser aprofundada no futuro.

No capítulo I e II, foi abordado o processo de extracção de quitina e produção de quitosano. Verificou-se que este processo produz desperdícios que podem ser comercializáveis, em especial o caso do pigmento e do CaCl_2 . Desta forma seria interessante procurar vias para o aproveitamento destes produtos. Outra possibilidade de estudo futuro passa pelo “scale-up” do processo de descoloração através de UV, procurando a melhor forma de incidir, de uma forma homogénea, esta radiação nas partículas de casca de camarão ou de quitina.

No capítulo III, estudou-se a formação de soluções e géis líquidos cristalinos de quitosano. No seguimento deste trabalho, foram já realizados estudos da combinação destas soluções com nanofibrilas de quitina. Parece-nos que seria pertinente realizar modificações estruturais na cadeia polimérica de quitosano, e prosseguir o estudo reológico dessas novas macromoléculas, procurando compreender em que medida cada uma dessas modificações e o grau de modificação afectam as transições sol-gel, bem como as transições isótropoanisótropo.

Aponta-se como objectivo de estudo futuro soluções de hidroxipropilo quitosano, de carboximetilo quitosano, e do copolímero PEG-quitosano.

A aplicação destas soluções em cimentos ósseos, trabalho descrito no capítulo IV, pode ser considerada a continuação do estudo efectuado no capítulo III. O trabalho

realizado com os cimentos ósseos produzidos deve prosseguir para testes in vivo, de forma a que a sua biocompatibilidade e bioactividade possam ser melhor avaliadas. O aumento das propriedades mecânicas deste produto deve também ser alvo de estudo futuro, apontando-se como possível alternativa a combinação de nanofibrilas de quitina com fosfatos de cálcio nanométricos, produzidos pelo processo sol-gel. A potencialidade de formar estruturas líquidas cristalinas com as nanofibrilas de quitina, deve ser combinada com um fosfato de cálcio de forma a servir como “template” para mimetizar a estrutura do osso humano.

No capítulo V, a produção à escala laboratorial de nanofibrilas de quitina foi objecto de estudo, apontando-se como trabalho futuro a optimização dos rendimentos obtidos bem como do “scale-up” deste processo. Por outro lado, considera-se interessante realizar modificações estruturais na quitina presente nas nanofibrilas, trabalho que deverá ser realizado por reacções em meio heterogéneo, a fim de não perder a estrutura nanométrica das nanofibrilas.

Da combinação das nanofibrilas de quitina com outros polímeros, surge o capítulo VI, onde se estuda o reforço de filmes de PVA. Em termos de perspectivas futuras, apresenta-se a possibilidade de prosseguir o estudo do reforço de outros polímeros presentes em aplicações médicas, tal como do próprio quitosano para aplicação em pele. Um estudo interessante poderá ser a incorporação de nanofibrilas de quitina em parafusos biocompatíveis de poli(ácido láctico), e procurar desta forma melhorar as propriedades mecânicas destes mesmos parafusos. Outro estudo poderá ser a incorporação de nanofibrilas em géis de alginato de sódio de forma a obter um compósito para regeneração de cartilagem.

Considera-se que após o estudo da produção de três matérias primas, como a quitina, o quitosano e as nanofibrilas de quitina, se abrem portas para múltiplas opções em termos de investigação futura.