

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS  
DEPARTAMENTO DE FÍSICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FÍSICA**

**ESTUDO ESTRUTURAL E MORFOLÓGICO DE MEMBRANAS DE QUITOSANA E  
DE N,O-CARBOXIMETILQUITOSANA**

Manaus – AM

2015

## Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

S676e Soares, Geicilene Katrine de Paiva  
Estudo estrutural e morfológico de membranas de quitosana e de N,O-carboximetilquitosana / Geicilene Katrine de Paiva Soares.  
2015  
97 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Edgar Aparecido Sanches  
Dissertação (Mestrado em Física) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Quitosana. 2. N,O-carboximetilquitosana. 3. RMN. 4. DRX. 5. Ajuste Le Bail. I. Sanches, Edgar Aparecido II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

**GEICILENE KATRINE DE PAIVA SOARES**

**ESTUDO ESTRUTURAL E MORFOLÓGICO DE MEMBRANAS DE QUITOSANA E  
DE N,O-CARBOXIMETILQUITOSANA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Física do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal do Amazonas, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Física.

Orientador: Prof. Dr. Edgar Aparecido Sanches

Área de concentração: Física Experimental

Manaus-AM

2015

# DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Gerinaldo e Dilcelene Soares, pelo amor, incentivo e apoio em todas as minhas escolhas.

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Edgar Aparecido Sanches, por inspirar coragem e determinação aos seus alunos, pela paciência, amizade, observações, incentivo e apoio durante esses anos.

À Prof. Dra. Yvonne Primerano Mascarenhas pelo grande suporte dado em São Carlos, além da relevante contribuição no desenvolvimento deste projeto.

Ao Prof. Dr. Sérgio Paulo Campana-Filho por permitir dar continuidade ao projeto desenvolvido no IQSC-USP, juntamente com o Ms. Anderson Fiamingo pelas longas discussões por e-mail e pela paciência mediante às inúmeras perguntas elaboradas.

Aos meus pais, Gerinaldo e Dilcelene Soares, pelo carinho, amor e incentivo de sempre, além do grande orgulho que tenho por vocês terem vencido tantas batalhas para permitirem a minha formação.

A duas pessoas que desde sempre mostram seu apoio, cuidado e amor por mim: Lilian Rodrigues e José Luiz. Totalmente válido e recíproco o amor que sinto por vocês.

À Bruna, Dri e Louise, por tornarem essa nova jornada menos monótona e cansativa.

Aos técnicos do IQSC-USP, IFSC-USP e LIEC-UFSCar pelas ajudas e ensinamentos durante as medidas realizadas nos laboratórios.

À Coordenação do PPGFIS-UFAM, em especial à Prof. Angula Ghosh, por apoiar e mediar viagens às outras Instituições.

À CAPES, pela bolsa concedida.

## RESUMO

SOARES, G. K. P. (2015). **Estudo Estrutural e Morfológico de Membranas de Quitosana e de N,O-Carboximetilquitosana**. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Física, Departamento de Física, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2015.

Neste trabalho dois conjuntos de amostras foram estudados segundo o ponto de vista morfológico e estrutural. O primeiro conjunto representa as amostras em pó: Quitosana (Q) adquirida da Yue Planting – China; N,O-carboximetilquitosana sódica (NaCMQD) adquirida da Dayang Chemicals – China e da Heppe Medical – Alemanha. O segundo conjunto representa as amostras na forma de membranas, sintetizadas em laboratório, a partir das amostras em pó mencionadas anteriormente: Membrana de Quitosana (M-Q), Membrana de N,O-carboximetilquitosana sintetizada a partir da Quitosana obtida da Dayang Chemicals (M-CMQD) e N,O-carboximetilquitosana sintetizada a partir da Quitosana obtida da Heppe Medical (M-CMQH). Através das medidas de Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13 (RMN  $^{13}\text{C}$ ) foi possível determinar o grau médio de acetilação  $\overline{GA}$  e substituição  $\overline{GS}$  para as amostras NaCMQD e NaCMQH, bem como propor uma estrutura molecular para cada amostra. Os difratogramas das amostras na forma de pó (Q, NaCMQD e NaCMQH) e membrana (M-Q, M-CMQD e M-CMQH) foram obtidos através da difração de raios X (DRX), e mostrou que a amostra Q apresentou uma quantidade maior de picos, localizados em  $2\theta = 10,4; 19,8; 22,2; 29,6; 35,3$  e  $40,9^\circ$ , em relação à sua respectiva membrana M-Q com picos localizados em  $2\theta = 10,4^\circ$  e  $15,1^\circ$ ; entre  $2\theta = 19,8^\circ$  e  $35,3^\circ$ ; e entre  $2\theta = 38,6^\circ$  e  $44,5^\circ$ . O mesmo aconteceu para a amostra NaCMQD (entre  $2\theta = 8,9^\circ$  e  $13,2^\circ$ ;  $2\theta = 20,1^\circ$  e entre  $2\theta = 33,2^\circ$  e  $42,2^\circ$ ) e sua respectiva membrana M-CMQD com picos localizados entre  $2\theta = 10,3^\circ$  e  $13,7^\circ$ ;  $2\theta = 19,8^\circ$  e  $25,7^\circ$ ;  $2\theta = 37,8^\circ$  e  $45,1^\circ$ . Já as amostras NaCMQH e M-CMQH apresentaram perfis de DRX semelhantes (entre  $2\theta = 8,9^\circ$  e  $13,3^\circ$ ;  $2\theta = 17,6^\circ$  e  $26,4^\circ$ ;  $2\theta = 35,0^\circ$  e  $43,1^\circ$ ). O percentual de cristalinidade foi estimado utilizando-se os perfis de DRX, através do programa *Peak Fitting Module*. Para as amostras na forma de pó, Q, NaCMQD e NaCMQH, os percentuais de cristalinidade foram encontrados em torno de 45, 40 e 30%, respectivamente. Para as amostras na forma de membrana, M-Q, M-CMQD e M-CMQH, a cristalinidade ficou em torno de 35, 30 e 30%, respectivamente. A quitosana em pó e membrana (Q e M-Q) apresentaram maior percentual cristalinidade possivelmente devido ao menor tamanho de seus grupos laterais, facilitando o empacotamento regular de suas cadeias, já que as carboximetilquitosanas apresentaram grupos laterais extensos, como constatado por RMN  $^{13}\text{C}$ , o que dificulta o empacotamento das cadeias, diminuindo seus domínios cristalinos. O ajuste Le Bail foi realizado através do programa *FullProf* para refinar os parâmetros de cela inicialmente encontrados em literatura, com sistema cristalino ortorrômbico. Os parâmetros de cela refinados para as amostras Q e M-Q apresentaram  $a = 9 \text{ \AA}$ ,  $b = 16 \text{ \AA}$  e  $c = 10 \text{ \AA}$ , aproximadamente; para as amostras NaCMQD, M-CMQD, NaCMQH e M-CMQH, os valores dos parâmetros refinados foram  $a = 13 \text{ \AA}$ ,  $b = 19 \text{ \AA}$  e  $c = 10 \text{ \AA}$ , aproximadamente. O tamanho médio de seus cristaltos e suas respectivas anisotropias para as amostras Q, M-Q, NaCMQD, M-CMQD, NaCMQH e M-CMQH foram de 29 (4)  $\text{\AA}$ , 16 (4)  $\text{\AA}$ , 32 (7)  $\text{\AA}$ , 23 (2)  $\text{\AA}$ , 20 (1)  $\text{\AA}$  e 24 (1)

Å, respectivamente. O aumento dos parâmetros de cela  $a$  e  $b$  nas carboximetilquitosanas ocorreu devido à inserção de grupos laterais provenientes da carboximetilação da Quitosana, resultando em dificuldade de empacotamento das cadeias e, conseqüentemente, na cristalinidade e nas dimensões anisotrópicas dos cristalitos. As morfologias dos pós e membranas foram avaliadas através da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). As amostras em forma de pó (Q, NaCMQD e NaCMQH) apresentaram uma variedade de tamanhos de seus grãos, os quais não apresentaram uniformidade. As membranas (M-Q, M-CMQD e M-CMQH) foram classificadas de acordo o tamanho dos seus poros e espessura de suas fibras através do programa *ImageJ*. Todas as membranas apresentaram poros maiores que 50 nm (macroporos) e as espessuras de suas fibras foram encontradas com maior frequência em torno de 0,15  $\mu\text{m}$  (M-Q), entre 5 e 10  $\mu\text{m}$  (M-CMQD) e em torno de 5  $\mu\text{m}$  (M-CMQH). A estabilidade térmica das amostras foi avaliada através da Análise Termogravimétrica (TGA/DTG). A forma física das amostras, bem como o seu grau de cristalinidade, influenciou os principais eventos térmicos. Entre as amostras em pó, a quitosana apresentou maior estabilidade térmica com temperatura inicial de degradação de 283 °C. Entre as membranas, as amostras M-Q e M-CMQH apresentaram valores similares de temperatura inicial de degradação em torno de 233 °C. Dessa forma, este trabalho apresentou uma avaliação sistemática de Quitosana e N,O-Carboximetilquitosana, bem como de suas respectivas membranas, evidenciando características intrínsecas das amostras segundo o ponto de vista estrutural e morfológico, esperando-se contribuir de maneira significativa com a comunidade científica com os dados aqui apresentados.

**Palavras-chave:** Quitosana. N,O-Carboximetilquitosana. RMN. DRX. Ajuste Le Bail.

## ABSTRACT

SOARES, G. K. P. (2015). **Structural and Morphological Studies of Chitosan and N,O-Carboxymethylchitosan Membranes**. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Física, Departamento de Física, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2015..

In this work two sets of samples were evaluated according to their morphological and structural point of view. The first set is the powder samples: Chitosan (Q) purchased from Yue Planting – China; N,O-carboxymethyl sodium (NaCMQD) purchased on Dayang Chemicals – China and Heppe Medical – Germany. The second set of samples is in the form of membranes, which were synthesized in the laboratory from powder samples mentioned above: Chitosan Membrane (M-Q); Membrane of N,O-carboxymethyl Chitosan synthesized from the Carboxymethyl Chitosan obtained at the Dayang Chemicals (M-CMQD) and N, O-carboxymethyl chitosan synthesized from the Carboxymethyl Chitosan obtained at the Heppe Medical (M-CMQH). Using NMR  $^{13}\text{C}$  the average degree of acetylation  $\overline{DA}$  and substitution  $\overline{DS}$  was determined for NaCMQD and NaCMQH samples, and as a tool to propose a molecular structure for each sample. The XRD patterns of powder samples (Q, NaCMQD and NaCMQH) and membranes (M-Q, M-CMQD and M-CMQH) showed for sample Q peaks located at ( $2\theta = 10.4, 19.8, 22.2, 29.6, 35.3$  and  $40.9^\circ$ ), and the peaks related to their respective membrane (M-Q) was located at  $2\theta = 10.4^\circ$  and  $15.1^\circ$ , between  $2\theta = 19.8^\circ$  and  $35.3^\circ$ , and between  $2\theta = 38.6^\circ$  and  $44.5^\circ$ . The same was observed for NaCMQD sample (between  $2\theta = 8.9^\circ$  and  $13.2^\circ$ ,  $2\theta = 20.1^\circ$  and between  $2\theta = 33.2^\circ$  and  $42.2^\circ$ ) and its respective membrane M-CMQD, with peaks located between  $2\theta = 10.3^\circ$  and  $13.7^\circ$ ,  $2\theta = 19.8^\circ$  and  $25.7^\circ$ ,  $2\theta = 37.8^\circ$  and  $45.1^\circ$ . The samples NaCMQH and M-CMQH showed similar XRD profiles (between  $2\theta = 8.9^\circ$  and  $13.3^\circ$ ,  $2\theta = 17.6^\circ$  and  $26.4^\circ$ ,  $2\theta = 35.0^\circ$  and  $43.1^\circ$ ). The percentage of crystallinity was estimated using the XRD profiles through *Peak Fitting Module* Program. For samples in the powder form the crystallinity percentages were found around 45, 40 and 30%, respectively. For samples in the form of membrane the crystallinity was about 35, 30 and 30, respectively. Chitosan powder and membrane (Q and M-Q) had higher percent of crystallinity due to the smaller size of its side groups, facilitating regular packing of their chains, since the carboxymethylchitosan showed extensive side groups, as evidenced by NMR $^{13}\text{C}$ , which hinders the packing of chains, decreasing its crystalline domains. The Le Bail method was performed using the *FullProf* program to refine the cell parameters initially found in literature, with orthorhombic space group. The refined cell parameters for Q and M-Q samples showed  $a = 9 \text{ \AA}$ ,  $b = 16 \text{ \AA}$  and  $c = 10 \text{ \AA}$ , approximately; for NaCMQD, NaCMQH, M-CMQD and M-CMQH, ten values of refined parameters were  $a = 13 \text{ \AA}$ ,  $b = 19 \text{ \AA}$  and  $c = 10 \text{ \AA}$ , approximately. The average size of its crystallites/anisotropy of the samples Q, M-Q, NaCMQD, M-CMQD, NaCMQH and M-CMQH were 29 (4)  $\text{\AA}$ , 16 (4)  $\text{\AA}$ , 32 (7)  $\text{\AA}$ , 23 (2)  $\text{\AA}$ , 20 (1)  $\text{\AA}$  and 24 (1)  $\text{\AA}$ , respectively. The increase of cell parameters a and b in the Carboxymethyl Chitosans occurred due to the insertion of side groups from carboxymethylation of chitosan, resulting in difficulty in packaging of the chains and therefore the crystallinity and the anisotropic dimensions of the crystallites. The morphologies of powders and membranes were evaluated by Scanning

Electron Microscopy (SEM). Samples in powder form (Q, NaCMQD and NaCMQH) presented a variety of sizes of its grains, which showed no uniformity. Membranes (M-Q, M-CMQD e M-CMQH) were classified according to their pore size and thickness of the fibers through the *ImageJ* software. All membranes had pores greater than 50 nm (macropores) and the thickness of fibers were found most frequently around 0.15  $\mu\text{m}$  (M-Q) between 5 and 10  $\mu\text{m}$  (M-CMQD) and about 5  $\mu\text{m}$  (M-CMQH). The thermal stability of the samples was assessed by Thermogravimetric Analysis (TGA/DTG). The physical form of the samples as well as their degree of crystallinity have influenced the main thermal events. Among the powder samples, chitosan showed greater thermal stability with a initial temperature of degradation around 283 °C. Among the membranes, the M-Q and M-CMQH samples showed similar initial degradation temperature of around 233 °C. Thus, this work presents a systematic evaluation of Chitosan and N,O-carboxymethyl chitosan, as well as their respective membranes, showing intrinsic characteristics of these samples according to their structural and morphological point of view.

**Keywords:** Chitosan. N,O-Carboxymethylchitosan. NMR. XRD. Le Bail Method.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

2.1	Estrutura primária da quitina constituída por unidades de GlcNAc, onde $n$ é o grau de polimerização. . . . .	17
2.2	Hierarquia dos principais níveis estruturais e elementos microestruturais referentes à cutícula da lagosta americana ( <i>H. americanus</i> ). . . . .	18
2.3	Estrutura primária da quitosana constituída por unidades de GlcN, onde $n$ é o grau de polimerização. . . . .	19
2.4	Estrutura primária da N,O-carboximetilquitosana, onde $n$ é o grau de polimerização. . . . .	20
2.5	Amostras de carboximetilquitosana em soluções aquosas com vários pH e temperaturas de preparação. . . . .	21
2.6	Ilustração de um corte transversal em um sólido poroso com diferentes cavidades, canais e interstícios. . . . .	23
2.7	Representação da estrutura do pericárdio e suas respectivas camadas. . . . .	24
4.1	Procedimentos realizados para a purificação da amostra de quitosana (Q). . . . .	28
4.2	Procedimentos realizados para a purificação da amostra de carboximetilquitosana sódica (NaCMQD e NaCMQH). . . . .	29
4.3	Estrutura primária da N,O-carboximetilquitosana sódica, onde $n$ é o grau de polimerização. . . . .	30
4.4	Procedimentos realizados para a síntese da membrana de quitosana (M-Q). . . . .	30
4.5	Procedimentos da síntese das membranas de carboximetilquitosana (M-CMQD e M-CMQH). . . . .	31
4.6	Resultado da purificação e sintetização das membranas mostradas em (a) Q e M-Q; (b) NaCMQD e M-CMQD; (c) NaCMQH e M-CMQH. . . . .	32
4.7	Representação das reflexões de Bragg em planos dispostos paralelamente. . . . .	34
4.8	Reflexões de difratômetro de raios X com geometria Bragg-Brentano. . . . .	36
4.9	Difração de raios X da quitina contida nas amostras de krill antártico ( <i>E. superba</i> ), caranguejo ( <i>C. opilio</i> ) e camarão ( <i>M. affinis</i> ) e seus respectivos índices de Miller. . . . .	37
4.10	Modelo de microestrutura de polímeros semicristalinos: (A) Cada cadeia pode percorrer várias regiões cristalinas e não cristalinas; (B) Modelo de um cristal de lamela (fortemente) dobrada e (C) Modelo de micela franjada. . . . .	38
4.11	Modelo de micela franjada exibindo regiões ordenadas e não ordenadas. . . . .	39
4.12	Estimativa do percentual cristalinidade de uma amostra de celulose através do método de deconvolução dos picos. . . . .	40
4.13	Refinamento final da Poli( <i>o</i> -etoxianilina) na forma sal de esmeraldina, onde a curva em vermelho indica os dados obtidos experimentalmente, a linha preta é o modelo teórico calculado, em azul representa a diferença entre os dados experimental e teórico (qualidade do refinamento) e as reflexões de Bragg estão representadas pelas linhas em verde. . . . .	46
4.14	Exemplo de medição de espessura das fibras utilizando o programa ImageJ. . . . .	47

5.1	Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ da amostra NaCMQD com concentração polimérica de 100 mg/1 mL $\text{D}_2\text{O}$ a 80 °C. . . . .	50
5.2	Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ da amostra NaCMQH com concentração polimérica de 100 mg/1 mL $\text{D}_2\text{O}$ a 80 °C. . . . .	52
5.3	Unidade de repetição da carboximetilquitosana sugerindo onde os possíveis radicais estão localizados no monômero. . . . .	53
5.4	Estrutura proposta para o monômero da amostra NaCMQD. . . . .	55
5.5	Estrutura proposta para o monômero da amostra NaCMQH. . . . .	55
5.6	Difratogramas das amostras de quitosana em pó e membrana com as localizações dos seus respectivos picos. . . . .	57
5.7	Difratogramas das amostras de carboximetilquitosana sódica da Dayang em pó (NaCMQD) e membrana (M-CMQD) com as localizações dos seus respectivos picos. . . . .	58
5.8	Difratogramas das amostras de carboximetilquitosana sódica da Hepe em pó (NaCMQH) e membrana (M-CMQH) com as localizações dos seus respectivos picos. . . . .	58
5.9	Decomposição dos picos de difração das amostras de quitosana em pó (à esquerda) e membrana de quitosana (à direita). . . . .	60
5.10	Decomposição dos picos nas amostras de carboximetilquitosana sódica da Dayang em pó (à esquerda) e membrana (à direita). . . . .	60
5.11	Decomposição dos picos de difração das amostras de carboximetilquitosana sódica da Hepe em pó (à esquerda) e membrana (à direita). . . . .	61
5.12	Simplificação das etapas do refinamento da amostra Q: (a) inserção dos dados de entrada; (b) e (c) modificação dos parâmetros de cela e início do alargamento dos picos; (d) refinamento final e suas principais reflexões. . . . .	64
5.13	Mapa de visualização do tamanho médio aparente do cristalito nos planos $(a,b)$ , $(b,c)$ e $(c,a)$ em 2D para as amostras Q e M-Q. . . . .	66
5.14	Mapa de visualização do tamanho médio aparente do cristalito nos planos $(a,b)$ , $(b,c)$ e $(c,a)$ em 3D para as amostras Q e M-Q. . . . .	66
5.15	Refinamento final da amostra M-Q com suas principais reflexões após os ajustes de cela e alargamento dos picos, onde: difratograma observado (curvas em vermelho), calculado (curvas em preto) e a diferença entre o observado e calculado (em azul). . . . .	67
5.16	Refinamento final da amostra NaCMQD com a sua principal reflexão após os ajustes de cela e alargamento dos picos, onde: difratograma observado (curvas em vermelho), calculado (curvas em preto) e a diferença entre o observado e calculado (em azul). . . . .	68
5.17	Mapa de visualização do tamanho médio aparente do cristalito nos planos $(a,b)$ , $(b,c)$ e $(c,a)$ em 2D para as amostras NaCMQD e M-CMQD. . . . .	69
5.18	Mapa de visualização do tamanho médio aparente do cristalito nos planos $(a,b)$ , $(b,c)$ e $(c,a)$ em 3D para as amostras NaCMQD e M-CMQD. . . . .	69
5.19	Refinamento final da amostra M-CMQD com a sua principal reflexão após os ajustes de cela e alargamento dos picos, onde: difratograma observado (curvas em vermelho), calculado (curvas em preto) e a diferença entre o observado e calculado (em azul). . . . .	70

5.20 Refinamento final da amostra NaCMQH com a sua principal reflexão após os ajustes de cela e alargamento dos picos, onde: difratograma observado (curvas em vermelho), calculado (curvas em preto) e a diferença entre o observado e calculado (em azul). . . . .	71
5.21 Mapa de visualização do tamanho médio aparente do cristalito nos planos $(a,b)$ , $(b,c)$ e $(c,a)$ em 2D para as amostras NaCMQH e M-CMQH. . .	72
5.22 Mapa de visualização do tamanho médio aparente do cristalito nos planos $(a,b)$ , $(b,c)$ e $(c,a)$ em 3D para as amostras NaCMQH e M-CMQH. . .	72
5.23 Refinamento final da amostra M-CMQH com a sua principal reflexão após os ajustes de cela e alargamento dos picos, onde: difratograma observado (curvas em vermelho), calculado (curvas em preto) e a diferença entre o observado e calculado (em azul). . . . .	73
5.24 Micrografia da amostra Q com aproximações: (a) 200x; (b) 1.200x; (c) 1.500x; (d) 10.000x. . . . .	74
5.25 Micrografia da amostra M-Q com aproximações: (a) 300x; (b) 12.000x; (c) 45.000x; (d) 120.000x. . . . .	75
5.26 Histograma da espessura das fibras da M-Q em função da frequência observada, juntamente com a gaussiana, desvio padrão e ponto médio. .	76
5.27 Micrografia da amostra NaCMQD com aproximações: (a) 200x; (b) 450x; (c) 800x; (d) 2.000x. . . . .	77
5.28 Micrografia da amostra M-CMQD com aproximações: (a) 400x; (b) 700x; (c) 1.500x; (d) 3.500x. . . . .	78
5.29 Histograma da espessura das fibras da M-CMQD em função da frequência observada, juntamente com a gaussiana, desvio padrão e ponto médio. .	79
5.30 Micrografia da amostra NaCMQH com aproximações: (a) 700x; (b) 2.500x; (c) 8.000x; (d) 15.000x. . . . .	80
5.31 Micrografia da amostra M-CMQH com aproximações: (a) 500x; (b) 2.000x; (c) 8.000x; (d) 13.500x. . . . .	81
5.32 Histograma da espessura das fibras da M-CMQH em função da frequência observada, juntamente com a gaussiana, desvio padrão e ponto médio. .	82
5.33 Curvas termogravimétricas (linha contínua) das amostras de Q (à esquerda) e M-Q (à direita) e suas derivadas (linha tracejada). . . . .	83
5.34 Curvas termogravimétricas (linha contínua) das amostras de NaCMQD (à esquerda) e M-CMQD (à direita) e suas derivadas (linha tracejada). .	85
5.35 Curvas termogravimétricas (linha contínua) das amostras de NaCMQH (à esquerda) e M-CMQH (à direita) e suas derivadas (linha tracejada). .	86

## LISTA DE TABELAS

5.1	Deslocamento químico e grau de substituição $\overline{GS}$ para a amostra NaCMQD	51
5.2	Grau de substituição e carboximetilação total da amostra NaCMQD . .	51
5.3	Deslocamento químico e grau de substituição $\overline{GS}$ para a amostra NaCMQH	52
5.4	Grau de substituição e carboximetilação total da amostra NaCMQH . .	53
5.5	Estimativa da presença dos radicais $-H$ , $-CH_2C(O)O^-Na^+$ e $-C(O)CH_3$ na amostra NaCMQD . . . . .	54
5.6	Estimativa da presença dos radicais $-H$ , $-CH_2C(O)O^-Na^+$ e $-C(O)CH_3$ na amostra NaCMQH . . . . .	54
5.7	Percentuais de cristalinidade estimados para as amostras Q, M-Q, NaCMQD, M-CMQD, NaCMQH e M-CMQH . . . . .	61
5.8	Ajuste Le Bail para, Q, M-Q, NaCMQD, M-CMQD, Na-CMQH e M-CMQH	67
5.9	Valores de temperatura inicial de degradação ( $T_{onset}$ ), temperatura de máxima degradação ( $T_{max}$ ), temperatura final de degradação ( $T_{final}$ ) e porcentagem de perda de massa da amostra Q e M-Q . . . . .	84
5.10	Valores de temperatura inicial de degradação ( $T_{onset}$ ), temperatura de máxima degradação ( $T_{max}$ ), temperatura final de degradação ( $T_{final}$ ) e porcentagem de perda de massa da amostra NaCMQD e M-CMQD . . .	85
5.11	Valores de temperatura inicial de degradação ( $T_{onset}$ ), temperatura de máxima degradação ( $T_{max}$ ), temperatura final de degradação ( $T_{final}$ ) e porcentagem de perda de massa da amostra NaCMQH e M-CMQH . . .	87

# SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>14</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>16</b>
2.1	POLÍMERO . . . . .	16
2.2	QUITINA, QUITOSANA E N,O-CARBOXIMETILQUITOSANA . . . . .	16
2.3	MEMBRANAS . . . . .	22
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>26</b>
3.1	OBJETIVO GERAL . . . . .	26
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS . . . . .	26
<b>4</b>	<b>METODOLOGIA</b>	<b>28</b>
4.1	PURIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS . . . . .	28
4.1.1	Quitosana . . . . .	28
4.1.2	N,O-Carboximetilquitosana Sódica . . . . .	29
4.2	SÍNTESE DAS MEMBRANAS . . . . .	30
4.2.1	Síntese da Membrana de Quitosana . . . . .	30
4.2.2	Síntese da Membrana de N,O-Carboximetilquitosana . . . . .	31
4.3	ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE CARBONO 13 (RMN <sup>13</sup> C) . . . . .	32
4.4	DIFRAÇÃO DE RAIOS X EM POLICRISTAIS . . . . .	33
4.4.1	Difração de Raios X . . . . .	33
4.4.2	Amostras Policristalinas . . . . .	35
4.4.3	Coleta de Dados . . . . .	37
4.4.4	Estimativa do Percentual de Cristalinidade . . . . .	38
4.4.5	MÉTODO DE LE BAIL . . . . .	41
4.4.6	Método dos Mínimos Quadrados . . . . .	41
4.4.7	Fatores de discordância ( <i>R-Values</i> ) . . . . .	42
4.4.8	Análise microestrutural . . . . .	44
4.4.9	Coleta e tratamento de dados . . . . .	45

4.5	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) . . . . .	46
4.6	ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA (TGA) . . . . .	48
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>49</b>
5.1	ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE CARBONO 13 (RMN <sup>13</sup> C) . . . . .	49
5.1.1	RMN <sup>13</sup> C para NaCMQD . . . . .	49
5.1.2	RMN <sup>13</sup> C para NaCMQH . . . . .	51
5.1.3	Determinação da Estrutura Molecular das Amostras NaCMQD e NaCMQH . . . . .	53
5.2	ANÁLISE POR DRX E ESTIMATIVA DO PERCENTUAL DE CRISTALINIDADE . . . . .	56
5.2.1	Análise por DRX . . . . .	56
5.2.2	Estimativa do Percentual de Cristalinidade . . . . .	59
5.3	AJUSTE LE BAIL . . . . .	62
5.3.1	Etapas do Ajuste Le Bail . . . . .	62
5.3.2	Ajuste Le Bail para a Quitosana (Q) em Pó e Membrana (M-Q) . . . . .	63
5.3.3	N,O-Carboximetilquitosana Sódica em Pó (NaCMQD) e Membrana (M-CMQD) . . . . .	68
5.3.4	N,O-Carboximetilquitosana Sódica em Pó (NaCMQH) e Membrana (M-CMQH) . . . . .	70
5.4	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) . . . . .	74
5.4.1	Q e M-Q . . . . .	74
5.4.2	NaCMQD e M-CMQD . . . . .	77
5.4.3	NaCMQH e M-CMQH . . . . .	79
5.5	ANÁLISE POR TGA/DTG . . . . .	82
5.5.1	Análise das Curvas de TGA/DTG das Amostras Q e M-Q . . . . .	83
5.5.2	Análise das Curvas de TG/DTG das Amostras NaCMQD e M-CMQD . . . . .	84
5.5.3	Análise das Curvas de TG/DTG das Amostras NaCMQH e M-CMQH . . . . .	86
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO</b>	<b>88</b>



# 1 INTRODUÇÃO

Esta pesquisa representa uma parceria estabelecida entre o Departamento de Física da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), o Instituto de Química de São Carlos (IQSC – USP) e o Instituto de Física de São Carlos (IFSC – USP).

Nos últimos anos tornou-se intensa a produção de membranas constituídas dos mais variados tipos de materiais para a utilização em engenharia de biotecnologia. Estas membranas apresentam propriedades importantes, como a permeabilidade à água, ação na liberação controlada de fármacos, barreira física, suporte para a proliferação e crescimento celular etc [1, 2].

Dentro deste contexto, muitos esforços estão sendo despendidos para prevenir a ocorrência de aderências pós-cirúrgicas através do desenvolvimento de materiais comercializados por indústrias farmacêuticas internacionais, como INTERCEED® (Johnson & Johnson Inc.), Sepragel®, Seprafil® (Genzyme Co.), CoSeal (Baxter Inc.) e Cova™ CARD (Biom'Up) [3].

Recentemente, um trabalho desenvolvido por pesquisadores da Faculdade de Medicina (FM – USP), Instituto de Química de São Carlos (IQSC – USP) e Fundação São Francisco Xavier (USIMINAS) propôs uma nova abordagem através da utilização do fator de crescimento de queratinócitos e a N,O-carboximetilquitosana em forma de gel, resultando na efetiva diminuição de adesões pericárdicas em animais de grande porte [4]. Entretanto, essa formulação tem suas aplicações limitadas aos procedimentos em que não são empregados drenos pós-cirúrgicos. Dessa forma, a utilização de membranas de quitosana e de seus derivados talvez seja uma das mais promissoras aplicações na área e serão objetos de pesquisa deste projeto.

Os pesquisadores Prof. Dr. Sérgio Paulo Campana Filho e Ms. Anderson Fiamingo, do Instituto de Química de São Carlos (IQSC – USP) já desenvolvem e aplicam estas membranas na prevenção de aderências pós-cirúrgicas [3]. Assim, esta dissertação representa uma parceria com esses pesquisadores, juntamente com a Prof<sup>a</sup>. Dra. Yvonne Primerano Mascarenhas (IFSC – USP), visando um maior conhecimento sobre as estruturas e morfologias dessas membranas, e permitindo complementar as análises já realizadas pelos pesquisadores envolvidos nos estudos dessas membranas

como matrizes na regeneração de células mesoteliais.

As membranas foram produzidas via liofilização nos laboratórios do Departamento de Física da UFAM e nos laboratórios de Físico-Química Orgânica do IQSC – USP. As análises estruturais e morfológicas foram realizadas em amostras de quitosana e N,O-carboximetilquitosana sob a forma de pó e membrana. As investigações acerca da estrutura e morfologia foram desempenhadas através de Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13 (RMN  $^{13}\text{C}$ ), Difração de Raios X (DRX), Refinamento Estrutural pelo Método de Le Bail, Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Análise Termogravimétrica (TGA).

Pesquisas envolvendo quitosana e seus derivados estão em pleno desenvolvimento e diversos trabalhos vêm sendo publicados nos quais aspectos físicos e químicos destes biopolímeros são bastante discutidos [5, 6, 7, 8]. Os estudos estruturais e morfológicos de biopolímeros representam uma área onde existe muito a ser desvendado e continua sendo um tópico de pesquisa em pleno desenvolvimento. O estudo estrutural e morfológico dos materiais de partida e de suas modificações estruturais será relacionado tanto ao entendimento do seu uso como inibidor de aderências, quanto em eventuais propostas de modificações no processo de síntese.

Embora as estruturas moleculares e cristalinas da quitosana e de seus derivados tenham sido objetos de intensa investigação através de técnicas como espalhamento de luz, RMN  $^1\text{H}$  e Difração de Raios X [9, 10, 11], a maioria dessas determinações utiliza fibras de quitosana que, devido à sua alta cristalinidade, permitem obter informações bastante detalhadas sobre sua estrutura. Porém, são poucas as referências estruturais relacionadas às amostras sob a forma de membranas. Tendo por base as propostas estruturais já existentes e, considerando a importância dessas membranas na reconstituição celular, é intenção deste projeto a caracterização estrutural e morfológica das membranas produzidas, com o intuito de fornecer dados estruturais e morfológicos que possam contribuir para o aperfeiçoamento de sua produção e aplicação.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 POLÍMERO

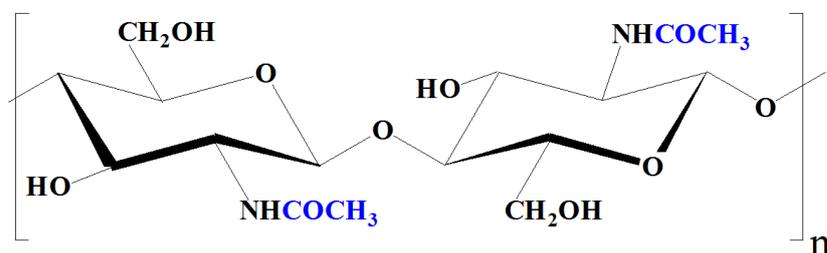
A palavra “polímero” origina-se do grego (*poli* = muitos e *meros* = unidade de repetição). Assim, o polímero é uma grande molécula constituída por pequenas unidades de repetição unidas por ligação covalente. As substâncias que dão origem ao polímero por reação química são chamadas de *monômero*. Sua classificação pode ser feita de acordo com o enfoque do estudo como, por exemplo, quanto à origem de obtenção do polímero (natural, semissintética ou sintética), tipo de reação de polimerização (adição ou condensação), tipo de comportamento devido à variação de temperatura (termoplástico ou termorrígido), quanto à cristalinidade (semicristalino ou não cristalino), quanto à estrutura (linear, ramificada, com ligações cruzadas ou em rede) etc [12, 13, 14, 15, 16].

### 2.2 QUITINA, QUITOSANA E N,O-CARBOXIMETILQUITOSANA

A quitina é o segundo polímero natural mais abundante sintetizado por organismos vivos. Pode ser encontrada, em sua maioria, no exoesqueleto de artrópodes ou ainda nas paredes celulares de fungos e leveduras. Em 1811, foi descrita pela primeira vez pelo professor Henri Braconnot a partir de cogumelos e posteriormente, em 1823, Auguste Odier isolou a quitina em insetos [17].

Essencialmente, a quitina (**Figura 2.1**) é classificada como homopolímero, ou seja, constituída por um único tipo de mero, 2-acetamido-2-desoxi-D-glicopiranosose (GlcNAc), embora ocorra a presença de uma pequena quantidade (normalmente de 5 a 10%) de unidades 2-amino-2-desoxi-D-glicopiranosose (GlcN) [11, 18, 19, 20, 21].

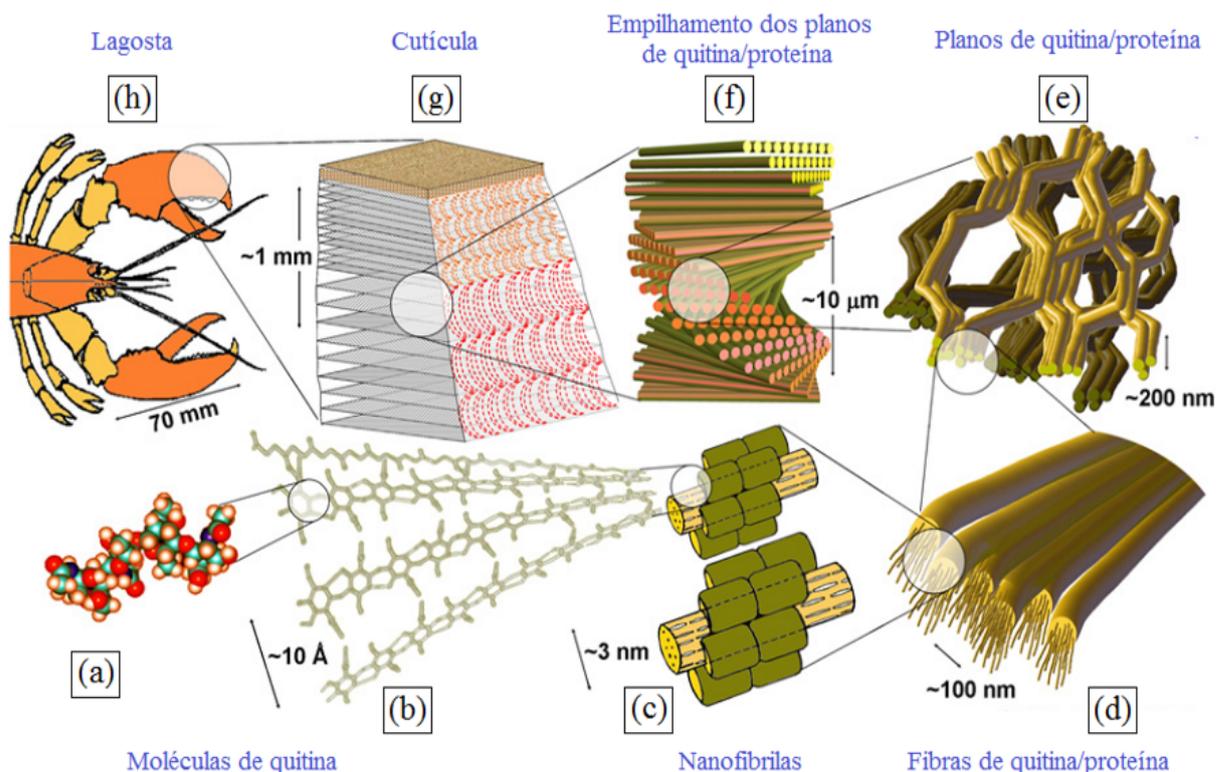
**Figura 2.1:** Estrutura primária da quitina constituída por unidades de GlcNAc, onde  $n$  é o grau de polimerização.



Fonte: Elaboração própria.

A **Figura 2.2** exibe a arquitetura do exoesqueleto da lagosta americana (*H. americanus*) de acordo com a hierarquia de organização em diversos níveis de estrutura aos quais a quitina pertence. A forma ilustrativa dessa arquitetura começa no nível molecular da quitina (**Figura 2.2a**), passando pelas longas cadeias, cujo alinhamento é antiparalelo (**Figura 2.2b**), que se agrupam em torno de 18 a 25 cadeias formando unidades longas e estreitas chamadas de nanofibrilas (em amarelo na **Figura 2.2c**), cujo diâmetro varia entre 2 a 5 nm e comprimento em torno de 300 nm, envolvidas por proteínas (em verde na **Figura 2.2c**). Em seguida, as nanofibrilas do conjunto de quitina/proteína vão se agregar e formar fibras com diâmetro de 50 a 350 nm (**Figura 2.2d**) que, em maior escala, formam planos que se assemelham a favos de mel (**Figura 2.2e**). Tais planos são empilhados formando uma sequência helicoidal (**Figura 2.2f**) que compõem as camadas da cutícula (**Figura 2.2g**) que é encontrada em diversos artrópodes, como a lagosta americana (*H. americanus*) (**Figura 2.2h**) [22].

**Figura 2.2:** Hierarquia dos principais níveis estruturais e elementos microestruturais referentes à cutícula da lagosta americana (*H. americanus*).



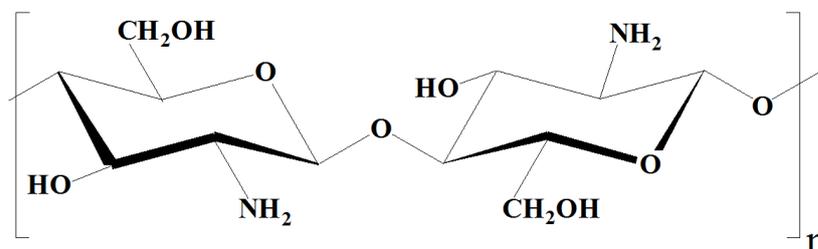
Fonte: Raabe, Sachs e Romano (modificado, 2007) [22].

A remoção da acetila ( $-\text{COCH}_3$ ) presente na quitina caracteriza a sua desacetilação. Com isso, obtém-se um derivado com grande aplicabilidade em diversas áreas: a quitosana (**Figura 2.3**), que foi descrita pela primeira vez por Charles Rouget em 1859 [17]. Ambas possuem similaridades em suas estruturas, entretanto, na quitosana há a maior predominância, por volta de 50 a 60%, das unidades de 2-amino-2-desoxi-D-glicopiranosose (GlcN) e outra parte é composta por unidades de 2-acetamido-2-desoxi-D-glicopiranosose (GlcNAc), tornando-a um copolímero, ou seja, constituída por mais de um tipo de mero.

A composição da quitosana é variável em função do grau médio de acetilação ( $\overline{GA}$ ), o qual permite definir a porcentagem das unidades de GlcNAc em sua estrutura e diferenciá-la da quitina, pois, para a quitosana, sua estrutura tem que apresentar  $\overline{GA} < 50\%$ . Assim, quanto menor a presença de GlcNAc, menor será o seu grau médio de acetilação. Entretanto, a completa desacetilação da quitina raramente é realizada por necessitar de inúmeras reações consecutivas, o que favorece a sua progressiva

despolimerização [18, 20, 21, 23].

**Figura 2.3:** Estrutura primária da quitosana constituída por unidades de GlcN, onde n é o grau de polimerização.



Fonte: Elaboração própria.

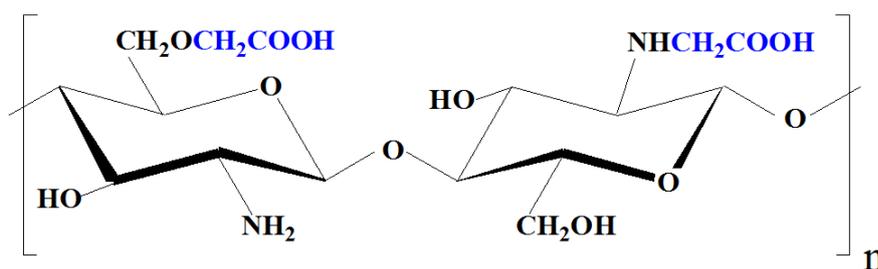
Na prática, um dos fatores utilizados para diferenciar a quitosana da quitina é através da solubilidade, na qual a primeira apresenta-se solúvel em soluções aquosas diluídas de vários ácidos orgânicos (acético, fórmico e cítrico, por exemplo) e inorgânicos (como o clorídrico), diferentemente da quitina que não é solúvel nesses meios, somente em poucos sistemas de solventes. Tal solubilidade está associada à quantidade de grupos amino protonados ( $-\text{NH}_3^+$ ) na cadeia polimérica, pois a presença desses grupos está associada com o aumento da repulsão eletrostática entre as cadeias permitindo um melhoramento na solubilidade da quitosana [11, 24, 25]. Dessa forma, a quitosana pode ser moldada em diferentes formas (pós, membranas, géis, arcabouços, fibras etc) e para diversas finalidades (agricultura, tratamento de água e resíduos, comidas e bebidas, cosméticos e produtos de higiene pessoal, biofarmacêuticos etc), segundo as menções feitas por Shahidi, Arachchi e Jeon (1999) [26], Rinaudo (2006) [11] e Dash e colaboradores (2011) [21].

As áreas de maiores interesses para aplicações da quitosana residem na engenharia de tecidos, biomedicina e indústrias farmacêuticas por ser promissora como agente cicatrizante, biocompatibilizante entre tecidos, carregador de fármacos nas formas de membrana, géis, comprimidos e por apresentar biocompatibilidade, biodegradabilidade, atoxicidade, entre outros [24, 27, 28].

Apesar da quitosana ser solúvel em diversas soluções aquosas moderadamente ácidas, isso acaba se tornando uma limitação para aplicações em outros pH. Entretanto, a presença de três grupos reativos (duas hidroxilas e uma amina) em sua estrutura possibilita realizar modificações químicas estruturais e obter diversos derivados a fim

de aumentar a sua aplicabilidade em relação à solubilidade. Um dos derivados da quitosana de grande importância é a N,O-carboximetilquitosana que ocorre através da carboximetilação, ou seja, através da inserção de grupos carboximéticos em sua estrutura (**Figura 2.4**), tornando-a solúvel em outros intervalos de pH, como verificado por Fiamingo (2012) [3].

**Figura 2.4:** Estrutura primária da N,O-carboximetilquitosana, onde n é o grau de polimerização.

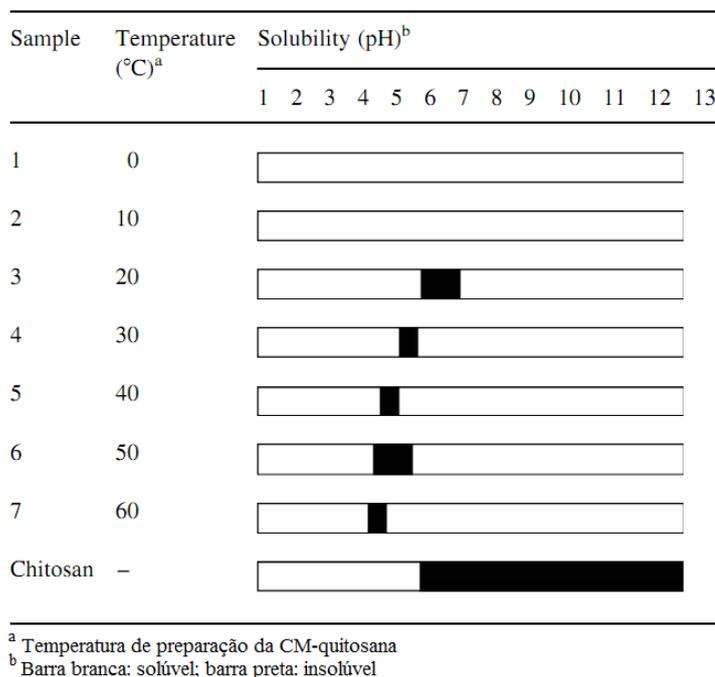


Fonte: Elaboração própria.

A obtenção da N,O-carboximetilquitosana é dada através dos sítios reativos presentes nas cadeias poliméricas da quitosana. A reação de O-carboximetilação ocorre no sítio reativo da hidroxila. Já a N-carboximetilação ocorre no sítio reativo referente ao grupo amino. A importância da N,O-carboximetilquitosana não se resume somente à sua solubilidade em amplas faixas de pH, como mostrado acima, mas também por apresentar propriedades físicas, químicas e biológicas, tais como baixa toxicidade, atividade antifúngica, biocompatibilidade, além das propriedades na formação de géis, filmes ou membranas com relevante eficácia para prevenção de aderências pós-cirúrgicas e liberação de fármacos [29, 30, 31, 32].

Para Chen e Park (2003) [33], a variação de temperatura da solução de carboximetilquitosana com água/isopropanol influenciou diretamente em sua solubilidade, como pode ser verificado na **Figura 2.5**, onde no intervalo de 0 a 10 °C a carboximetilquitosana apresentou-se solúvel em todo o espectro de pH. Entretanto, a medida em que a temperatura foi aumentada até 60 °C, a carboximetilquitosana apresentou insolubilidade próxima a pH neutros. Tal comportamento pode ser atribuído à agregação de segmentos das cadeias acetiladas ou à formação de amida devido à secagem térmica [33].

**Figura 2.5:** Amostras de carboximetilquitosana em soluções aquosas com vários pH e temperaturas de preparação.



Fonte: Chen e Park (modificado, 2003) [33].

Costain e colaboradores (1997) [34] analisaram a eficácia de N,O-carboximetilquitosana no processo de cicatrização pós-operatória utilizando três modelos cirúrgicos, onde cobaias foram submetidas ao tratamento de N,O-carboximetilquitosana em forma de gel e solução. Tal tratamento evitou a formação das adesões pós-operatórias e não interferiu no processo de cicatrização.

Diamond e colaboradores (2003) [35] realizaram estudos *in vivo* utilizando N,O-carboximetilquitosana em forma de gel e solução para reduzir as adesões pós-operatórias das cirurgias de laparoscopia. O material apresentou-se promissor atuando como uma barreira física prevenindo as adesões pós-operatórias.

Zhou, Elson e Lee (2004) [36] testaram em coelhos a eficácia de N,O-carboximetilquitosana na forma de gel e solução como agente limitante para a formação de adesões após cirurgias abdominais. Tal estudo comprovou que N,O-carboximetilquitosana em ambas as formas (gel ou solução) podem reduzir a incidência ou reincidências das adesões pós-cirúrgicas.

Daroz e colaboradores (2008) [31] investigaram as possíveis alterações físico-químicas de carboximetilquitosana após a termoesterilização e a sua efetividade na

prevenção de aderências pericárdicas pós-esternotomia. Análises físico-químicas comprovaram que não houve diferença entre a carboximetilquitosana termoesterelizada e a não termoesterelizada. Entretanto, a análise macroscópica indicou que, para a carboximetilquitosana termoestéril, houve uma redução significativa na intensidade das aderências demonstrando sua efetividade.

Zhou e colaboradores (2010) [32] elaboraram um estudo para verificar e comprovar a eficácia de N,O-carboximetilquitosana em forma de filme e gel como redutor de adesões pós-cirúrgicas após a realização de cirurgia para tratamento de lesão cardíaca utilizando coelhos e porcos como cobaias. Em ambos os casos, a redução das adesões foram comprovadas.

Estudos recentes sobre o desenvolvimento de barreiras de adesão, seja para finalidade pós-cirúrgica ou para isolar fisicamente ferimentos, apontam os polímeros como sendo promissores nesse tipo de aplicação, como relatado por Cannata e colaboradores [37, 38]. Entre eles, a carboximetilquitosana mostrou-se como sendo um produto com propriedades significantes para as reduções das adesões pós-cirúrgicas.

## 2.3 MEMBRANAS

De acordo com a terminologia adotada pela IUPAC, a membrana representa uma fina camada de material polimérico que atua como uma barreira permitindo o transporte de massa de espécies selecionadas [39].

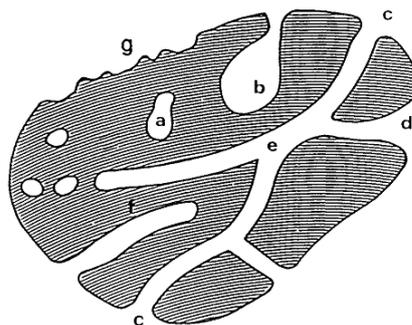
Segundo Hilal, Ismail e Wright (2015) [40], a membrana pode ser definida como uma interfase entre duas fases próximas que age como uma barreira seletiva a qual controla o transporte de substâncias entre essas duas fases.

A funcionalidade da membrana está diretamente relacionada com as suas propriedades químicas e geométricas, as quais permitem definir características importantes como a permeabilidade, resistência mecânica, solubilidade etc. A estrutura interna da membrana pode ser modificada quimicamente ou através de mudança de temperatura. Essas modificações permitem ampliar as aplicações das membranas, tais como para elaboração de sistemas para liberação de fármaco, onde é possível controlar a taxa de liberação de determinado fármaco ao corpo de um organismo vivo, barreiras de adesão pós-operatórias, cicatrização de ferimentos, etc [23, 31, 41, 42, 43].

Quanto ao tamanho dos poros, pode-se dividi-los em três categorias, segundo a IUPAC (2014): microporos, mesoporos e macroporos. O primeiro refere-se aos poros com dimensões menores que 2 nm (20 Å), o segundo refere-se aos poros com dimensões entre 2 e 50 nm (20 e 500 Å) e a última categoria refere-se aos poros com dimensões maiores que 50 nm (500 Å) [44].

Quando um material sólido possui cavidades, canais ou interstícios pode ser considerado poroso, em geral. Para Rouquerol e colaboradores (1994) [45], a classificação dos poros pode ser feita de acordo com a sua área de interação com um fluido externo. Sendo assim, o primeiro tipo de poro é caracterizado pelo seu total isolamento com os seus vizinhos, como descrito na **Figura 2.6a**, recebendo a classificação de poros fechados. Para os seguintes poros, a interação com a superfície externa do poro através de canais, como mostrado em **Figura 2.6b-f**, permite descrevê-los como poros abertos. Esses últimos podem ser subdivididos de acordo com a quantidade de canais: os que possuem apenas um canal de entrada/saída ou *dead-end*, como pode ser observado em *b* e *f*, e os que possuem diversos canais ou *through pores*, como é o caso do poro que está localizado em torno de *e*, permitindo uma maior interação com o meio externo.

**Figura 2.6:** Ilustração de um corte transversal em um sólido poroso com diferentes cavidades, canais e interstícios.



Fonte: Rouquerol e colaboradores, (1994) [45].

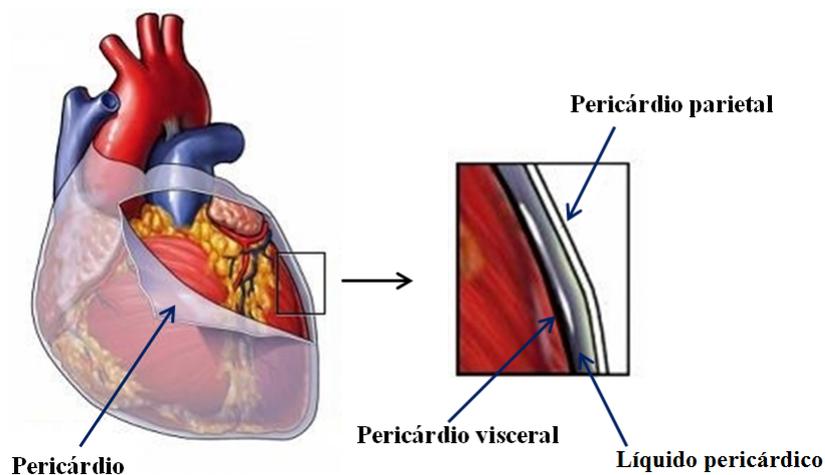
Outra classificação que pode ser destacada está relacionada com o formato dos poros apresentados na **Figura 2.6**, os quais podem exibir um formato cilíndrico, como é o caso de **Figura 2.6c** e **Figura 2.6f**, formato de “tinteiro”, exemplificado por **Figura 2.6b**, em forma de funil ou fenda, mostrado em **Figura 2.6d**. O formato presente em **Figura 2.6g** pode ser classificado como um poro rugoso, entretanto, convencionase

não considerá-lo como poro, mas sim como uma superfície rugosa.

O desenvolvimento de pesquisas direcionadas à produção de membranas para utilização em engenharia de biotecnologia permite desenvolver membranas cada vez mais eficazes e com diversas aplicações, tal como para a liberação controlada de fármacos, como barreira física e como suporte para a proliferação e crescimento celular [1, 2]. Com isso, pode-se destacar a quitosana e N,O-carboximetilquitosana como sendo promissoras na prevenção de adesões pericárdicas pós operatórias devido às suas propriedades já mencionadas anteriormente [3].

O pericárdio é um conjunto de membranas que envolvem o coração (ver **Figura 2.7**) que possui multifunções, tais como a prevenção da dilatação do coração, proteção contra infecções e adesão dos tecidos vizinhos e permite manter o coração em uma posição fixa no tórax [46]. Esse conjunto de membranas é composto por uma camada interna e outra externa. A camada interna é formada pela membrana do pericárdio visceral e a externa possui o pericárdio parietal. A cavidade do pericárdio está localizada entre essas duas membranas e possui o líquido pericárdico (cerca de 20 a 60 mL) que funciona como um lubrificante e permite que o coração se mova livremente durante a função de contração e relaxamento.

**Figura 2.7:** Representação da estrutura do pericárdio e suas respectivas camadas.



Fonte: Medicina Geriátrica (modificado, 2015) [47].

Ao ser realizado algum procedimento cirúrgico cardiovascular, o pericárdio é lesionado para se ter acesso ao coração, o que ocasiona uma perda do líquido contido

em sua cavidade. Tal perda ocasiona a formação de adesões entre as membranas que constituem o pericárdio (membrana visceral e parietal).

De acordo com Daroz e colaboradores (2006) [31], “essas aderências aumentam substancialmente o risco de lesão cardíaca de grandes vasos ou dos enxertos extracardíacos durante a esternotomia, o que conseqüentemente contribui para maior morbidade e mortalidade nas reoperações”.

Cerca de 34% dos procedimentos cirúrgicos são relativos às reoperações cardi-ovasculares devido às adesões pericárdicas. Tal inconveniente interfere na reabilitação dos pacientes e exige maior habilidade técnica aos cirurgiões, além do tempo gasto durante as reoperações [31, 48].

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Sintetizar e caracterizar estrutural e morfológicamente membranas de quitosana e N,O-carboximetilquitosana para aplicações biomédicas.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Purificar as amostras em pó de Quitosana (adquirida da Yue Planting – China) e Carboximetilquitosana sódica (adquirida da Heppe Medical – Alemanha e Dayang Chemicals Company – China);
- Sintetizar das membranas de Quitosana e Carboximetilquitosana sódica (adquirida da Heppe Medical – Alemanha e Dayang Chemicals Company – China);
- Analisar a estrutura molecular das amostras em pó de N,O-carboximetilquitosana, determinar o seu grau médio de acetilação e o grau médio de substituição através da Ressonância Magnética Nuclear de carbono 13 (RMN  $^{13}\text{C}$ );
- Obter os perfis de Difração de Raios X (DRX) das amostras purificadas de Quitosana e N,O-carboximetilquitosana sob a forma de pó, e das membranas produzidas a partir desses materiais;
- Estimar o Percentual de Cristalinidade das amostras através do programa *Peak Fitting Module* (PMF) utilizando-se os perfis de DRX;
- Definir os parâmetros de cela unitária ( $a$ ,  $b$ ,  $c$ ,  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , volume e grupo espacial) baseados inicialmente em dados da literatura;
- Realizar o Ajuste Le Bail através do programa *FullProf*, utilizando-se os perfis de DRX coletados no modo *stepscanning* para refinar os parâmetros de cela anteriormente encontrados em literatura e determinar o tamanho e a forma dos cristalitos que constituem as fases cristalinas das amostras;

- Avaliar a morfologia dos pós e das membranas através da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV);
- Verificar o comportamento das amostras em pó e membrana submetidas a variações de temperatura através da análise termogravimétrica (TGA).

## 4 METODOLOGIA

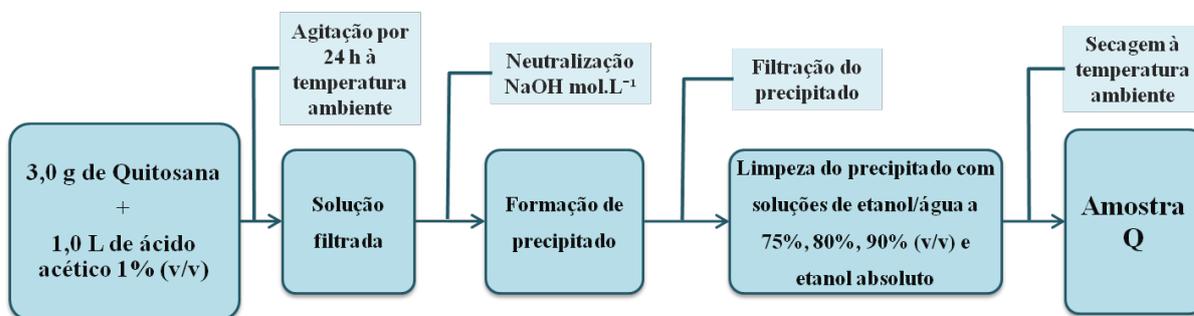
### 4.1 PURIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS

Com base nos procedimentos realizados por Abreu e Campana-Filho (2009) [49], realizou-se a purificação das amostras de quitosana (adquirida da Yue Planting Company) e N,O-carboximetilquitosana sódica (obtida de duas diferentes fontes, Dayang Chemicals e Heppe Medical). Os procedimentos de purificação são descritos detalhadamente a seguir.

#### 4.1.1 Quitosana

Utilizou-se 1,0 L de ácido acético 1% (v/v) no qual foi adicionado vagarosamente 3,0 g de quitosana, resultando em uma suspensão mantida em agitação constante por 24 h à temperatura ambiente. Filtrou-se a solução resultante, sob pressão positiva, em uma membrana com porosidade 0,45  $\mu\text{m}$  (Millipore – White SCWP). Em seguida, a solução filtrada foi neutralizada com solução concentrada de NaOH ( $1,0 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), ocasionando a precipitação de quitosana. O precipitado foi filtrado e lavado com soluções de etanol/água a 75%, 80%, 90% (v/v), etanol absoluto, e seco à temperatura ambiente. A amostra purificada de quitosana foi rotulada como amostra Q cujos passos para a realização da purificação estão descritos na **Figura 4.1**.

**Figura 4.1:** Procedimentos realizados para a purificação da amostra de quitosana (Q).

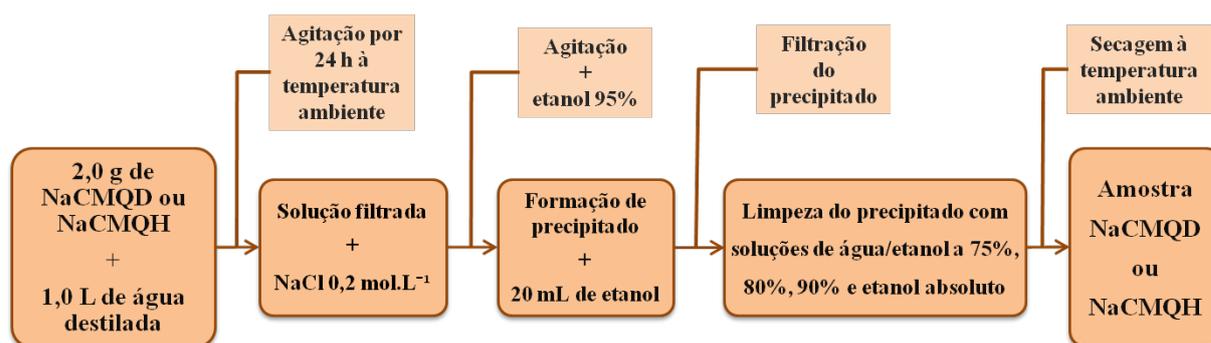


Fonte: Elaboração própria.

#### 4.1.2 N,O-Carboximetilquitosana Sódica

Adicionou-se 2,0 g de carboximetilquitosana sódica em 1,0 L de água destilada resultando em uma suspensão que foi mantida em agitação por aproximadamente 24 h à temperatura ambiente. A solução resultante foi filtrada, sob pressão positiva, em membrana com porosidade 0,45  $\mu\text{m}$  (Millipore – White SCWP). Em seguida, adicionou-se 1,0 L de solução de NaCl 0,2 mol·L<sup>-1</sup> à solução filtrada mantendo a mesma sob agitação por aproximadamente 30 min. Posteriormente, acrescentou-se etanol 95% em porções de 100 mL sob forte agitação até ocorrer a precipitação do polímero. Para assegurar a precipitação de toda a carboximetilquitosana sódica, adicionou-se mais 20 mL de etanol. Tal precipitado foi filtrado e lavado com soluções de etanol/água a 75%, 80%, 90% (v/v) e etanol absoluto. Por fim, o precipitado permaneceu à temperatura ambiente para a sua secagem. As amostras purificadas de carboximetilquitosana sódica da Dayang Chemicals Co. e da Heppe Medical foram rotuladas como NaCMQD e NaCMQH, respectivamente. As etapas de purificação dessas amostras estão descritas na **Figura 4.2**.

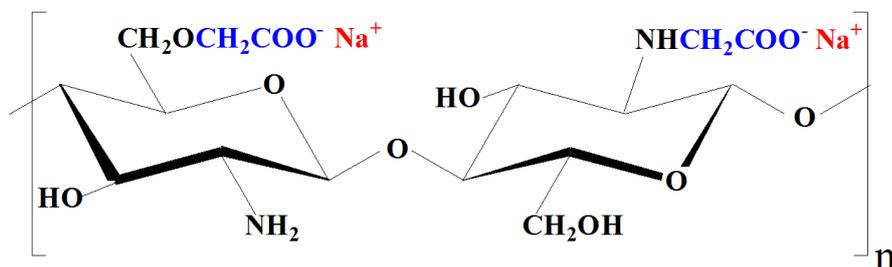
**Figura 4.2:** Procedimentos realizados para a purificação da amostra de carboximetilquitosana sódica (NaCMQD e NaCMQH).



Fonte: Elaboração própria.

A estrutura da N,O-carboximetilquitosana sódica difere da estrutura apresentada na **Figura 2.4**, como mostra a **Figura 4.3**. A forma sódica da carboximetilquitosana permite sua solubilidade em água, além de ser a forma mais comum de purificação, como relatado por Fiamingo (2012) [3].

**Figura 4.3:** Estrutura primária da N,O-carboximetilquitosana sódica, onde  $n$  é o grau de polimerização.



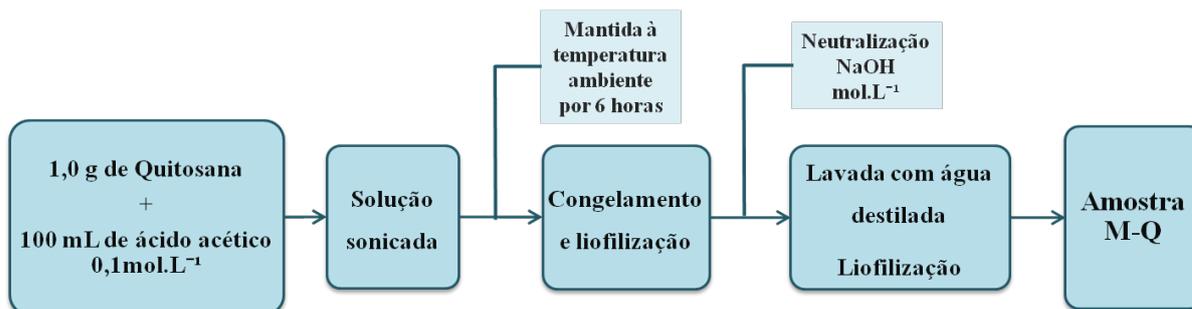
Fonte: Elaboração própria.

## 4.2 SÍNTESE DAS MEMBRANAS

### 4.2.1 Síntese da Membrana de Quitosana

Preparou-se uma solução contendo 1,0 g de quitosana e 100 mL de ácido acético a  $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ . A solução resultante foi sonicada em banho ultrassônico para a remoção de bolhas de ar, transferida para placas de Petri e mantida à temperatura ambiente por 6 h. A relação entre a área do disco e o volume da solução utilizada foi de  $2,0 \text{ cm}^2\cdot\text{mL}^{-1}$ . Logo após a secagem, a membrana foi congelada, liofilizada e neutralizada com solução aquosa de NaOH a  $0,05 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ . Após a neutralização, a membrana foi lavada com água destilada para a remoção de possíveis sais presentes e liofilizadas novamente. A membrana de quitosana foi denominada amostra M-Q. A **Figura 4.4** mostra os passos para a realização da síntese da membrana de quitosana.

**Figura 4.4:** Procedimentos realizados para a síntese da membrana de quitosana (M-Q).

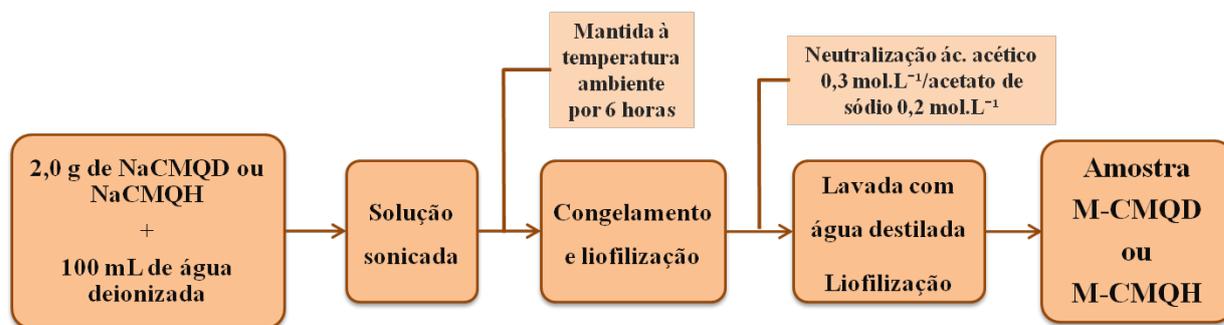


Fonte: Elaboração própria.

#### 4.2.2 Síntese da Membrana de N,O-Carboximetilquitosana

Duas soluções de carboximetilquitosana sódica foram preparadas através da dissolução de 2,0 g de amostra (NaCMQD ou NaCMQH) em 100 mL de água deionizada. As soluções resultantes foram sonicadas em banho ultrassônico para a remoção de bolhas de ar, transferidas para placas de Petri (área do disco/volume de solução utilizada:  $2,0 \text{ cm}^2 \cdot \text{mL}^{-1}$ ) e mantidas à temperatura ambiente por 6 horas. Decorridas as 6 h, as membranas foram congeladas, liofilizadas e neutralizadas com solução tampão de ácido acético a  $0,3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  e acetato de sódio a  $0,2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  ( $\text{pH} = 4,5$ ). Por fim, todas as membranas foram lavadas com água destilada para a remoção de sais presentes e liofilizadas novamente. As membranas de carboximetilquitosana da Dayang Chemicals Co. e da Heppe Medical foram rotuladas como M-CMQD e M-CMQH, respectivamente, as quais tiveram o  $\text{Na}^+$  removido parcialmente de suas estruturas através da etapa de lavagem empregada na síntese [3]. A **Figura 4.5** ilustra a metodologia descrita acima.

**Figura 4.5:** Procedimentos da síntese das membranas de carboximetilquitosana (M-CMQD e M-CMQH).



Fonte: Elaboração própria.

A **Figura 4.6** mostra os resultados obtidos das amostras em pó após a purificação e após a síntese das suas respectivas membranas.

**Figura 4.6:** Resultado da purificação e sintetização das membranas mostradas em (a) Q e M-Q; (b) NaCMQD e M-CMQD; (c) NaCMQH e M-CMQH.



Fonte: Elaboração própria.

#### 4.3 ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE CARBONO 13 (RMN $^{13}\text{C}$ )

A ressonância magnética nuclear é um método espectroscópico que, essencialmente, baseia-se na medição da absorção de radiação eletromagnética, na região de radiofrequência, por um núcleo em um campo magnético forte a qual permite determinar propriedades físicas ou químicas de átomos ou moléculas em questão. A técnica de RMN  $^{13}\text{C}$  é utilizada para realizar investigações a nível molecular [25, 50, 51, 52].

Entre as inúmeras informações que podem ser obtidas, pode-se destacar a determinação da estrutura tridimensional de moléculas e, assim, estabelecer correlações entre estrutura e propriedades dos materiais. Tal técnica foi utilizada para a análise das estruturas químicas, para a determinação do grau médio de acetilação e de substituição das N,O-carboximetilquitosanas sódicas (NaCMQD e NaCMQH). Os espectros das amostras citadas foram obtidos através do equipamento BRUKER AVANCE DRX500 (FFLC/RP-USP), no Instituto de Química de São Carlos (IQSC-USP).

Baseado na literatura [53], o preparo da solução para ser analisada consistiu em adicionar 100 mg de amostra em 1,0 mL de  $\text{D}_2\text{O}$  (1% v/v). Manteve-se sob agitação por 24 h e, como resultado, observou-se uma solução límpida e viscosa. Parte desta solução foi transferida para um tubo apropriado (Aldrich 527-PP,  $\varphi = 5$  mm). Para a

obtenção dos espectros das amostras Q, NaCMQD e NaCMQH, utilizou-se supressão de água com sequência de pulsos 1-1, onde o intervalo utilizado entre cada pulso de supressão foi de 3 segundos, totalizando 32 varreduras. O tempo de relaxação foi de 7 segundos, a janela espectral foi de 10 ppm e o tamanho do FID (*Free Induction Decay*) 32K [49]. As medidas foram realizadas no Instituto de Química de São Carlos (IQSC – USP).

## 4.4 DIFRAÇÃO DE RAIOS X EM POLICRISTAIS

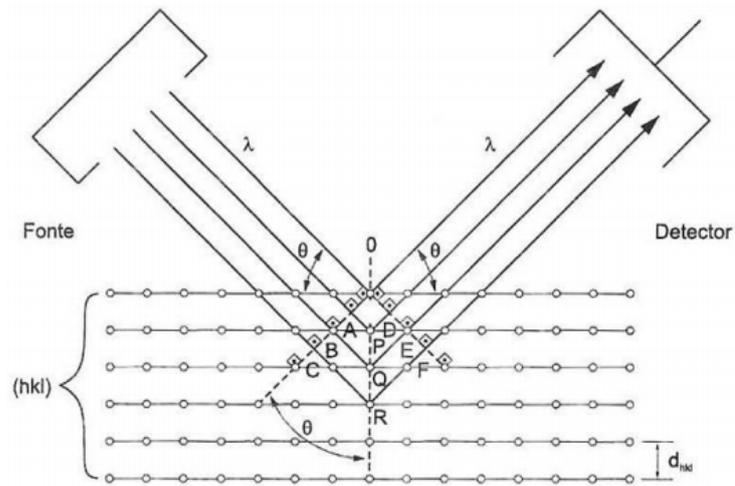
### 4.4.1 Difração de Raios X

Os raios X são ondas eletromagnéticas com comprimentos de onda que variam entre  $10^{-15}$  m ( $10^{-5}$  Å) e  $10^{-8}$  m (100 Å). Sua descoberta foi em 1895 e está atribuída ao físico alemão Wilhelm Conrad Röntgen. Uma das principais aplicações está relacionada com a investigação da estrutura da matéria. O fenômeno da difração de raios X ocorre quando um feixe monocromático, com comprimento de onda  $\lambda$ , incide com um ângulo  $\theta$  em uma série de obstáculos espaçados regularmente, dado pelo conjunto de planos  $hkl$  (índices de Miller), com espaços comparáveis (em magnitude  $d_{hkl}$ ) ao comprimento de onda incidente, sendo capaz de espalhá-las [54, 55].

Para que ocorra a difração de raios X (DRX ou XRD, do inglês, *X-Ray Diffraction*), o espaçamento interplanar deve ter aproximadamente a mesma ordem de grandeza da onda da radiação incidente e deve estar espacialmente distribuído em um arranjo altamente regular [54, 55, 56, 57].

W. L. Bragg desenvolveu um modelo para compreender melhor os feixes difratados por um cristal. Supondo que os feixes incidentes sejam refletidos especularmente (o ângulo de incidência é igual ao ângulo de reflexão) por planos dispostos paralelamente no interior do cristal separados por uma distância  $d$ , haverá feixes difratados quando as reflexões provenientes dos planos paralelos de átomos produzirem interferência construtiva, conforme indicado na **Figura 4.7**.

**Figura 4.7:** Representação das reflexões de Bragg em planos dispostos paralelamente.



Fonte: Rodrigues (2013) [58].

Dados os planos cristalinos, um feixe de radiação incide sobre eles com um ângulo  $\theta$ . Com resultado, tal feixe sofre um espalhamento devido à interação com os átomos localizados nas posições  $P$ ,  $Q$  e  $R$ . De acordo com a geometria da **Figura 4.7**, a trajetória percorrida pelo feixe no seguimento  $AP$  corresponde a ( $AP = d \sin \theta$ ), da mesma forma para o seguimento  $PD$ , ou seja:

$$AP = PD = d \sin \theta \quad (4.1)$$

Para que haja uma interferência construtiva do feixe no ângulo  $\theta$ , a diferença de caminho para raios refletidos por planos adjacentes ( $AP + PD = 2d \sin \theta$ ) tem que ser um múltiplo inteiro de  $\lambda$ :

$$2d_{hkl} \sin \theta = n\lambda \quad (4.2)$$

onde  $n = 1, 2, 3, \dots$ . Tal condição é conhecida como Lei de Bragg, o qual mostra a relação entre as posições angulares dos feixes difratados reforçados, em termos do comprimento de onda  $\lambda$  do feixe de raios X incidente e da distância interplanar  $d_{hkl}$ , dos planos cristalográficos [54, 56, 58, 59].

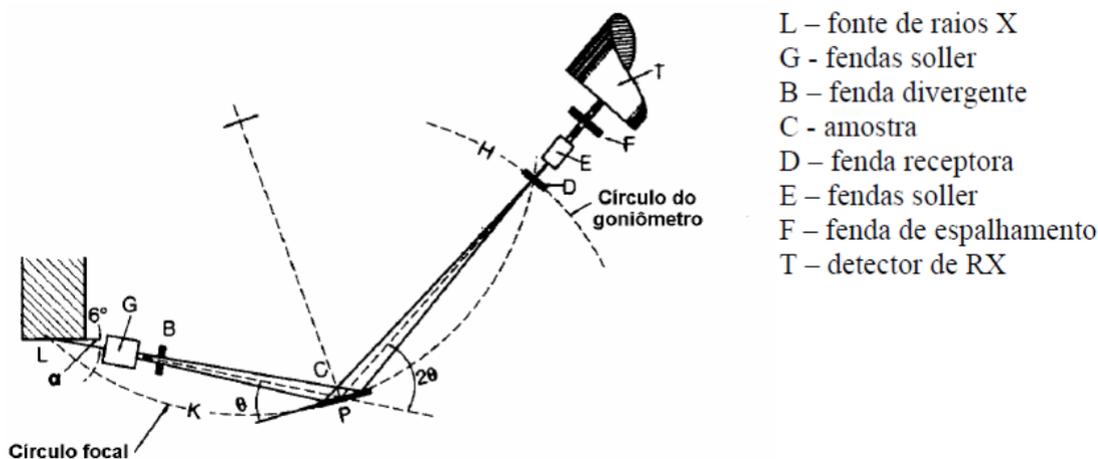
#### 4.4.2 Amostras Policristalinas

Pode-se definir o cristal como sendo um sólido composto por átomos arranjados em um padrão periódico tridimensional. Entretanto, para o polímero, o conceito de cristal e cristalinidade possui uma maior complexidade, pois a sua regularidade estrutural não é a mesma dos cristais possuindo, assim, uma desordem em seu interior [16, 57].

Um policristal é constituído por um conjunto de pequenos cristais orientados aleatoriamente onde todas as orientações possíveis são prováveis, ou seja, todos os valores de  $d_{hkl}$  poderão ser detectados. Para a coleta de dados de difração de raios X, o comprimento de onda ( $\lambda$ ) é previamente escolhido, as distâncias entre os planos cristalográficos ( $d_{hkl}$ ) dependem da estrutura do material e serão calculadas a partir das medidas experimentais do ângulo de difração ( $\theta$ ) [55, 60].

Utiliza-se o difratômetro de raios X como instrumento para a coleta de dados de amostras policristalinas, no qual a captação do feixe difratado é feita através de um dispositivo eletrônico que detecta e mede a intensidade desses feixes, cujo arranjo geométrico é denominado de geometria Bragg-Brentano. Para um equipamento que contém essa geometria, uma amostra plana é montada em um goniômetro (círculo sobre o qual estão as fontes de raios X e o detector) de dois eixos coplanares. Seu arranjo geométrico é basicamente constituído de um goniômetro horizontal ( $\theta - 2\theta$ ) ou vertical ( $\theta - 2\theta$  ou  $\theta - \theta$ ). A **Figura 4.8** representa uma geometria ( $\theta - 2\theta$ ), em que o goniômetro ( $H$ ) está acoplado aos acessórios de recepção do feixe difratado e move-se com velocidade angular ( $2\theta$ /passo) sobre o eixo  $P$  rotacionando a amostra ( $P$ ) com metade desta velocidade angular ( $\theta$ /passo). O raio do círculo do goniômetro, representado por  $H$ , é fixo e apresenta distâncias iguais do tubo gerador de raios X à amostra e da amostra à fenda de recepção ( $D$ ) ( $LP = PD$ ) [55, 58].

**Figura 4.8:** Reflexões de difratômetro de raios X com geometria Bragg-Brentano.

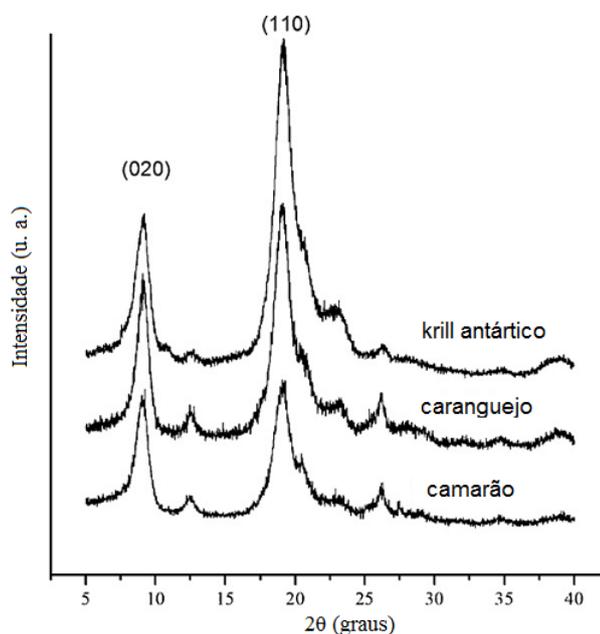


Fonte: Sanches (2011) [61].

Quando os raios X saem da fonte (L), eles passam por um conjunto de colimadores paralelos localizados em G, a fenda de divergência (B) irradia a superfície da amostra (C). Assim, os raios que foram difratados em um determinado ângulo  $2\theta$  convergem para a fenda de recepção localizada em D. Um segundo conjunto de colimadores (E) e uma fenda de espalhamento (F) podem ser colocados antes ou depois da fenda de recepção. Um monocromador do feixe difratado pode ser colocado após a fenda de recepção (D), o que possibilita a separação dos raios X de acordo com o comprimento de onda desejado. A amostra é girada em um ângulo  $\theta$  em relação ao feixe incidente, enquanto o detector é deslocado para a posição correspondente ao ângulo  $2\theta$ . Por fim, após o feixe atingir o detector, origina-se um sinal eletrônico que corresponde ao número de fótons difratados em função do ângulo de difração  $2\theta$  [55, 58].

Os dados de difração de raios X resultam em tabelas de  $2\theta$  vs  $I$  (intensidade) e gráficos correspondentes chamados de difratogramas. As contagens em cada posição angular  $2\theta$  são registradas em intervalos de tempo e de ângulo  $2\theta$ , o qual permite obter o padrão de difração da amostra. A intensidade ( $I$ ) do feixe difratado, em que varia em função do ângulo  $2\theta$ , é normalmente expressa através de picos que se destaca da linha de base (*background*) registrados em um espectro de intensidade pelo ângulo  $2\theta$  ou distância interatômica  $d$ . Tal intensidade corresponde à difração do feixe incidente por um determinado conjunto de planos do cristal, que possuem mesma distância interplanar, cada qual com índices de Miller  $hkl$  (reflexões  $hkl$ ), como mostra a **Figura 4.9**.

**Figura 4.9:** Difração de raios X da quitina contida nas amostras de krill antártico (*E. superba*), caranguejo (*C. opilio*) e camarão (*M. affinis*) e seus respectivos índices de Miller.



Fonte: Wang e colaboradores (modificado, 2013) [62].

Cada amostra apresenta um difratograma característico, onde se pode observar picos, reflexões individuais, posição angular e larguras que decaem gradualmente conforme ocorre o distanciamento da posição de altura máxima do pico. Desta forma, o padrão difratométrico evidencia a presença de regiões cristalinas (picos bem definidos) e não cristalinas (regiões difusas) em sua composição.

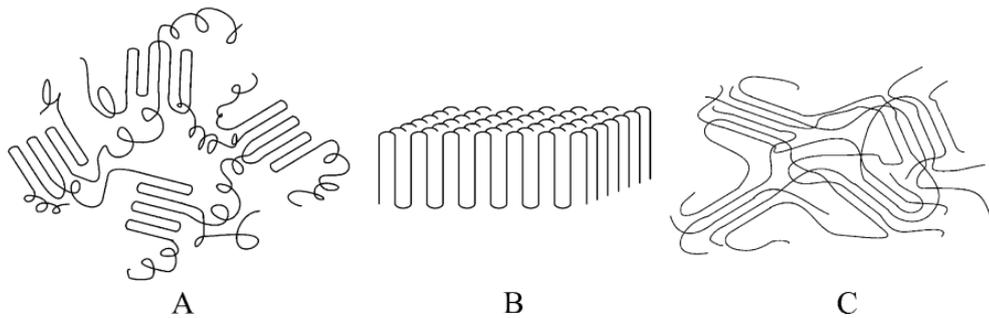
#### 4.4.3 Coleta de Dados

Os dados de DRX foram obtidos no Laboratório de Raios X do Grupo de Cristalografia – IFSC utilizando-se o difratômetro Rigaku RotaFlex – tubo com ânodo rotatório, operando com radiação  $\text{CuK}\alpha$ , 50 kV, 100 mA e equipado com monocromador de grafite. Os difratogramas de pó foram obtidos no modo de varredura contínua ( $2^\circ/\text{min}$  entre  $2\theta = 5 - 60^\circ$ ) e passo de  $0,02^\circ$  com 5 segundos/passos.

#### 4.4.4 Estimativa do Percentual de Cristalinidade

Os materiais poliméricos não são completamente cristalinos devido à sua composição, que apresenta cristais (lamelas) agregados a uma fase não cristalina, produzindo uma rede altamente interconectada (**Figura 4.10**) e agregando características particulares que determinam suas propriedades físicas [57].

**Figura 4.10:** Modelo de microestrutura de polímeros semicristalinos: (A) Cada cadeia pode percorrer várias regiões cristalinas e não cristalinas; (B) Modelo de um cristal de lamela (fortemente) dobrada e (C) Modelo de micela franjada.



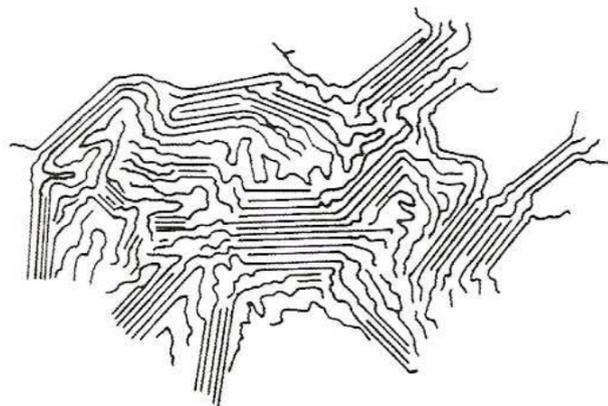
Fonte: De Rosa e Auriemma (2013) [57].

A análise estrutural de materiais poliméricos torna-se complicada por conta da sua morfologia complexa que consiste em regiões intermediárias, não cristalinas e cristalinas, e varia de acordo com o modo em que suas cadeias moleculares estão empacotadas, podendo ser ordenado, regular e repetitivo, caracterizando a fase cristalina; ou desordenado, formando a fase não cristalina. Assim, a cristalinidade em polímeros consiste no alinhamento de segmentos de cadeias em arranjo tridimensional. Tal característica é atribuída aos domínios cristalinos, chamados de cristalitos. Quanto maior for a presença desses pequenos cristais, maior será a sua cristalinidade [13, 57].

A técnica de DRX permitiu observar que muitos polímeros são parcialmente cristalinos. Diferentemente dos materiais cristalinos, como metais e sais inorgânicos, em que apresentam padrões bem definidos, os polímeros apresentam reflexões de Bragg largas e superpostas a um padrão difuso. A ocorrência de ambos os tipos de características é uma evidência de que as regiões ordenadas e desordenadas coexistem no mesmo material [12].

O primeiro modelo proposto para descrever esse tipo de característica é conhecido como modelo de micela franjada, mostrado na **Figura 4.11**. Uma vez que as cadeias poliméricas são longas, visualizam-se as moléculas passando sucessivamente por um número desses cristalitos e regiões não cristalinas. Este modelo explica de maneira razoável os efeitos da cristalinidade sobre as propriedades mecânicas e fornece uma interpretação simplificada do grau de cristalinidade em termos de percentagens de regiões ordenadas e não ordenadas. Porém, levando-se em consideração estudos mais recentes sobre materiais poliméricos, esse modelo deixou de ser seguido de uma forma geral, sendo utilizado basicamente para descrever a cristalinidade de materiais com baixos índices [12].

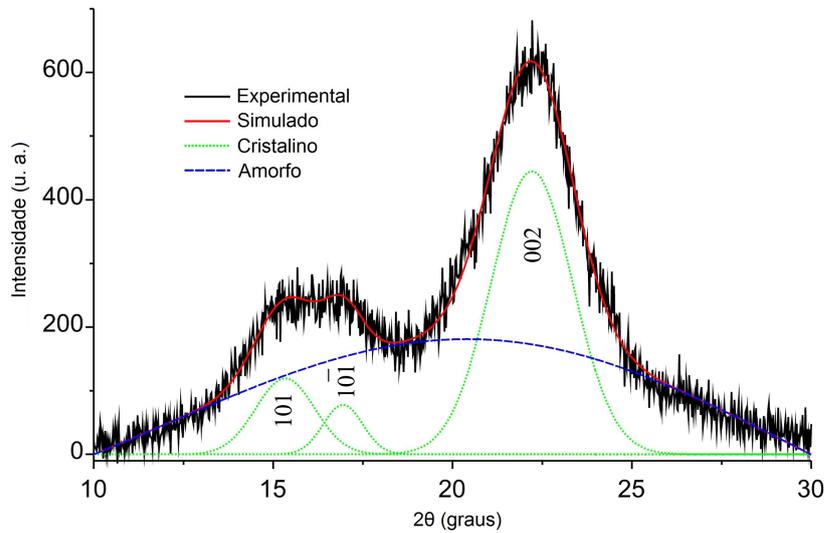
**Figura 4.11:** Modelo de micela franjada exibindo regiões ordenadas e não ordenadas.



Fonte: De Rosa e Auriemma (2013) [57].

O método de deconvolução é uma técnica utilizada para calcular as contribuições cristalinas e não cristalinas de determinado material. Tal método dispõe do ajuste de curvas e leva em consideração a forma, o número de picos e uma função apropriada a ser empregada para os ajustes. Uma hipótese que é levada em consideração refere-se à contribuição não cristalina do material para o alargamento dos picos. Entretanto, não somente a desordem cristalina pode favorecer o alargamento, mas também outros fatores, tais como o tamanho do cristalito e a tensão não uniforme do cristal. A **Figura 4.12** mostra a deconvolução de picos de DRX de uma amostra de celulose em que, para cada curva, há uma contribuição cristalina e não cristalina do material [63].

**Figura 4.12:** Estimativa do percentual cristalinidade de uma amostra de celulose através do método de deconvolução dos picos.



Fonte: Rambo e Ferreira (modificado, 2015) [64].

O programa *Peak Fitting Module* [65], incluso no programa *Microcal Origin* versão 7.5 [66] foi utilizado para a decomposição e determinação das áreas dos picos presentes nos difratogramas de Q, NaCMQD, NaCMQH, M-Q, M-CMQD e M-CMQH utilizando a função Gaussiana como função de ajuste. A determinação do percentual cristalino e não cristalino das amostras foi estimado através da razão entre as áreas dos picos cristalinos e a área de contribuição da fase não cristalina no difratograma, como mostra a equação abaixo:

$$C = 100 \cdot \frac{I_{cr\_pico1} + I_{cr\_pico2} + I_{cr\_pico3}}{I_{cr\_pico1} + I_{cr\_pico2} + I_{cr\_pico3} + I_{n\tilde{a}o\_cr}} [\%] \quad (4.3)$$

onde  $C$  representa o percentual cristalino estimado [%],  $I_{cr\_pico1}$ ,  $I_{cr\_pico2}$  e  $I_{cr\_pico3}$  representam as áreas abaixo de cada pico cristalino correspondente e  $I_{n\tilde{a}o\_cr}$  é a área abaixo do pico não cristalino.

#### 4.4.5 MÉTODO DE LE BAIL

O método de refinamento estrutural permite determinar o melhor ajuste teórico (calculado) para um perfil de difração de raios X obtido experimentalmente (observado). Tal ajuste é feito através do método de mínimos quadrados. Para isso, há a necessidade de ter um conhecimento prévio razoável a respeito de alguns parâmetros relacionados com a estrutura do material a ser estudado, tais como os parâmetros de cela  $a$ ,  $b$  e  $c$  e qual a geometria que apresenta (cúbica, monoclínica, triclínica etc) [67].

Neste trabalho, a ferramenta utilizada para o refinamento estrutural foi o programa computacional FullProf [68], que foi desenvolvido principalmente para análise de Rietveld [69]. Entretanto, é utilizado para a aplicação do método proposto por Le Bail [70].

#### 4.4.6 Método dos Mínimos Quadrados

Para determinar o melhor ajuste entre um padrão de difração adequado (modelo teórico) e um difratograma experimental, utiliza-se o Método dos Mínimos Quadrados. A diferença entre ambos (teórico e experimental) é minimizada através da soma do quadrado da diferença entre a intensidade observada  $y_{(obs)i}$  e a intensidade calculada  $y_{(calc)i}$ . Para cada medida, atribui-se um peso que é inversamente proporcional ao quadrado do desvio padrão estimado [71].

Por meio do ajuste, calcula-se a intensidade  $y_{(calc)i}$  para cada um dos  $n$  pontos presentes no difratograma obtido experimentalmente, a qual é comparada com a intensidade observada  $y_{(obs)i}$ . Para cada ciclo de interação, o Ajuste Le Bail varia os parâmetros considerados de maneira em que o quadrado da diferença entre as intensidades  $y_{(obs)i}$  e  $y_{(calc)i}$  possa atingir um valor mínimo. A função de minimização,  $M$ , é:

$$M = \sum_i w_i (y_{(obs)i} - y_{(calc)i})^2 \quad (4.4)$$

onde:

$i$  corresponde a cada ponto medido;

$w_i$  é peso de cada intensidade do perfil, visto que é inversamente proporcional ao quadrado do desvio padrão estimado:  $w_i = 1/y_i^2$ ;

$y_{(obs)i}$  é a intensidade observada no ponto  $i$  do perfil;

$y_{(calc)i}$  é a intensidade calculada na posição  $i$  do perfil.

No momento em que os parâmetros não variam mais e a função de minimização atingiu o seu valor mínimo, pode-se dizer que o ajuste apresentou convergência. Os parâmetros refinados são acompanhados por meio dos índices calculados ao final de cada ciclo de interação, chamados fatores de discordância. Tais fatores fornecem informações acerca da qualidade do ajuste, permitindo a avaliação crítica dos dados obtidos [71, 72].

#### 4.4.7 Fatores de discordância (*R-Values*)

Para avaliar a evolução e a qualidade do ajuste do difratograma, utilizam-se alguns parâmetros que permitem acompanhar, a cada ciclo, o refinamento que está sendo realizado e, assim, definir o momento em que ele pode ser finalizado. Tais parâmetros são chamados de Fatores de Discordância (ou *R-Values*). Através do programa *FullProf*, calcula-se dois tipos de conjuntos de índices [72], sendo que  $y_i$  é a intensidade observada (experimental) e  $y_{c,i}$  é a intensidade calculada (teórico), ambas no ponto  $2\theta_i$ :

1)  $n$  é o número total de pontos utilizados no refinamento (número total de pontos do difratograma observado, menos o número de pontos excluídos):

i. *Profile Factor*:

$$R_p = 100 \frac{\sum_{i=1}^n |y_i - y_{c,i}|}{\sum_{i=1}^n y_i} \quad (4.5)$$

ii. *Weighted Profile Factor*:

$$R_{wp} = 100 \left[ \frac{\sum_{i=1}^n w_i |y_i - y_{c,i}|^2}{\sum_{i=1}^n w_i y_i^2} \right]^{1/2} \quad (4.6)$$

iii. *Expected Weighted Profile Factor*:

$$R_{exp} = 100 \left[ \frac{n-p}{\sum_{i=1}^n w_i y_i^2} \right]^{1/2} \quad (4.7)$$

iv. *Goodness of Fit Indicator*:

$$S = \frac{R_{wp}}{R_{exp}} \quad (4.8)$$

v. *Reduced Chi-square*:

$$\chi_v^2 = \left[ \frac{R_{wp}}{R_{exp}} \right]^2 = S^2 \quad (4.9)$$

2) Apenas os pontos com contribuições de Bragg são considerados e tais índices estão relacionados à estrutura cristalina do material:

i *Bragg Factor*:

$$R_B = 100 \frac{\sum_h |I_{(obs)_h} - I_{(calc)_h}|}{\sum_h |I_{(obs)_h}|} \quad (4.10)$$

ii *Crystallographic  $R_F$ -Factor*:

$$R_F = 100 \frac{\sum_h |F_{(obs)_h} - F_{(calc)_h}|}{\sum_h |F_{(obs)_h}|} \quad (4.11)$$

Tais fatores de discordância não refletem de fato a qualidade de um bom ajuste, pois os mesmos são essencialmente numéricos. Por isso, faz-se necessário haver uma análise crítica, com visões de física e química, para que se possa concluir melhor os dados refinados obtidos.

#### 4.4.8 Análise microestrutural

A função de ajuste de perfil, *pseudo-Voigt* modificada por Thompson-Cox-Hasting (*pV-TCHZ*), foi utilizada no Programa *FullProf* para analisar o efeitos da microestrutura do material [73]. Tal função permite determinar o tamanho de cristalito e a microdeformação isotrópica. O Programa *FullProf* dispõe de outras funções de ajuste de perfil, entretanto, para a aplicação polímeros semicristalinos que possuem baixa cristalinidade devido aos picos alargados, como é o caso da quitosana e a carboximetilquitosana, a função de ajuste *pV-TCHZ* é comumente utilizada [61, 74].

A função *pV-TCHZ* apresenta dois modelos de anisotropia. O primeiro está associado ao ajuste dos alargamentos decorrentes dos tamanhos dos cristalitos; o segundo está vinculado ao ajuste dos alargamentos devido aos efeitos da microdeformação da rede [74, 75]. Para os alargamentos dos picos à meia altura, as contribuições Gaussianas e Lorentzianas são dadas, respectivamente, por:

$$(2W_g)^2 = [U + (1 - \zeta)^2 D_{ST}^2] \tan^2 \theta + V \tan \theta + \frac{I_G}{\cos^2 \theta} \quad (4.12)$$

$$2W_L = [X + \zeta D_{ST}(a_D)] \tan \theta + \frac{[Y + F(a_Z)]}{\cos \theta} \quad (4.13)$$

onde:

$V$  e  $W$  são parâmetros associados aos alargamentos das reflexões devido às características do equipamento;

$U$  e  $X$  são parâmetros associados às microdeformações da cela unitária;

$Y$ ,  $I_G$  e  $a_Z$  são termos dependentes dos tamanhos dos cristalitos;

$D_{ST}(a_D)$  e  $F(a_Z)$  são funções em que, dependendo do modelo utilizado para representar as microdeformações de rede e anisotropias de tamanho de cristalitos, pode ser apresentadas de diferentes maneiras;

$\zeta$  é um parâmetro que fornece a medida da contribuição Lorentziana dos alargamentos anisotrópicos % provenientes dos efeitos da microdeformação.

A expansão dos coeficientes harmônicos esféricos (*SPH*) é um modelo usado para descrever os alargamentos anisotrópicos provenientes dos tamanhos dos cristali-

tos com a função *TCHZ* [61, 74]. A sua fórmula é dada explicitamente por:

$$\beta_h = \frac{\lambda}{\cos \theta} \sum_{l,l} a_{l,m} Y_{l,m}(\Theta_h, \Phi_h) \quad (4.14)$$

onde  $\beta_h$  é a contribuição de tamanho para largura integral da reflexão  $h$  e  $Y_{l,m}(\Theta_h, \Phi_h)$  são os harmônicos esféricos dados por:

$$Y_{l,m} = \sqrt{\frac{2l+1}{4\pi} \frac{(l-m)!}{(l+m)!}} P_l \cos(\Theta_h) e^{im\Phi_h} \quad (4.15)$$

Após o refinamento dos coeficientes  $a_{l,m}$ , o programa *FullProf* calcula o tamanho do cristalito (em Ångstrons) ao longo de cada vetor do espaço recíproco se o arquivo *.irf* for fornecido separadamente e, sendo assim, será gerado um arquivo contendo informações microestruturais (*.mic*) contendo a análise da contribuição do tamanho do cristalito e da tensão residual a cada reflexão é descrita [75].

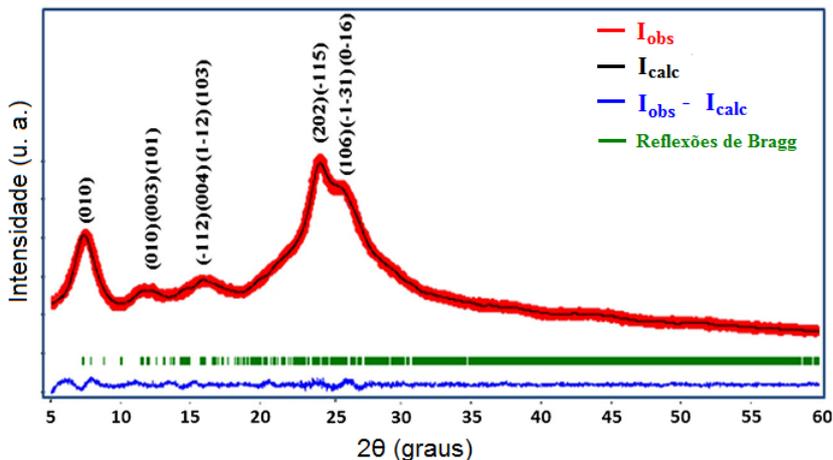
#### 4.4.9 Coleta e tratamento de dados

Os dados de DRX foram utilizados para efetuar o ajuste Le Bail através do pacote de Programa *FullProf* [76], no ambiente *WinPlotr* [77], que utiliza as medidas de DRX de um difratograma experimental (ou observado) e dados fornecidos de modelos teóricos que disponibilizam informações como grupo espacial, valores razoáveis da cela unitária e parâmetros instrumentais. Tal ajuste é conduzido admitindo-se a hipótese de que as reflexões que contribuem para o perfil podem ser simuladas com a função de perfil selecionada. A **Figura 4.13** mostra um exemplo de refinamento finalizado, evidenciando as curvas experimental e teórica, a diferença entre elas, e as reflexões de Bragg.

Utilizou-se a função de perfil *pseudo-Voigt* modificada por Thompson-Cox-Hastings (*pV-TCH*) [73]. Os parâmetros que constituem a função de resolução instrumental ( $U, V, W$ ) foram obtidos através de um padrão de hexaborato de lantânio,  $\text{La}_6\text{B}_6$ . O tamanho dos cristalitos foi determinado anisotropicamente em termos de esféricos harmônicos. Os mapas de visualização dos cristalitos foram obtidas através do pro-

grama *GFourier* [78].

**Figura 4.13:** Refinamento final da Poli(*o*-etoxianilina) na forma sal de esmeraldina, onde a curva em vermelho indica os dados obtidos experimentalmente, a linha preta é o modelo teórico calculado, em azul representa a diferença entre os dados experimental e teórico (qualidade do refinamento) e as reflexões de Bragg estão representadas pelas linhas em verde.



Fonte: Silva e colaboradores (modificado, 2014) [79].

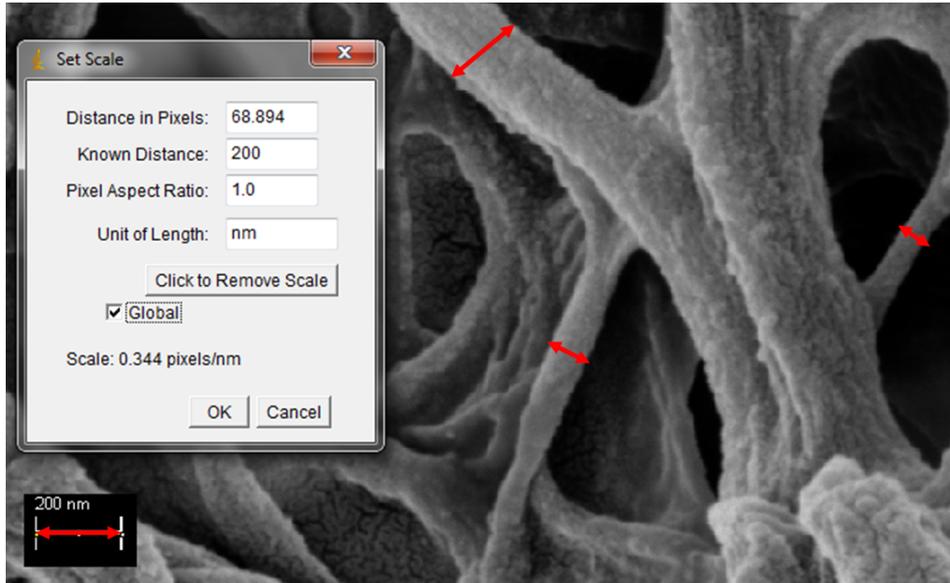
## 4.5 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

Através das imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura foi possível obter um panorama geral da morfologia presente em cada amostra. Adicionalmente, as imagens de microscopia foram analisadas através do programa *Image J*. Inicialmente, calibrou-se cada imagem através da função “*Straight line selections*”, onde o padrão considerado foi a barra de escala fornecida na micrografia. Para cada imagem com escala diferente, fez-se o procedimento anterior. Assim, 100 medidas de espessura das fibras das membranas (M-Q, M-CMQD e M-CMQH) foram realizadas utilizando a barra de escala como referência. Em seguida, criou-se um histograma (frequência *vs* comprimento) para classificar os comprimentos mais frequentes na micrografia da membranas.

A **Figura 4.14** abaixo mostra como foi feita a equivalência de pixels por unidade de comprimento utilizando a linha em vermelho (pertencente à opção “*Straight*

*line selections*”) que foi colocada em cima da barra de escala da micrografia e, assim, realizar a contagem das espessuras das membranas.

**Figura 4.14:** Exemplo de medição de espessura das fibras utilizando o programa ImageJ.



Fonte: Elaboração própria.

Utilizou-se a função Gaussiana para expressar a distribuição das medidas obtidas para cada histograma e é dada pela seguinte equação:

$$F(x) = \frac{1}{w\sqrt{\frac{\pi}{2}}} \exp\left[\frac{-2(x-x_0)^2}{w^2}\right] \quad (4.16)$$

onde:  $w = 2\sigma$ ,  $\sigma$  é o desvio padrão,  $x$  representa um valor dos resultados possíveis da observação e  $x_0$  é a média (centro da distribuição). A dispersão dos dados obtidos devido ao processo de medida das espessuras das membranas é dada pelo desvio padrão:

$$\sigma = \left[ \frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2 \right]^{1/2} \quad (4.17)$$

onde  $n$  é o número total de espessuras medidas,  $X_i$  representa as várias medidas obtidas e  $\bar{X}$  é a média da amostra [80].

As imagens de microscopia foram obtidas utilizando-se o Microscópio Eletrônico de Varredura da marca Carl Zeiss, modelo Supra 35 (3,0 kV) existente no Instituto de Física de São Carlos (IFSC – USP).

#### 4.6 ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA (TGA)

A análise térmica é um conjunto de métodos para medição de alguma propriedade da amostra a ser investigada enquanto a mesma é submetida a uma variação de temperatura ao longo de determinado tempo [81]. Dentre as diversas técnicas termoanalíticas, a termogravimetria foi empregada para analisar as amostras na forma de pó (Q, NaCMQH e NaCMQD) e na forma de membrana (M-Q, M-CMQH e M-CMQD). A propriedade analisada nessa técnica é a massa da amostra, ou seja, a variação que ela apresenta quando submetida a alterações de temperatura.

Para a coleta de dados, utilizou-se atmosfera dinâmica de ar sintético (20% O<sub>2</sub> e 80% N<sub>2</sub>) a uma vazão de 20 mL·min<sup>-1</sup> em um porta amostra de platina. As amostras foram aquecidas a uma razão de 10 °C·min<sup>-1</sup>, desde 25 °C até 110 °C (permanecendo a 110 °C durante 10 min), e de 110 °C até 800 °C (permanecendo a 800 °C por 5 min). As massas de pó e membrana foram 8 mg e 4 mg, respectivamente. As amostras analisadas foram previamente armazenadas em um dessecador contendo sílica gel durante 15 dias. O equipamento utilizado para realizar a coleta de dados foi o TGA-50, da SHIMADZU, disponível no Instituto de Química de São Carlos (IQSC–USP).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE CARBONO 13 (RMN $^{13}\text{C}$ )

A caracterização das amostras de NaCMQD e NaCMQH através da técnica de RMN  $^{13}\text{C}$  permitiu analisar e interpretar os espectros obtidos para, enfim, identificar as características estruturais dessas amostras, bem como determinar o grau médio de acetilação ( $\overline{GA}$ ) e o grau médio de substituição ( $\overline{GS}$ ) dos grupos carboximetila presentes nas amostras NaCMQD e NaCMQH.

O grau médio de acetilação ( $\overline{GA}$ ) visa determinar a porcentagem de acetila ( $-\text{COCH}_3$ ) presente na estrutura, pois a mesma pode ser tratada com um indicador de solubilidade, por exemplo [24, 25, 82]. O grau médio de substituição ( $\overline{GS}$ ) refere-se à introdução dos grupos carboximetila ( $-\text{CH}_2\text{COOH}$ ) em 6-O-, 3-O- e 2-N- nas estruturas das carboximetilquitosanas.

Na **Figura 5.1** e **Figura 5.2**, tem-se os espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  para as amostras de NaCMQD e NaCMQH, onde o C-1 foi tomado como padrão 100% por estar mais bem definido em relação aos outros picos. A partir dele, obteve-se a deconvolução e integração dos sinais de  $^{13}\text{C}$  para o cálculo do grau médio de acetilação e substituição.

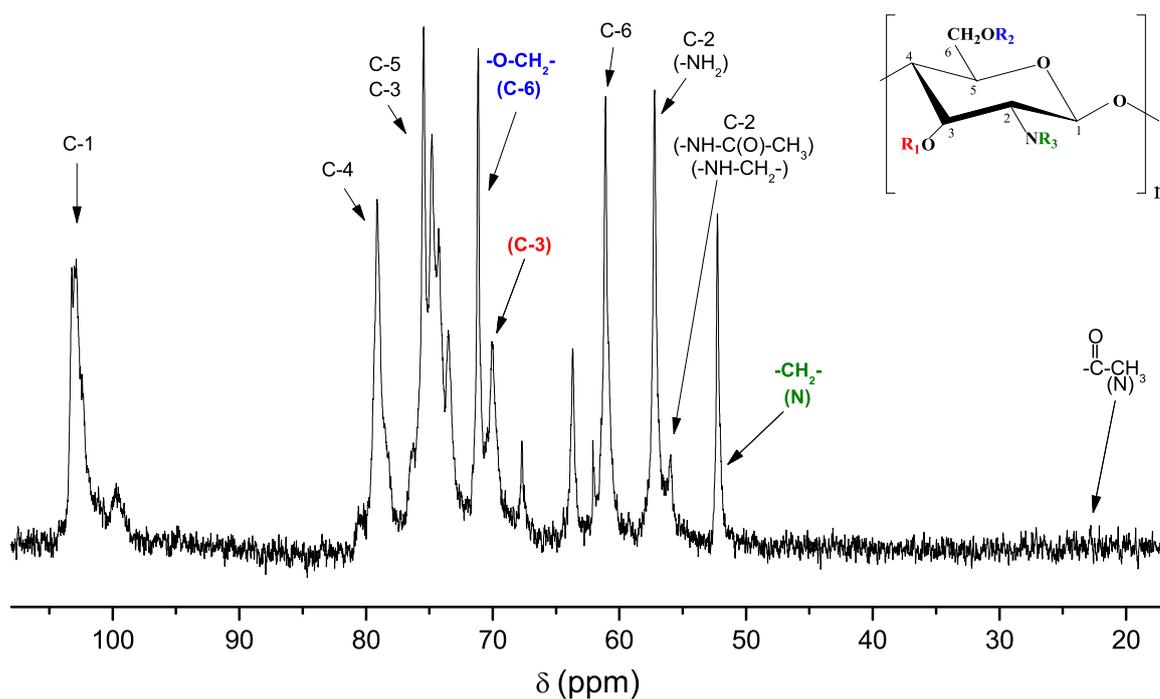
Os sinais característicos do grupo acetila ( $-\text{COCH}_3$ ) apresentaram ressonância na região entre 20,00 e 25,00 ppm, o que está dentro do intervalo esperado de deslocamento químico para os espectros de carboximetilquitosanas, de acordo com Rinaudo e colaboradores (1992) [53], Silverstein, Webster e Kiemle (1994) [83], Abreu e Campana-Filho (2005) [84] e Tao e colaboradores (2013) [85]. Em **Tabela 5.1** e **Tabela 5.3**, tem-se as regiões onde se encontram os grupos de carbono, baseadas nos espectros obtidos.

#### 5.1.1 RMN $^{13}\text{C}$ para NaCMQD

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  obtido para a amostra NaCMQD está representado na **Figura 5.1**, onde cada cor ilustrada no espectro corresponde ao radical em que o

carbono e nitrogênio estão posicionados na estrutura molecular indicada no canto superior direito na mesma figura, sendo que esses radicais ( $R_1$ ,  $R_2$  e  $R_3$ ) são os sítios reativos da carboximetilquitosana.

**Figura 5.1:** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  da amostra NaCMQD com concentração polimérica de 100 mg/1 mL  $\text{D}_2\text{O}$  a 80 °C.



Fonte: Elaboração própria.

Na **Tabela 5.1** tem-se os carbonos da estrutura da amostra NaCMQD e seus respectivos deslocamentos químicos, onde utilizou-se o C-1, mostrado na **Figura 5.1**, como padrão 100% para calcular a integração dos sinais de outros carbonos presentes na estrutura da carboximetilquitosana sódica.

**Tabela 5.1:** Deslocamento químico e grau de substituição  $\overline{GS}$  para a amostra NaCMQD

$^{13}\text{C}$	C-1	C-3 C-4 C-5	C-6 (-CH <sub>2</sub> -)	C-3 (-CH <sub>2</sub> -)	C-2 (-NH <sub>2</sub> )	C-2 (-NH-CH <sub>2</sub> -) (-NH-C(O) -CH <sub>3</sub> )	N (-CH <sub>2</sub> -)	N (-C(O) -CH <sub>3</sub> )
$\delta$ ppm	98-103	72-81	71,18	70,40	57,09	54-56,5	51,65	22,9
Integral (%)	100	285,20	<b>49,33</b>	<b>64,31</b>	63,46	20,54	<b>29,95</b>	<b>4,49</b>

Fonte: Elaboração própria.

Através do C-3, C-6 e nitrogênios, pôde-se determinar a porcentagem de carboximetilação na amostra NaCMQD (ver **Tabela 5.2**), bem como o seu grau de acetilação.

**Tabela 5.2:** Grau de substituição e carboximetilação total da amostra NaCMQD

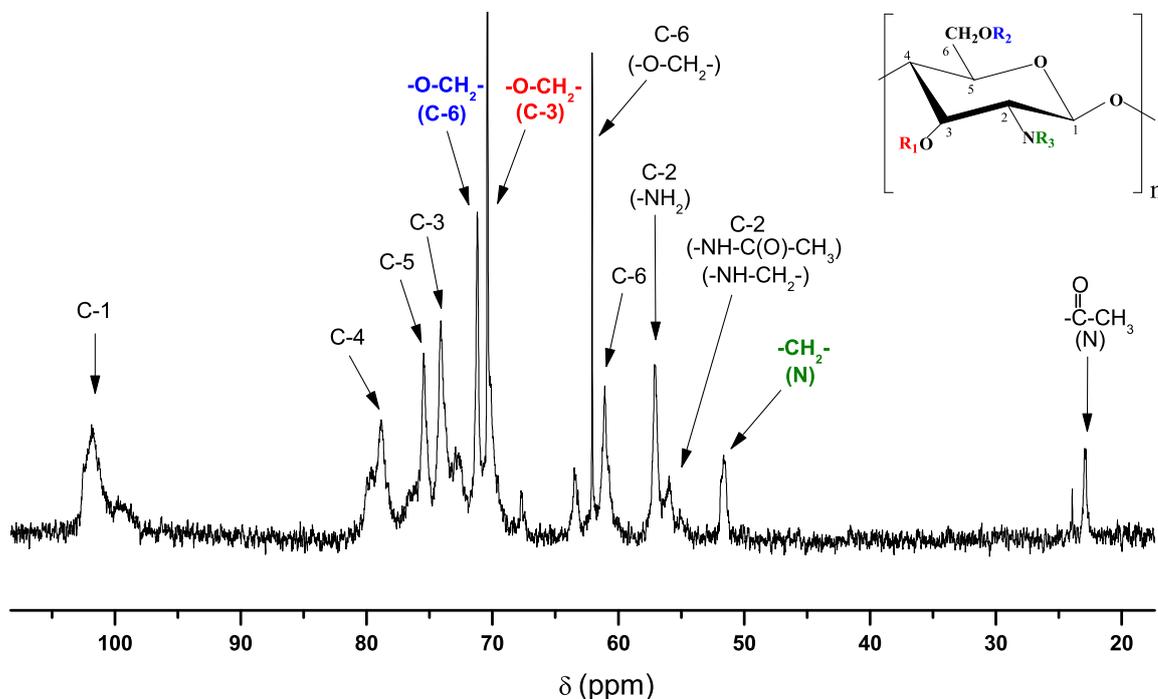
Posição	$\delta$ ppm	Grau de Substituição (%)
Acetilação	22,9	4,5
C-3	70,40	64,3
C-6	71,18	49,3
N	51,61	30,0
Carboximetilação Total	–	<b>143,6</b>

Fonte: Elaboração própria.

### 5.1.2 RMN $^{13}\text{C}$ para NaCMQH

Para a amostra NaCMQH, o espectro obtido está representado na **Figura 5.2**, no qual o posicionamento dos carbonos está ilustrado de acordo com a cor e numeração referentes à estrutura molecular localizada no canto superior direito da mesma figura. Já na **Tabela 5.3**, tem-se os deslocamentos químicos dos respectivos carbonos e nitrogênios responsáveis pela carboximetilação total do polímero, assim como o seu grau de acetilação.

**Figura 5.2:** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  da amostra NaCMQH com concentração polimérica de 100 mg/1 mL  $\text{D}_2\text{O}$  a 80 °C.



Fonte: Elaboração própria.

**Tabela 5.3:** Deslocamento químico e grau de substituição  $\overline{GS}$  para a amostra NaCMQH

$^{13}\text{C}$	C-1	C-3 C-4 C-5	C-6 (-CH <sub>2</sub> -)	C-3 (-CH <sub>2</sub> -)	C-2 (-NH <sub>2</sub> )	C-2 (-NH-CH <sub>2</sub> -) (-NH-C(O)- -CH <sub>3</sub> )	N (-CH <sub>2</sub> -)	N (-C(O) -CH <sub>3</sub> )
$\delta$ ppm	98-103	72-81	71,18	70,40	57,09	54-56,5	51,65	22,9
Integral (%)	100	298,9	69,9	80,9	55,7	35,6	17,3	17,1

Fonte: Elaboração própria.

Da mesma forma executada para a amostra NaCMQD, utilizou-se C-1 como padrão de 100% para a integração dos sinais de  $^{13}\text{C}$ . Assim, o grau de acetilação e o grau de substituição para os radicais  $\text{R}_1$ ,  $\text{R}_2$  e  $\text{R}_3$  são mostrados na **Tabela 5.4:**

**Tabela 5.4:** Grau de substituição e carboximetilação total da amostra NaCMQH

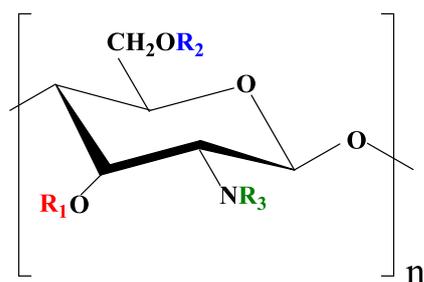
Posição	$\delta$ ppm	Grau de Substituição (%)
Acetilação	22,9	17,1
C-3	70,40	80,9
C-6	71,18	69,9
N	51,61	17,3
Carboximetilação Total	-	<b>168,1</b>

Fonte: Elaboração própria.

### 5.1.3 Determinação da Estrutura Molecular das Amostras NaCMQD e NaCMQH

A partir dos resultados de padrão de substituição das carboximetilquitosanas (Tabela 5.2 e Tabela 5.4), pôde-se definir a porcentagem dos radicais  $R_1$ ,  $R_2$  e  $R_3$  presentes em suas estruturas, como mostra a Figura 5.3.

**Figura 5.3:** Unidade de repetição da carboximetilquitosana sugerindo onde os possíveis radicais estão localizados no monômero.



Fonte: Elaboração própria.

De acordo com o padrão de substituição apresentado na Tabela 5.2, atribuiu-se uma porcentagem para cada radical da amostra NaCMQD.

**Tabela 5.5:** Estimativa da presença dos radicais  $-H$ ,  $-CH_2C(O)O^-Na^+$  e  $-C(O)CH_3$  na amostra NaCMQD

	$-H$	$-CH_2C(O)O^-Na^+$	$-C(O)CH_3$
$R_1$	35,7%	64,3%	–
$R_2$	50,7%	49,3%	–
$R_3$	65,5 %	30,0%	4,5%

Fonte: Elaboração própria.

Da mesma forma, fez-se para a amostra de NaCMQH baseado na **Tabela 5.4:**

**Tabela 5.6:** Estimativa da presença dos radicais  $-H$ ,  $-CH_2C(O)O^-Na^+$  e  $-C(O)CH_3$  na amostra NaCMQH

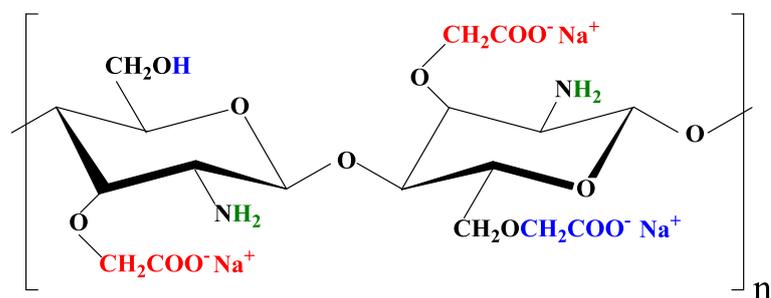
	$-H$	$-CH_2C(O)O^-Na^+$	$-C(O)CH_3$
$R_1$	19,1%	80,9%	–
$R_2$	30,1%	69,9%	–
$R_3$	65,6 %	17,3%	17,1%

Fonte: Elaboração própria.

Somente  $R_3$  é o sítio reativo que pode conter a acetila  $-COCH_3$ , já que a desacetilação da quitina não é total. Sendo assim, ao realizar a carboximetilação da quitosana, a acetila pode estar presente na estrutura da carboximetilquitosana. Com isso, pode-se propor uma estrutura molecular das duas carboximetilquitosanas baseadas nos dados obtidos por RMN, levando em consideração os radicais que presentes em maior quantidade nos respectivos monômeros. Tal representação influenciou diretamente na determinação dos parâmetros de cela desses polímeros (como será observado mais adiante), assim como em seu percentual de cristalinidade.

A estrutura proposta, baseando-se nos espectros de RMN  $^{13}C$  obtidos, para a NaCMQD é dada pelos monômeros da **Figura 5.4** e **Figura 5.5**.

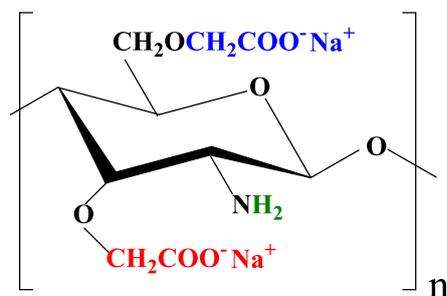
Figura 5.4: Estrutura proposta para o monômero da amostra NaCMQD.



Fonte: Elaboração própria.

De acordo com a Tabela 5.6, o monômero proposto para a amostra NaCMQH fica:

Figura 5.5: Estrutura proposta para o monômero da amostra NaCMQH.



Fonte: Elaboração própria.

Foi proposto um modelo diferente para cada tipo de amostra, de acordo com o percentual de grupos laterais presentes. Considerando que, para cada radical analisado ( $R_1$ ,  $R_2$  e  $R_3$ ) havia duas possibilidades de substituição, foram selecionadas as opções que se apresentam em maior percentual segundo os dados de RMN.

No caso da NaCMQD, os grupos laterais possíveis para  $R_2$  (H e  $\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{O}^- \text{Na}^+$ ) apresentam percentuais muito próximos, em torno de 50% cada. Por

isso, foi sugerido que o monômero desta cadeia polimérica apresentasse composição de duas unidades distintas, como mostrado na **Figura 5.4**, já que estes radicais estão em percentuais praticamente iguais nas cadeias. No entanto, para os radicais  $R_1$  e  $R_3$ , foi possível manter uma única opção para cada um destes radicais, pois as diferenças em percentual para cada um deles é muito discrepante.

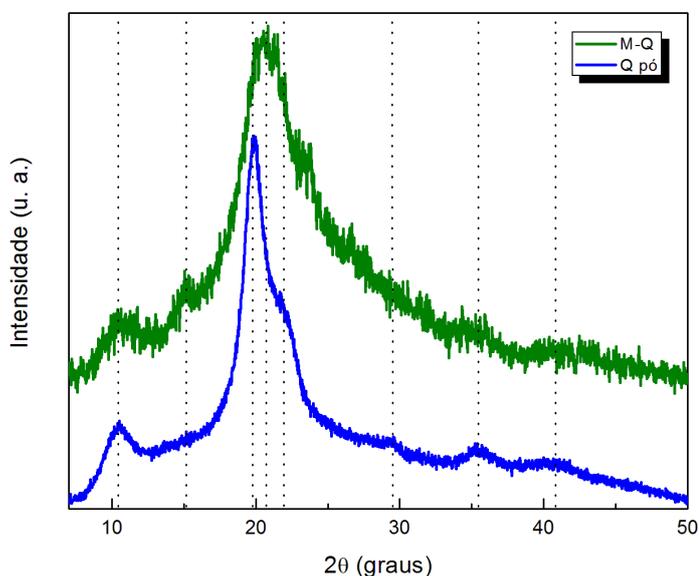
Já no caso da NaCMQH, as opções de grupos laterais para os radicais  $R_1$ ,  $R_2$  e  $R_3$  foram muito distintas quantitativamente, sendo possível propor um monômero com apenas uma estrutura molecular, como mostrado na **Figura 5.5**.

## 5.2 ANÁLISE POR DRX E ESTIMATIVA DO PERCENTUAL DE CRISTALINIDADE

### 5.2.1 Análise por DRX

A técnica de DRX foi aplicada às amostras em pó e em membranas a fim de avaliar se ocorrem mudanças estruturais quando as amostras em pó foram utilizadas para a síntese de suas respectivas membranas. A **Figura 5.6** mostra os difratogramas obtidos para as amostras de quitosana em pó (Q) e membrana de quitosana (M-Q). O perfil de difração da amostra Q apresentou picos em  $2\theta = 10,4; 19,8; 22,2; 29,6; 35,3$  e  $40,9^\circ$ , enquanto a amostra M-Q apresentou picos em  $2\theta = 10,4^\circ$  e  $15,1^\circ$ ; entre  $2\theta = 19,8^\circ$  e  $35,3^\circ$ ; e entre  $2\theta = 38,6^\circ$  e  $44,5^\circ$ .

**Figura 5.6:** Difratomogramas das amostras de quitosana em pó e membrana com as localizações dos seus respectivos picos.

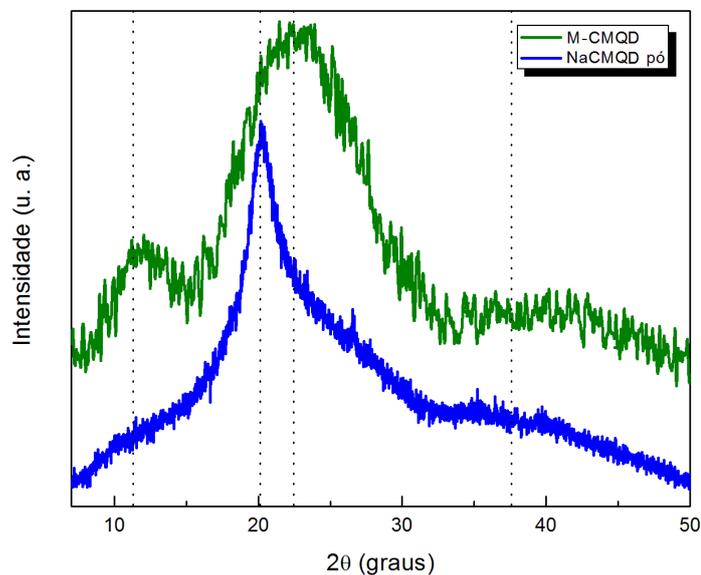


Fonte: Elaboração própria.

O difratograma da amostra Q apresentou picos mais bem definidos em relação à amostra M-Q. Tal comportamento está relacionado com a cristalinidade intrínseca de cada amostra. Como a produção da membrana de quitosana envolveu a diluição de Q em uma solução de ácido acético seguido de secagem por liofilização, podemos esperar mudanças estruturais na membrana. Com isso, a disposição/tamanho das cadeias poliméricas da quitosana em pó pode ter sido alterada para a produção da respectiva membrana. Tal procedimento refletiu diretamente na cristalinidade das amostras, embora o perfil de DRX da M-Q ainda se mantenha similar ao perfil da Q.

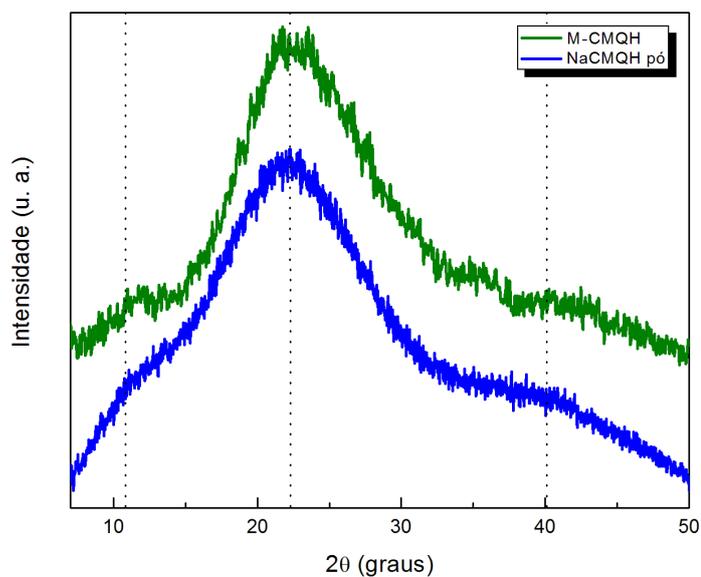
A **Figura 5.7** mostra os difratogramas obtidos para as amostras de NaCMQD e M-CMQD. O difratograma de NaCMQD apresentou picos localizados entre  $2\theta = 8,9^\circ$  e  $13,2^\circ$ ;  $2\theta = 20,1^\circ$  e entre  $2\theta = 33,2^\circ$  e  $42,2^\circ$ . Observou-se que a amostra NaCMQD possui apenas um pico bem definido localizado em  $2\theta = 20,1^\circ$ . Para a amostra M-CMQD, os picos estão localizados entre  $2\theta = 10,3^\circ$  e  $13,7^\circ$ ;  $2\theta = 19,8^\circ$  e  $25,7^\circ$ ;  $2\theta = 37,8^\circ$  e  $45,1^\circ$ . Em comparação com a NaCMQD, a amostra de M-CMQD apresentou um alargamento do pico localizado  $2\theta = 20,1^\circ$ , sendo este deslocado para a região entre  $2\theta = 19,8^\circ$  e  $25,7^\circ$  no caso da membrana. Tal alargamento pode estar relacionado ao aumento da contribuição não cristalina e ao tamanho menor dos cristalitos desse polímero, como será discutido mais adiante.

**Figura 5.7:** Difratomogramas das amostras de carboximetilquitosana sódica da Dayang em pó (NaCMQD) e membrana (M-CMQD) com as localizações dos seus respectivos picos.



Fonte: Elaboração própria.

**Figura 5.8:** Difratomogramas das amostras de carboximetilquitosana sódica da Heppe em pó (NaCMQH) e membrana (M-CMQH) com as localizações dos seus respectivos picos.



Fonte: Elaboração própria.

Pôde-se observar na **Figura 5.8** que os dois perfis (NaCMQH e M-CMQH) são semelhantes. Os difratogramas não possuem picos bem definidos, apenas picos alar-

gados localizados entre  $2\theta = 8,9^\circ$  e  $13,3^\circ$ ;  $2\theta = 17,6^\circ$  e  $26,4^\circ$ ;  $2\theta = 35,0^\circ$  e  $43,1^\circ$ . Tal característica pode ser atribuída ao grau elevado de desordem desse polímero, contribuindo para a diminuição da sua cristalinidade.

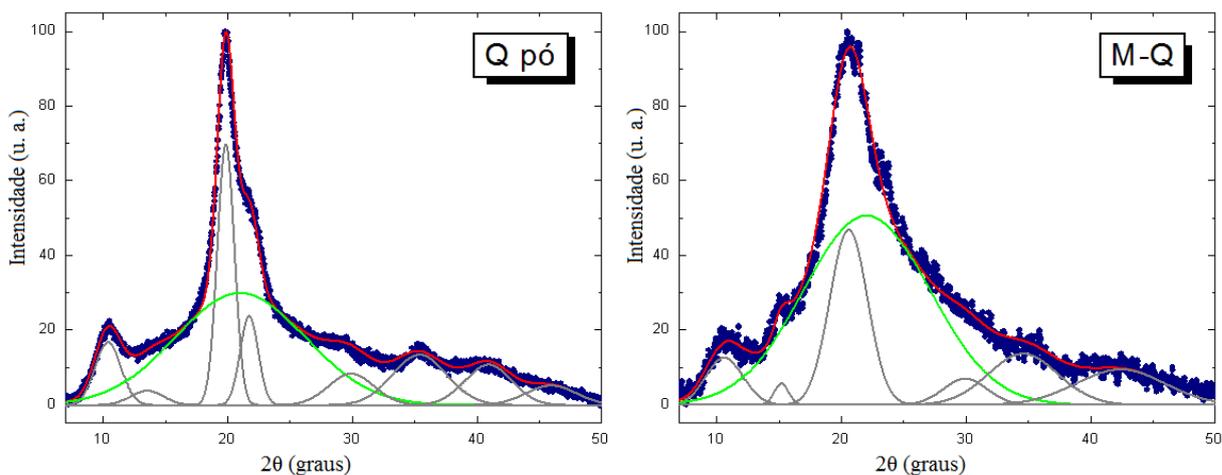
### 5.2.2 Estimativa do Percentual de Cristalinidade

Para a estimativa do percentual de cristalinidade das amostras em pó e membranas, assumiu-se que tais polímeros semicristalinos são constituídos por uma mistura de regiões não cristalinas e cristalinas bem definidas, e as contribuições cristalinas e não cristalinas de cada amostra foram calculadas a partir do método de deconvolução das áreas, como mostrado na **Figura 4.12** utilizando o programa *Peak Fitting Module* [65], incluso no programa *Microcal Origin* versão 7.5 [13, 63, 66].

A quitosana é um material semicristalino, sua morfologia apresenta características de polimorfismo já mencionadas na literatura [86, 87, 88, 89, 90, 91]. Entre outras características, a sua cristalinidade pode variar de acordo com alguns parâmetros, tais como o grau de desacetilação, o pH da solução, o método empregado para secagem, entre outros [92].

Para a decomposição das áreas dos picos na amostra Q, foram considerados nove picos distintos, como mostra a **Figura 5.9**. Os pontos em azul representam o difratograma obtido experimentalmente por DRX, a linha vermelha representa o ajuste realizado através do programa *Peak Fitting Module*, bem como as linhas cinza (decomposição dos picos cristalinos) e a linha verde (decomposição da área não cristalina). Na amostra M-Q, destacaram-se sete picos localizados ao longo do difratograma. É possível notar o aumento da contribuição não cristalina na amostra M-Q, sendo um fator determinante na estimativa do percentual de cristalinidade.

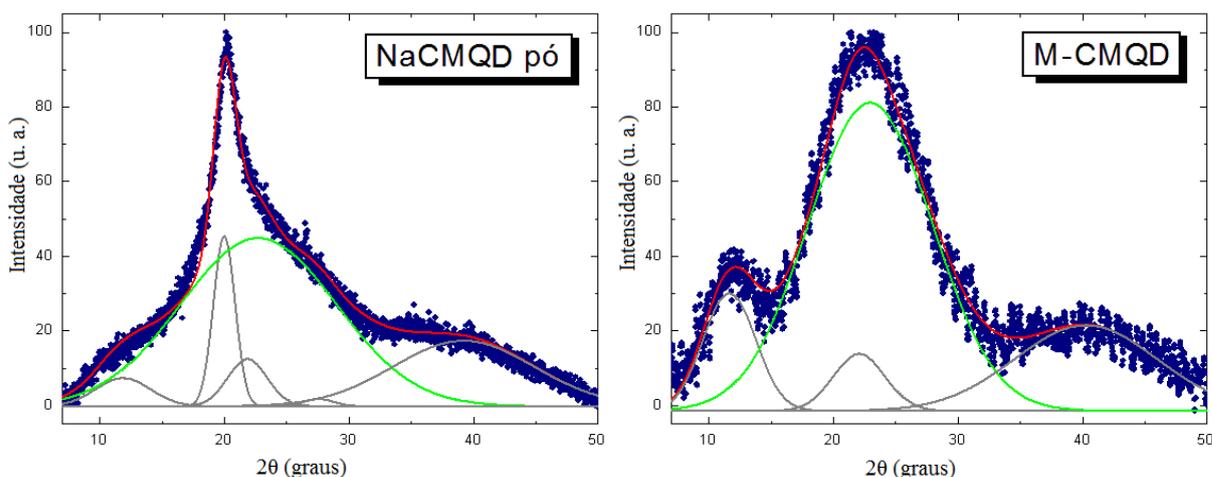
**Figura 5.9:** Decomposição dos picos de difração das amostras de quitosana em pó (à esquerda) e membrana de quitosana (à direita).



Fonte: Elaboração própria.

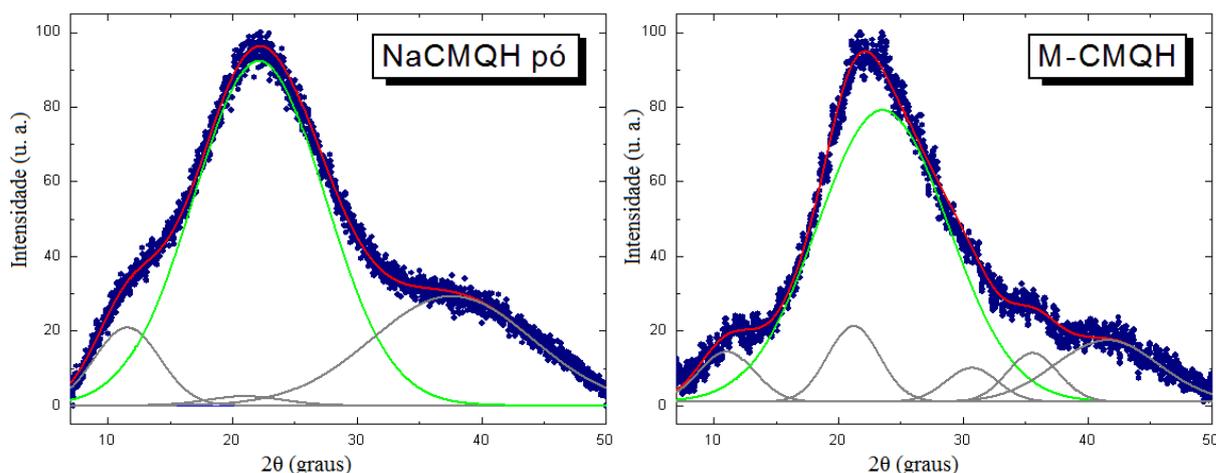
A carboximetilquitosana sódica da Dayang em pó (NaCMQD) apresentou seis picos decompostos e apenas quatro picos em M-CMQD (**Figura 5.7**). Já a carboximetilquitosana sódica da Heppe em pó (NaCMQH) apresentou quatro picos e seis picos em M-CMQH (**Figura 5.8**). Apesar da M-CMQH ter apresentado maior decomposição de seus picos em relação à NaCMQH, a área não cristalina permaneceu na mesma ordem para ambas as amostras.

**Figura 5.10:** Decomposição dos picos nas amostras de carboximetilquitosana sódica da Dayang em pó (à esquerda) e membrana (à direita).



Fonte: Elaboração própria.

**Figura 5.11:** Decomposição dos picos de difração das amostras de carboximetilquitosana sódica da Heppe em pó (à esquerda) e membrana (à direita).



Fonte: Elaboração própria.

Na **Tabela 5.7** temos a estimativa do percentual de cristalinidade das amostras Q, NaCMQD, NaCMQH, M-Q, M-CMQD e M-CMQH observado através do programa *Peak Fitting Module*. A quitosana apresentou o maior percentual na forma de pó, mostrando-se mais cristalina em relação às outras duas amostras em pó (NaCMQD e NaCMQ).

**Tabela 5.7:** Percentuais de cristalinidade estimados para as amostras Q, M-Q, NaCMQD, M-CMQD, NaCMQH e M-CMQH

Amostras em Pó		
Q	NaCMQD	NaCMQH
45 ( $\pm 5$ ) %	40 ( $\pm 5$ ) %	30 ( $\pm 5$ ) %
Amostras em Membrana		
M-Q	M-CMQD	M-CMQH
35 ( $\pm 5$ ) %	30 ( $\pm 5$ ) %	30 ( $\pm 5$ ) %

Fonte: Elaboração própria.

As amostras M-Q e M-CMQD apresentaram uma diminuição em seu percentual de cristalinidade e um alargamento dos picos cristalinos, como foi mostrado em **Figura 5.6** e **Figura 5.7** indicando que a organização regular e paralela das cadeias po-

liméricas foi reduzida quando comparada às amostras em pó. Já a amostra M-CMQH apresentou valor constante perfil similar tanto em pó, quanto em membrana (ver **Figura 5.8**). Alguns fatores podem ser atribuídos a esse aumento da fase não cristalina. Esse percentual relativamente menor pode ser relacionado com a metodologia empregada na síntese das membranas, pois, a partir da solução produzida, elas foram congeladas e liofilizadas. O congelamento rápido e a liofilização do material levaram a um produto que manteve a estrutura tridimensional do polímero em solução quando congelado e, assim, reduzindo a possibilidade de ordenação das cadeias poliméricas, resultando em amostras menos cristalinas. Tal fato também pode estar relacionado à sua estrutura molecular das cadeias. A carboximetilação resulta da substituição de átomos de hidrogênios das hidroxilas ( $-\text{OH}$ ) e grupos amino ( $-\text{NH}$ ) por grupo carboximetila ( $-\text{CH}_2\text{COOH}$ ), o que contribui para a redução do número de hidrogênios susceptíveis a participar destas ligações [49, 51]. Esse aumento em volume dos grupos laterais presentes nas carboximetilquitosanas pode causar dificuldade de empacotamento do polímero nas cadeias, devido ao impedimento estérico, contribuindo para o aumento da fase não cristalina nesses materiais [3]. Tais resultados corroboram com os dados de DRX.

## 5.3 AJUSTE LE BAIL

### 5.3.1 Etapas do Ajuste Le Bail

Através do Ajuste Le Bail, o refinamento estrutural para as amostras em pó e membrana foram realizados utilizando-se os dados de entrada (parâmetros de cela, simetria e grupo espacial) da quitina, propostos por Carlström (1957):  $a = 4,76 \text{ \AA}$ ,  $b = 10,28 \text{ \AA}$  (eixo da fibra) e  $c = 18,8 \text{ \AA}$ ,  $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$ , com simetria ortorrômbica e volume de cela de  $922,38 \text{ \AA}^3$  [93].

O padrão de difração obtido das amostras Q, M-Q, NaCMQD, M-CMQD, NaCMQH e M-CMQH refere-se a derivados da quitina. Portanto, foi necessário realizar alguns ajustes nos parâmetros das celas unitárias a fim de adequá-las a esse novo modelo estrutural, já que a diferença estrutural entre a quitina e seus derivados está relacionada com a retirada (para a quitosana) e inserção (para a N,O-carboximetilquito-

sana) de grupos laterais em suas estruturas moleculares, refletindo diretamente em parâmetros de cela diferenciados para cada um desses materiais.

As etapas dos refinamentos das amostras seguiram a seguinte ordem, sendo que para cada amostra houve a necessidade de pequenas variações quanto às etapas *iii* e *iv*:

- i. Dados de entrada: referem-se à inserção dos dados cristalográficos contidos nos arquivos *.cif* (*Crystallographic Information File*), o qual foi retirado do banco de dados orgânicos *Cambridge Crystallographic Data Centre* (Cambridge CDC); arquivo *.irf* (*Instrumental Resolution Function*) referente aos parâmetros constituintes da função de resolução experimental  $(U, V, W)_{instr.}$  obtidos a partir do hexaboreto de lantânio ( $LaB_6$ ), material padrão usado para a calibração do difratômetro, e *.dat* que é um arquivo que possui a coleta de dados de DRX o qual correlaciona a intensidade com a posição angular;
- ii. Alteração dos parâmetros de cela *a*, *b* e *c* de acordo com a necessidade de cada amostra;
- iii. Refinamento de parâmetros microestruturais;
- iv. Refinamento dos parâmetros de cela *a*, *b* e *c*;
- v. Finalização do refinamento: refere-se ao momento em que os valores dos parâmetros refinados e os fatores de discordância (ou fatores R) mostrados nas equações 4.5 a 4.7 apresentam resultados coerentes com o esperado;
- vi. Identificação dos principais planos de reflexão, tamanho médio e anisotrópico dos cristalitos, e obtenção dos mapas de visualização dos cristalitos.

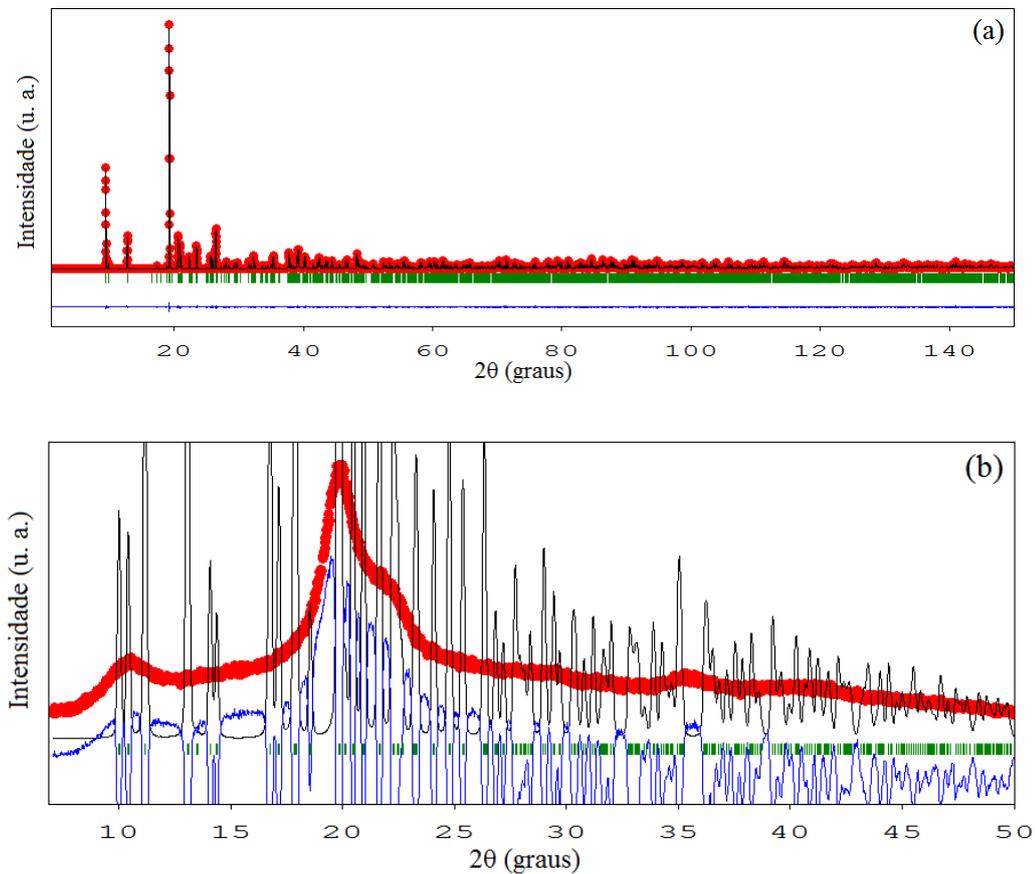
### 5.3.2 Ajuste Le Bail para a Quitosana (Q) em Pó e Membrana (M-Q)

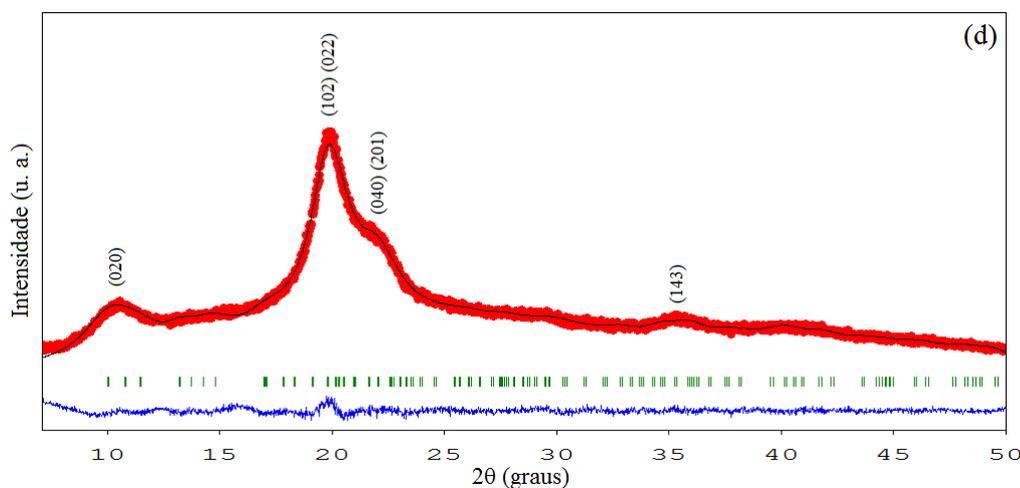
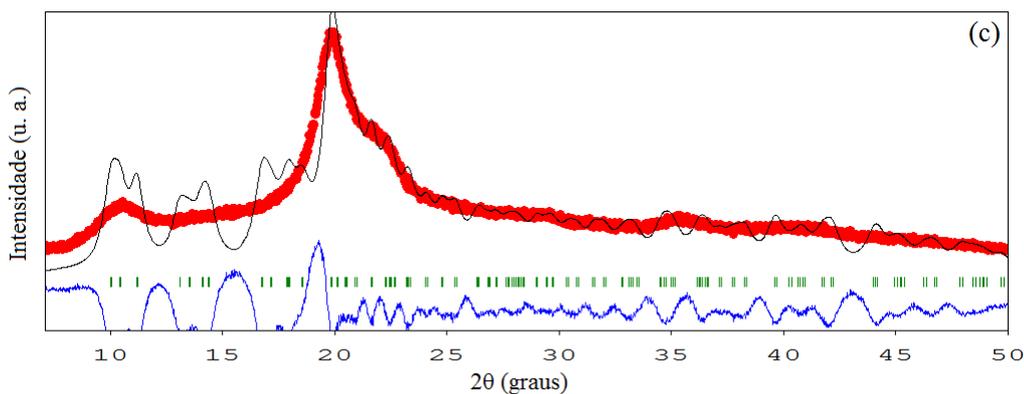
Após a inserção dos dados de entrada, os parâmetros de cela refinados para a amostra Q foram:  $a = 8,10 \text{ \AA}$ ;  $b = 16,64 \text{ \AA}$ ;  $c = 10,63 \text{ \AA}$ , de simetria ortorrômbica [10, 94].

Em **Figura 5.12a-d** mostra essa evolução do refinamento, sendo que em (a) tem-se a incorporação dos dados de entrada (etapa *i*), em (b) e (c) tem-se os ajustes dos parâmetros de cela e microestruturais (etapa *ii*, *iii* e *iv*) e em (d) ocorre o refinamento finalizado (etapa *v*), onde as curvas em vermelho representam os difratogramas observados, as curvas em preto são os difratogramas calculados, as curvas em azul evidenciam as diferenças entre os difratogramas observados e calculados, e as barras verdes são as reflexões de Bragg.

Com o refinamento estrutural finalizado, no momento em que os fatores de discordância deixam de variar, o programa *FullProf* gerou o arquivo de saída *.prf*, a partir do qual foi possível identificar os principais planos de reflexão, *hkl*, que contribuíram para o pico de difração (**Figura 5.12d**).

**Figura 5.12:** Simplificação das etapas do refinamento da amostra Q: (a) inserção dos dados de entrada; (b) e (c) modificação dos parâmetros de cela e início do alargamento dos picos; (d) refinamento final e suas principais reflexões.



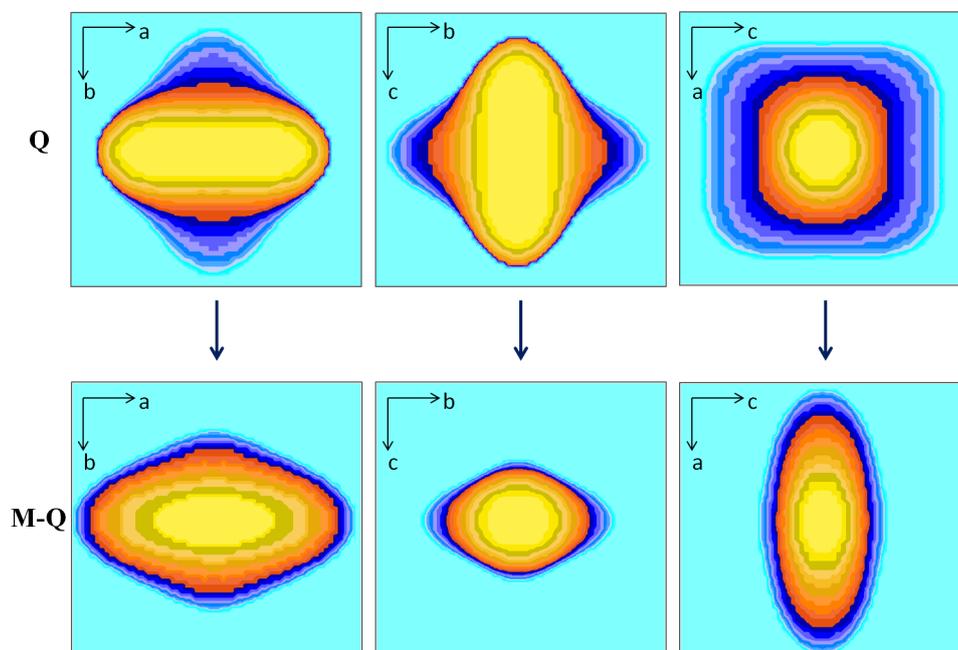


Fonte: Elaboração própria.

A visualização dos cristalitas em 2D e 3D nas direções [100], [010] e [001] para as amostras Q e M-Q (**Figura 5.13** e **Figura 5.14**, respectivamente) foi realizada através do programa *GFourier*, pacote incluso no programa *FullProf*, caracterizando a etapa *vi*.

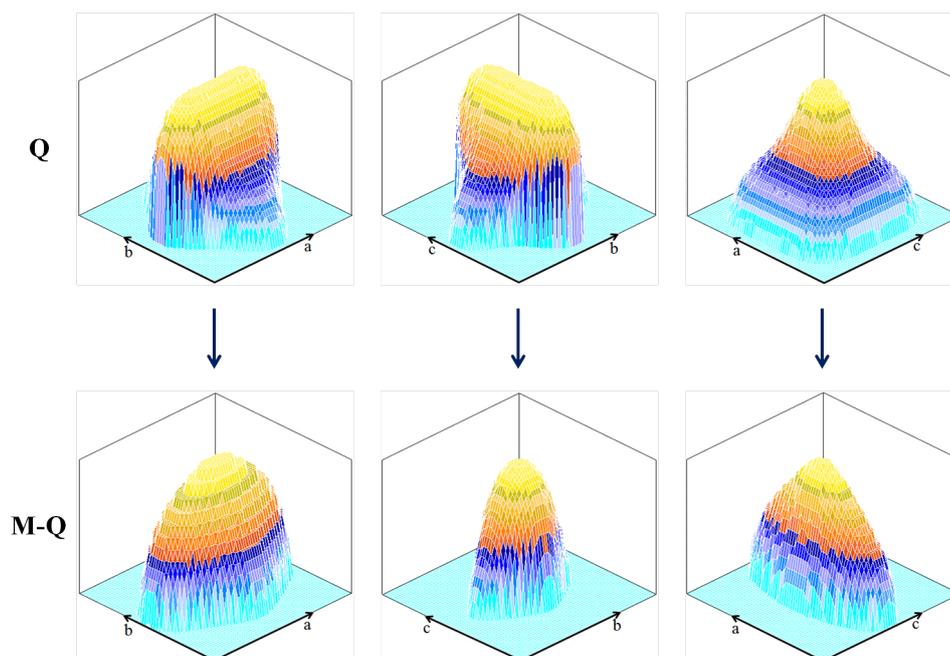
As etapas descritas anteriormente foram realizadas também para a quitosana na forma de membrana (M-Q). Para este refinamento (**Figura 5.15**), os parâmetros de cela utilizados foram baseados nos parâmetros obtidos anteriormente para a amostra Q. Sendo assim:  $a = 8,64 \text{ \AA}$ ,  $b = 10,84 \text{ \AA}$  e  $c = 16,29 \text{ \AA}$ , com simetria ortorrômbica ( $a \neq b \neq c$  e  $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$ ). Houve um pequeno aumento nas direções  $b$  e  $c$  refletindo diretamente no volume da cela, como mostra a **Tabela 5.8**.

**Figura 5.13:** Mapa de visualização do tamanho médio aparente do cristalito nos planos  $(a,b)$ ,  $(b,c)$  e  $(c,a)$  em 2D para as amostras Q e M-Q.



Fonte: Elaboração própria.

**Figura 5.14:** Mapa de visualização do tamanho médio aparente do cristalito nos planos  $(a,b)$ ,  $(b,c)$  e  $(c,a)$  em 3D para as amostras Q e M-Q.



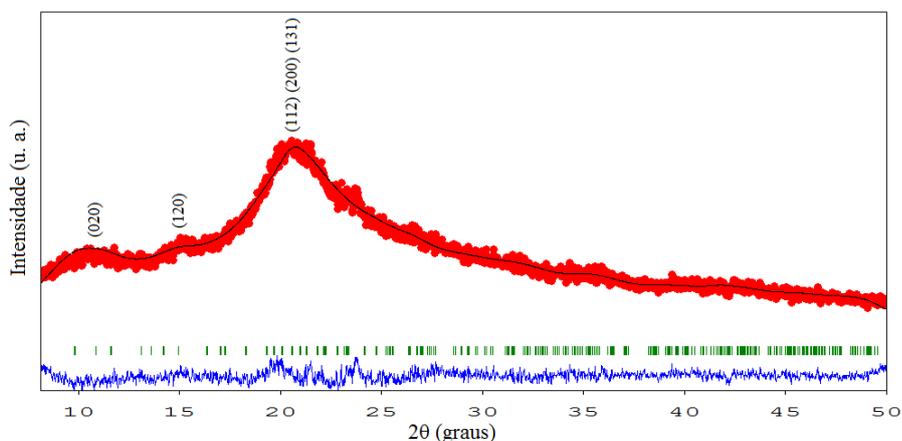
Fonte: Elaboração própria.

**Tabela 5.8:** Ajuste Le Bail para, Q, M-Q, NaCMQD, M-CMQD, Na-CMQH e M-CMQH

Parâmetros refinados	Quitina Carlström (1957)	Q	M-Q	NaCMQD	M-CMQD	NaCMQH	M-CMQH
$a$ (Å)	4,76	8,66224	8,64249	12,93972	1303713	13,21847	13,17671
$b$ (Å)	10,28	16,26748	16,29161	19,02978	19,00370	18,74462	18,94673
$c$ (Å)	18,85	10,48004	10,83663	10,12246	10,00050	10,16345	10,10809
$\alpha = \beta = \gamma$ (°)	90	90	90	90	90	90	90
$V$ (Å <sup>3</sup> )	922,38	1476,77	1525,797	2492,55	2477,66	2518,24	2523,54
<b>Cristalito (Anisotropia) (Å)</b>	–	29 (4)	16 (4)	32 (7)	23 (2)	20 (1)	24 (1)
<b>Cristalito na direção [100] (Å)</b>	–	30	26	23	22	16	21
<b>Cristalito na direção [010] (Å)</b>	–	34	18	64	19	21	23
<b>Cristalito na direção [001] (Å)</b>	–	31	12	31	20	18	22
$R_{wp}$ (%)	–	6,91	6,90	3,39	5,54	3,59	5,54
$R_p$ (%)	–	4,44	4,89	2,53	3,82	2,61	3,82

Fonte: Elaboração própria.

**Figura 5.15:** Refinamento final da amostra M-Q com suas principais reflexões após os ajustes de cela e alargamento dos picos, onde: difratograma observado (curvas em vermelho), calculado (curvas em preto) e a diferença entre o observado e calculado (em azul).



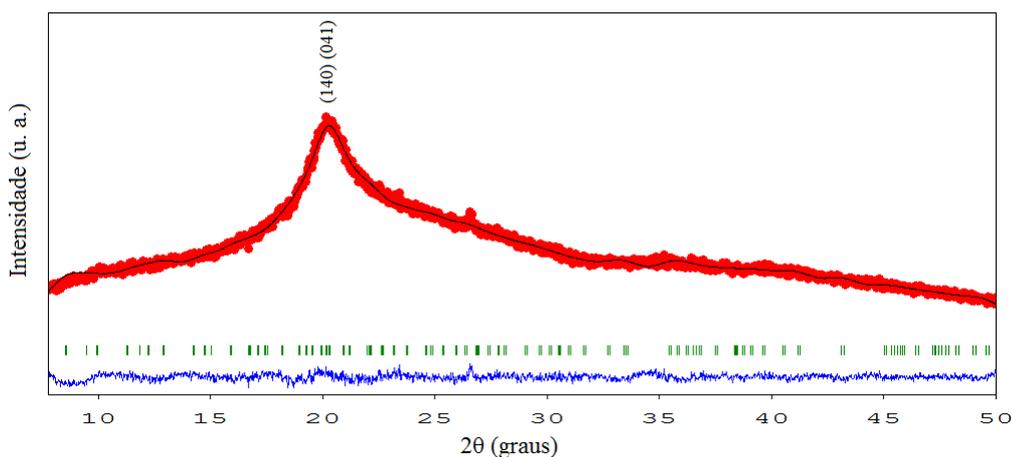
Fonte: Elaboração própria.

Apesar de, estruturalmente, não haver diferença entre as amostras Q e M-Q, a forma física das amostras e a metodologia de síntese das membranas refletiram na organização das cadeias e, conseqüentemente, no tamanho médio aparente dos cristallitos, passando de 29 Å para 16 Å. Entretanto, a anisotropia de ambas não teve significativas mudanças, como pode ser visto nas **Figura 5.13** e **Figura 5.14** apresentando valores em torno de 4 Å.

### 5.3.3 N,O-Carboximetilquitosana Sódica em Pó (NaCMQD) e Membrana (M-CMQD)

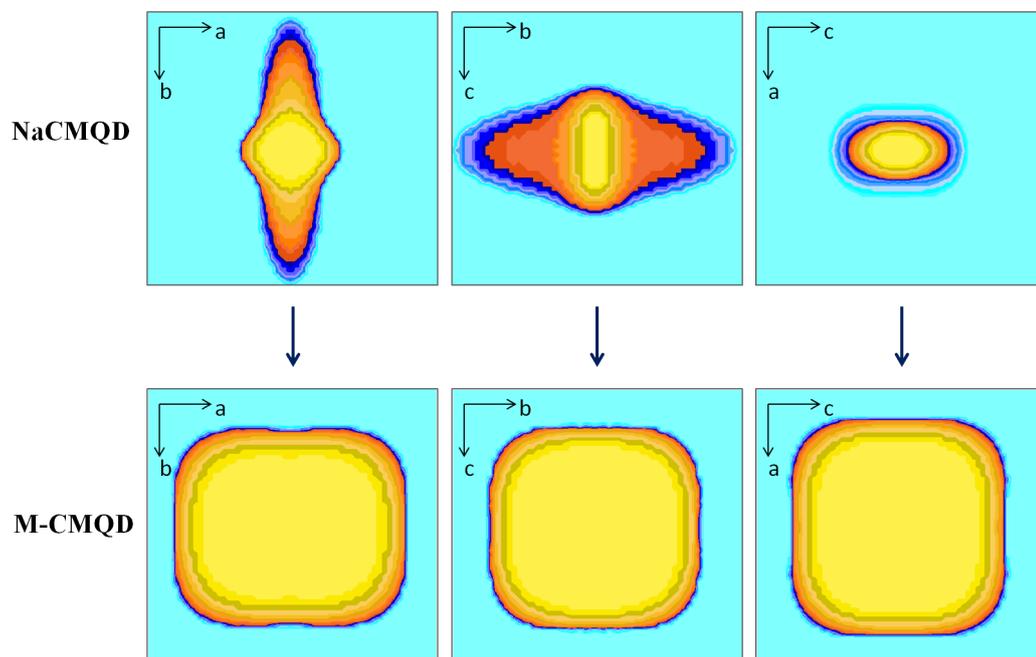
Com um pico bem definido (ver **Figura 5.16**), em relação ao difratograma de sua membrana, a NaCMQD apresentou um alto valor do tamanho médio dos seus cristallitos (ver **Tabela 5.8**), 32 Å, e anisotropia em torno de 7 Å, ou seja, um valor apresentando um formato diferente de uma esfera, como pode ser acompanhado na **Figura 5.17** e **Figura 5.18**.

**Figura 5.16:** Refinamento final da amostra NaCMQD com a sua principal reflexão após os ajustes de cela e alargamento dos picos, onde: difratograma observado (curvas em vermelho), calculado (curvas em preto) e a diferença entre o observado e calculado (em azul).



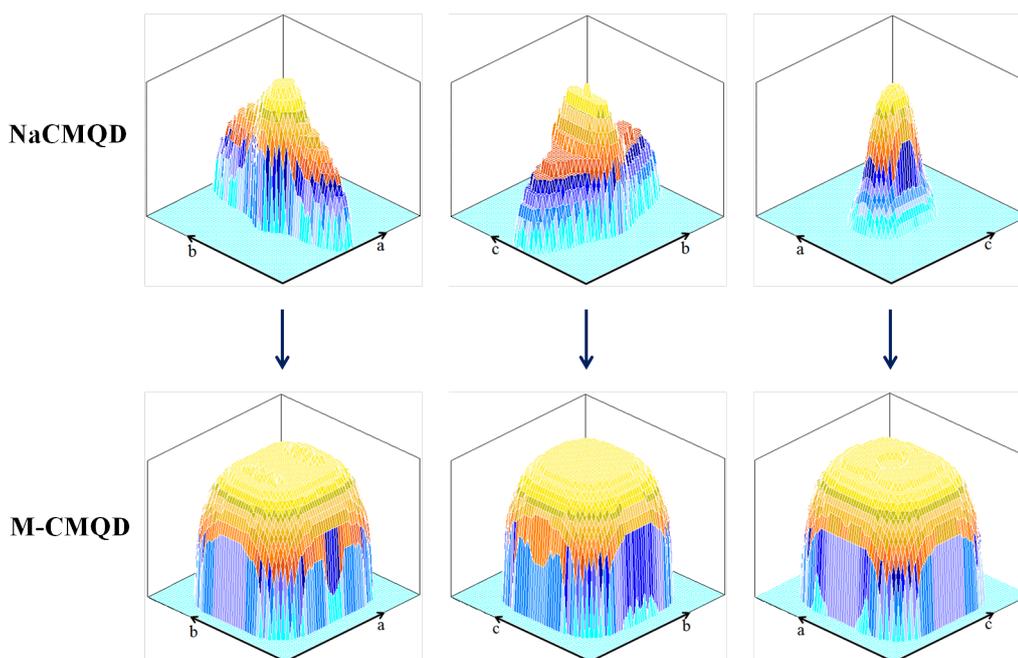
Fonte: Elaboração própria.

**Figura 5.17:** Mapa de visualização do tamanho médio aparente do cristalito nos planos  $(a,b)$ ,  $(b,c)$  e  $(c,a)$  em 2D para as amostras NaCMQD e M-CMQD.



Fonte: Elaboração própria.

**Figura 5.18:** Mapa de visualização do tamanho médio aparente do cristalito nos planos  $(a,b)$ ,  $(b,c)$  e  $(c,a)$  em 3D para as amostras NaCMQD e M-CMQD.

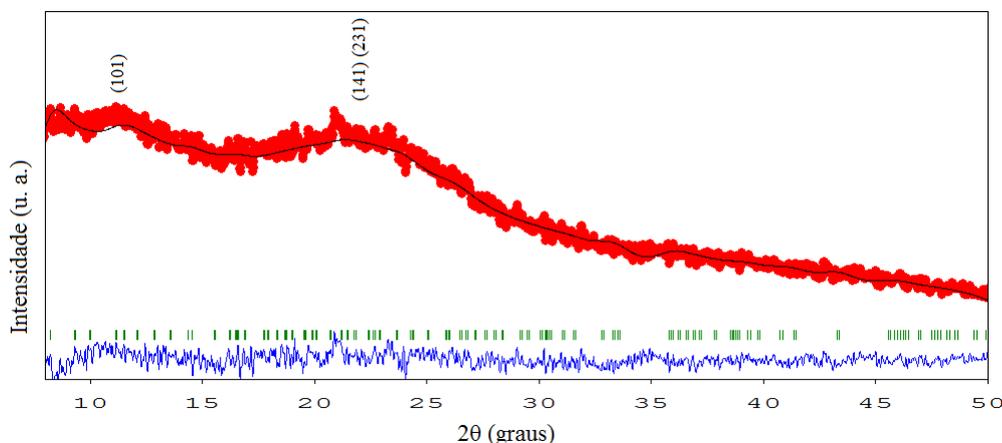


Fonte: Elaboração própria.

Ao serem sintetizadas, as amostras M-CMQD e M-CMQH passaram por processos físicos e químicos, tais como a solubilização, liofilização e neutralização, os quais alteraram a disposição das cadeias poliméricas refletindo, assim, em seu percentual de cristalinidade, perfil difratométrico (**Figura 5.16** e **Figura 5.19**) e em sua morfologia.

O mapa de visualização do cristalito em 2D e 3D para M-CMQD (**Figura 5.17** e **Figura 5.18**) permitiu observar que a sua forma foi alterada, comparada com a amostra NaCMQD. Tal fato pode ser comprovado analisando a diferença entre as suas anisotropias, já que a amostra em pó apresentou um valor em torno de 7 Å e sua membrana um valor em torno de 2 Å (como mostrado na **Tabela 5.8**), o que pode caracterizar uma forma mais globular, próxima à forma esférica.

**Figura 5.19:** Refinamento final da amostra M-CMQD com a sua principal reflexão após os ajustes de cela e alargamento dos picos, onde: difratograma observado (curvas em vermelho), calculado (curvas em preto) e a diferença entre o observado e calculado (em azul).



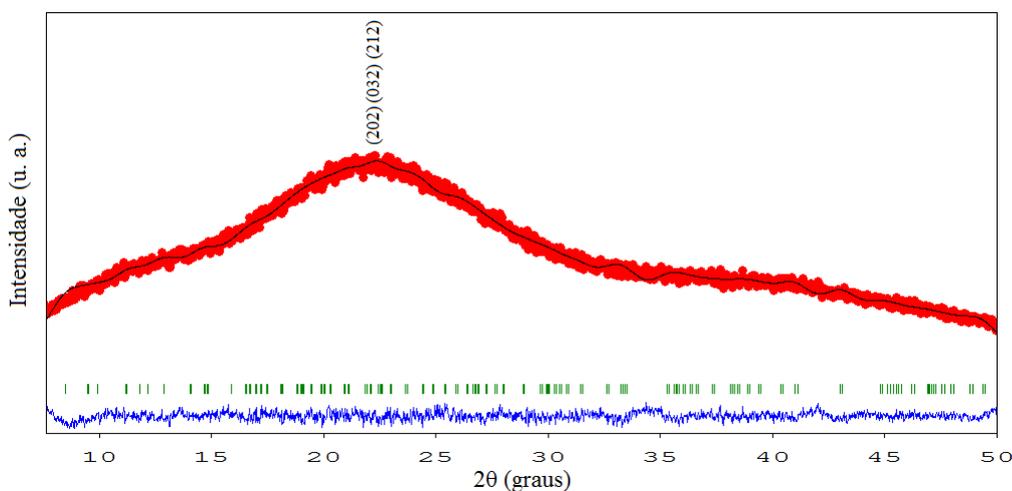
Fonte: Elaboração própria.

#### 5.3.4 N,O-Carboximetilquitosana Sódica em Pó (NaCMQH) e Membrana (M-CMQH)

A amostra NaCMQH não apresentou picos bem definidos, apenas “ombros” ao longo de seu perfil difratométrico (ver **Figura 5.20**). Comparada à amostra NaCMQD, a NaCMQH apresentou uma redução em sua cristalinidade (como pode ser visto na **Tabela 5.7**), o que pode estar associada à diferença de massa molar média de cada amostra. Os valores da massa molar média para cada amostra foi determinado por

Fiamingo (2012) [3], onde a amostra NaCMQD possui massa molar média de  $20.476 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ , já a amostra NaCMQH,  $75.760 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ , motivando, assim, a dificuldade de acomodação de suas longas cadeias em domínios relativamente organizados.

**Figura 5.20:** Refinamento final da amostra NaCMQH com a sua principal reflexão após os ajustes de cela e alargamento dos picos, onde: difratograma observado (curvas em vermelho), calculado (curvas em preto) e a diferença entre o observado e calculado (em azul).

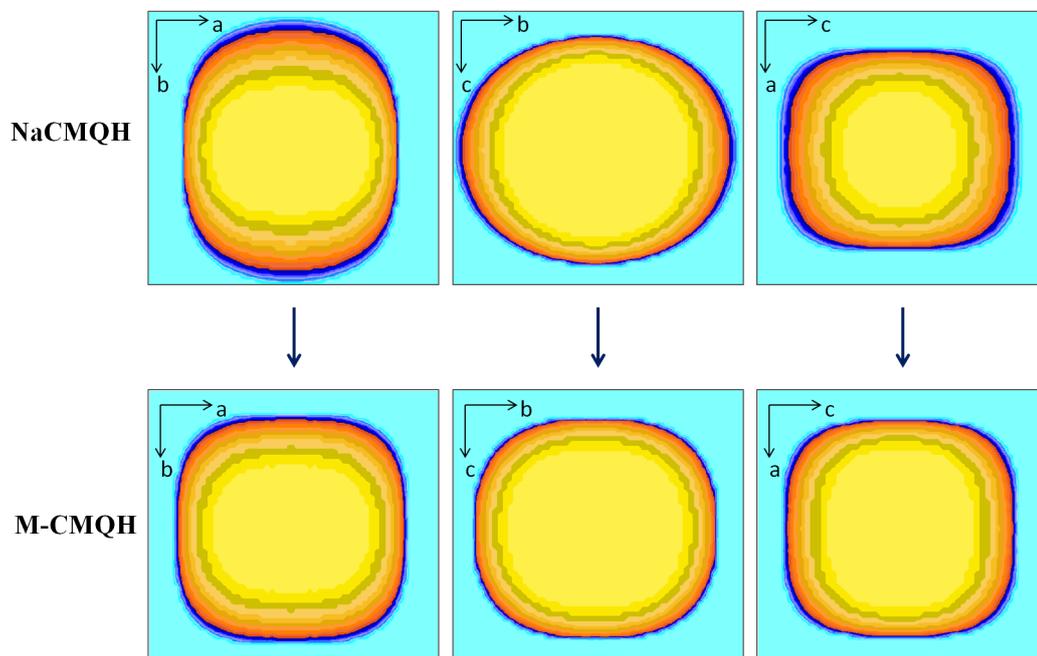


Fonte: Elaboração própria.

A anisotropia apresentada para a amostra NaCMQH está em torno de  $1 \text{ \AA}$ , caracterizando um formato geométrico próximo ao esférico, como pode ser observado na **Figura 5.21**.

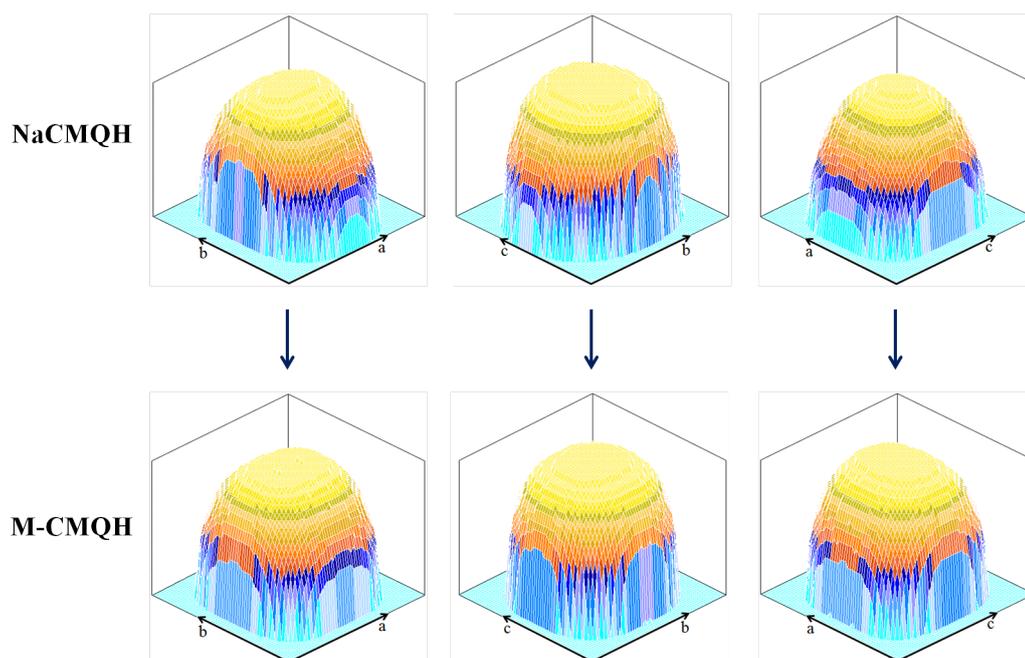
O ajuste realizado para a amostra M-CMQH (**Figura 5.23**) possui perfil similar à amostra NaCMQH. Com percentual de cristalinidade em torno de 30% para ambas as amostras, seus cristalitos não apresentaram mudanças significativas, como pôde ser visto nas **Figura 5.21** e **Figura 5.22**, e seus formatos apresentados tendem para um formato mais esférico justificando as suas anisotropias em torno de  $1 \text{ \AA}$ .

**Figura 5.21:** Mapa de visualização do tamanho médio aparente do cristalito nos planos  $(a,b)$ ,  $(b,c)$  e  $(c,a)$  em 2D para as amostras NaCMQH e M-CMQH.



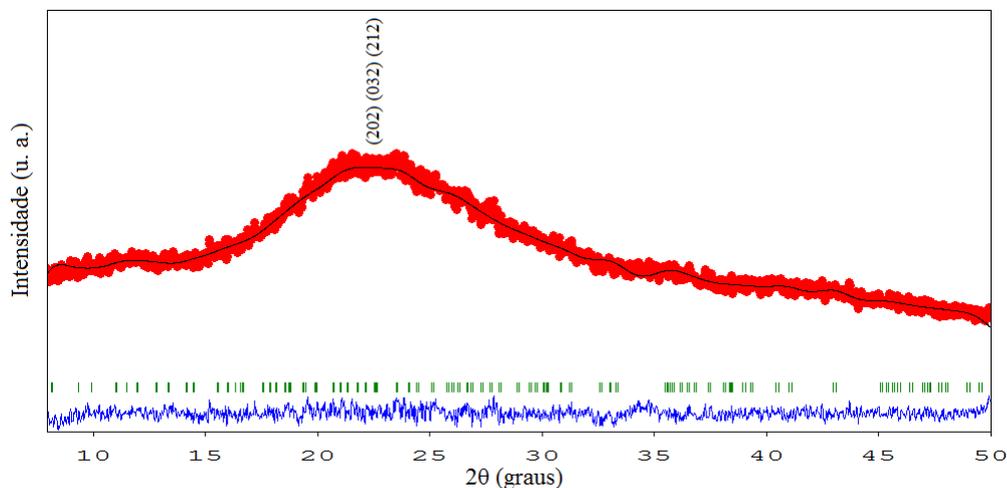
Fonte: Elaboração própria.

**Figura 5.22:** Mapa de visualização do tamanho médio aparente do cristalito nos planos  $(a,b)$ ,  $(b,c)$  e  $(c,a)$  em 3D para as amostras NaCMQH e M-CMQH.



Fonte: Elaboração própria.

**Figura 5.23:** Refinamento final da amostra M-CMQH com a sua principal reflexão após os ajustes de cela e alargamento dos picos, onde: difratograma observado (curvas em vermelho), calculado (curvas em preto) e a diferença entre o observado e calculado (em azul).



Fonte: Elaboração própria.

Através do ajuste Le Bail foi possível determinar os parâmetros de cela das seis amostras analisadas, baseando-se na literatura. A anisotropia avaliada visualmente através do mapa de visualização dos cristalitos e obtida através do programa *FullProf* permitiu classificar os cristalitos de acordo com o formato apresentado. As amostras NaCMQH e M-CMQH exibiram formato mais esférico indicando uma anisotropia baixa e concordando com os valores obtidos do percentual de cristalinidade estimado através do programa *Peak Fitting Module*. O baixo grau de cristalinidade dessas duas amostras citadas está associado à dificuldade de empacotamento de suas cadeias poliméricas, tendo em vista que a amostra NaCMQH apresentou grupos laterais extensos, como foi previsto através do RMN  $^{13}\text{C}$ . Assim, foi necessário aumentar o parâmetro de cela  $a$  e  $b$  desses monômeros a fim de acomodar os grupos laterais extensos provenientes da carboximetilação da quitosana, passando de  $a = 9 \text{ \AA}$  e  $b = 16 \text{ \AA}$  (Q) para, aproximadamente,  $a = 13 \text{ \AA}$  e  $b = 19 \text{ \AA}$  (CMQ's).

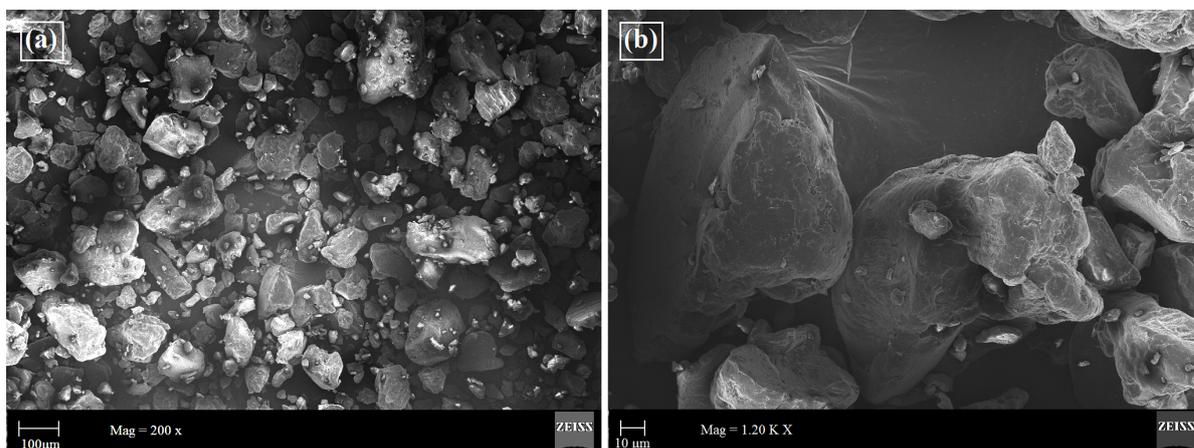
## 5.4 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

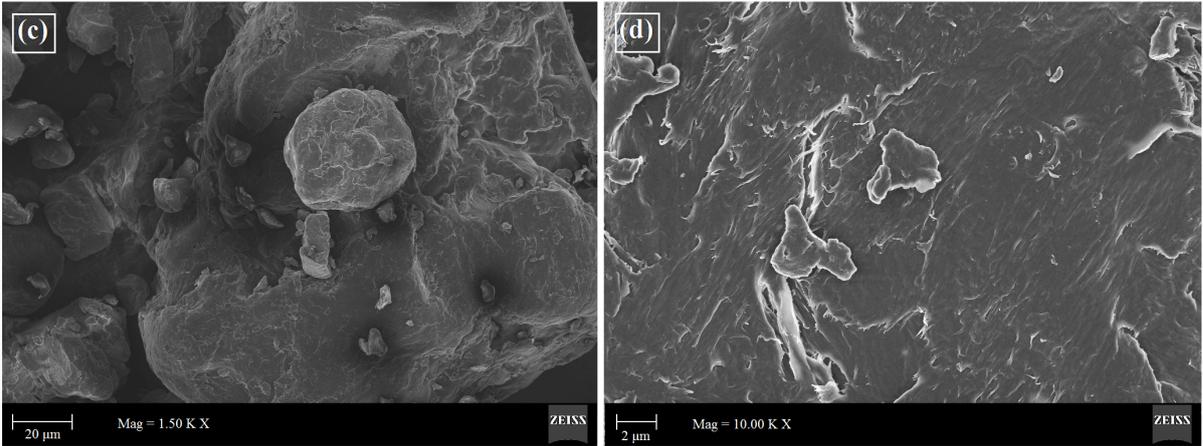
A técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi utilizada com a finalidade de avaliar as morfologias das amostras em pó (Q, NaCMQD e NaCMQH) e em membranas (M-Q, M-CMQD e M-CMQH). Tal técnica é muito aplicada à caracterização de materiais [95, 96].

### 5.4.1 Q e M-Q

As micrografias da quitosana em pó, mostrada na **Figura 5.24 a-d**, apresentam aumentos de 200x (a), 1200x (b), 1500x (c) e 10.000x (d). Foi possível observar que o pó de quitosana não apresenta uma morfologia definida e que a sua superfície possui rugosidades, além de possuir uma distribuição variada de tamanhos de grãos. Tais características foram encontradas também por Signini e Campana Filho (2001) [97].

**Figura 5.24:** Micrografia da amostra Q com aproximações: (a) 200x; (b) 1.200x; (c) 1.500x; (d) 10.000x.

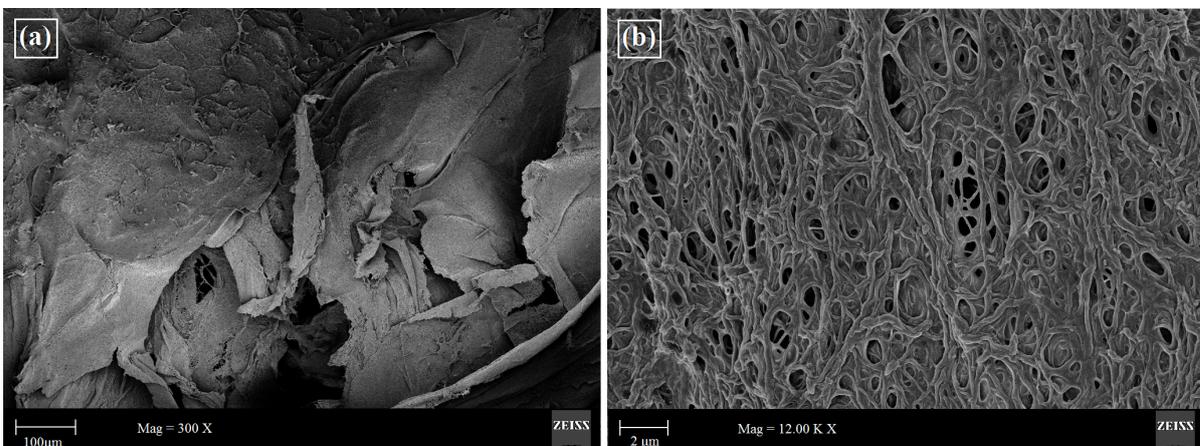


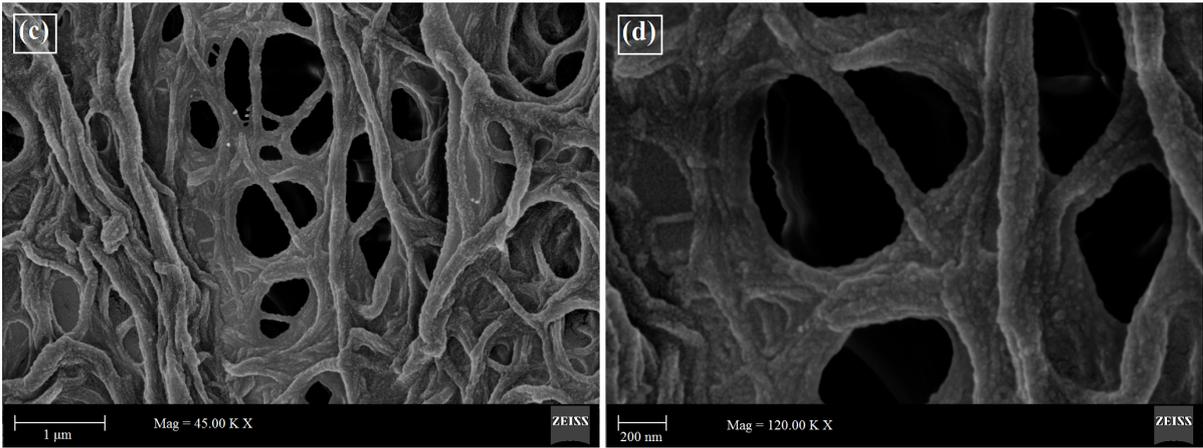


Fonte: Elaboração própria.

As micrografias da amostra membrana de quitosana (M-Q), com aproximações de 300x (a), 12.000x (b), 45.000x (c) e 120.000x (d), apresentam macroporos (diâmetro maior que 50 nm) por toda sua extensão e sem um padrão definido (ver **Figura 5.25**). A espessura das fibras da membrana varia entre 0,05 e 0,56  $\mu\text{m}$ , de acordo com as medidas realizadas na micrografia da M-Q em função da frequência observada, como mostra a **Figura 5.26**. Tais resultados podem ser comparados à estrutura de quitosana apresentada por Suh e Matthew (2000) [98], Laranjeira e Fávere (2009) [2], para aplicações biomédicas.

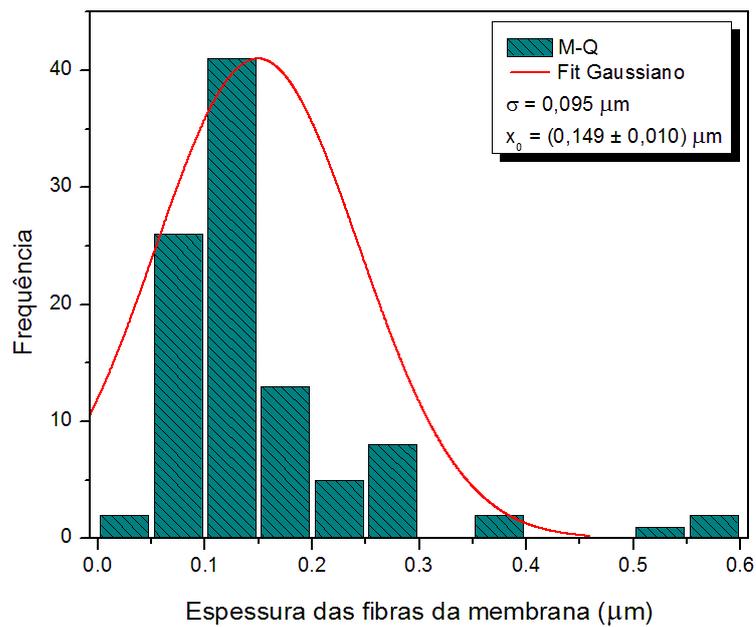
**Figura 5.25:** Micrografia da amostra M-Q com aproximações: (a) 300x; (b) 12.000x; (c) 45.000x; (d) 120.000x.





Fonte: Elaboração própria.

**Figura 5.26:** Histograma da espessura das fibras da M-Q em função da frequência observada, juntamente com a gaussiana, desvio padrão e ponto médio.



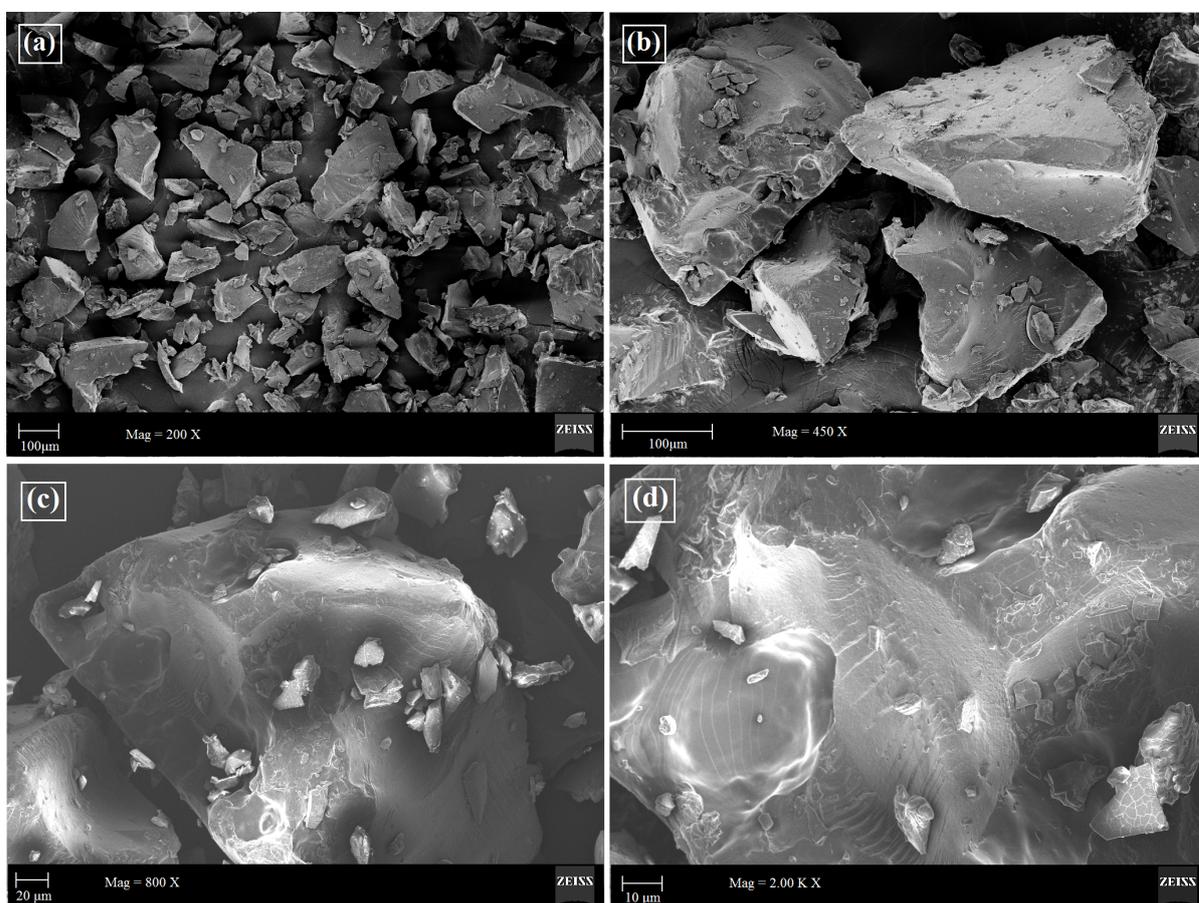
Fonte: Elaboração própria.

No histograma da amostra M-Q, pode-se observar uma grande presença de fibras com espessura em torno de  $0,15 \mu\text{m}$  (ponto médio do *fit* gaussiano) ao longo da micrografia. Além disso, variadas espessuras de suas fibras foram catalogadas indicando a não uniformidade do tamanho dos poros e sua distribuição.

#### 5.4.2 NaCMQD e M-CMQD

As micrografias da amostra NaCMQD, com aproximações de 200x (a), 450x (b), 800x (c) e 2.000x (d), apresentam grãos com diferentes tamanhos e padrões geométricos, como pode ser visto na **Figura 5.27**. Comparado com a amostra Q, a NaCMQD exibe uma superfície com menos rugosidade, todavia, tais características não influenciaram em seu percentual de cristalinidade, como mostrado na **Tabela 5.7**.

**Figura 5.27:** Micrografia da amostra NaCMQD com aproximações: (a) 200x; (b) 450x; (c) 800x; (d) 2.000x.

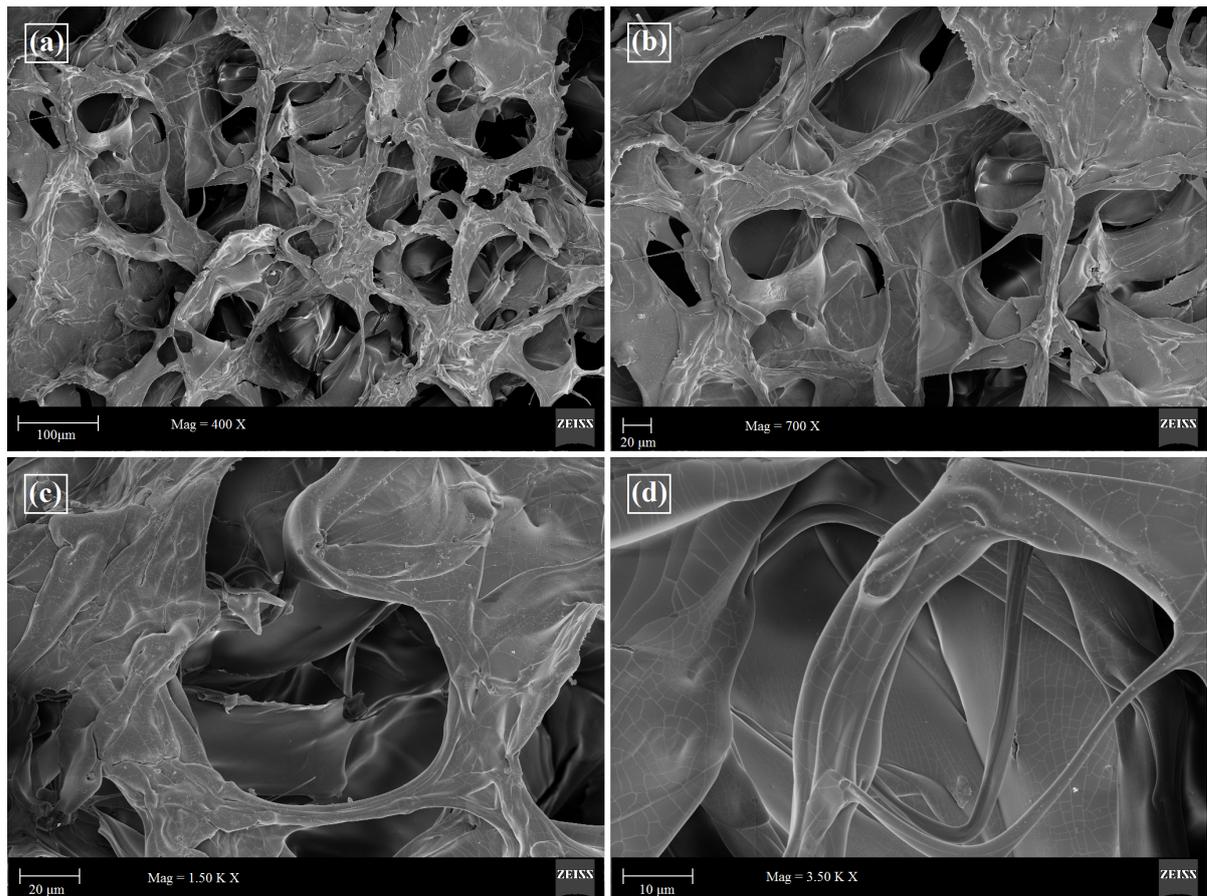


Fonte: Elaboração própria.

Na micrografia da amostra M-CMQD, com aproximações de 400x (a), 700x (b), 1.500x (c) e 3.500x (d), constatou-se que a distribuição de tamanhos de macroporos não é uniforme (ver **Figura 5.28**). Além disso, apresentam um alargamento maior de seus poros em relação aos macroporos presentes na amostra M-Q. O aspecto de macroporos

deformados pode estar associado ao longo processo de purificação na forma NaCMQD pelo qual a amostra passou, pois a mesma demandou a execução de várias etapas de filtração.

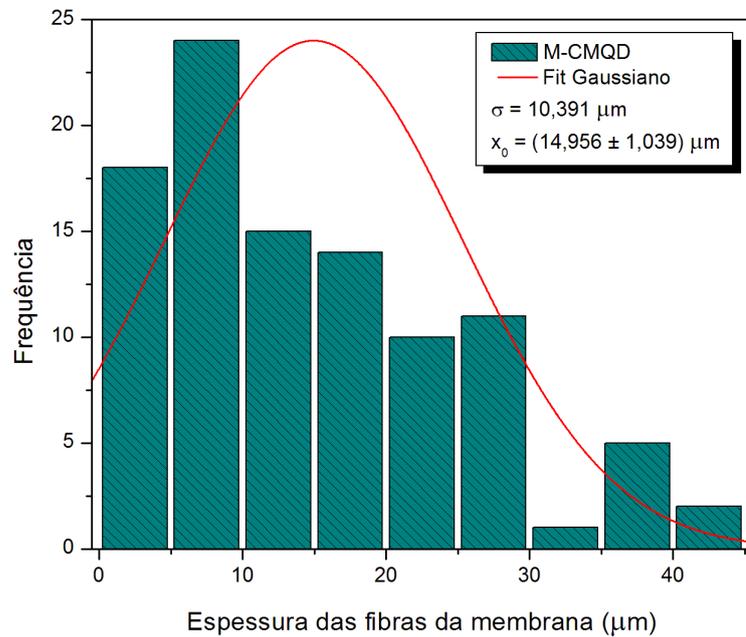
**Figura 5.28:** Micrografia da amostra M-CMQD com aproximações: (a) 400x; (b) 700x; (c) 1.500x; (d) 3.500x.



Fonte: Elaboração própria.

As espessuras das fibras de M-CMQD possui um mínimo em torno de  $1,65 \mu\text{m}$  e máximo em  $43,00 \mu\text{m}$  para a micrografia escolhida, como pode ser notado na **Figura 5.29**. As espessuras mais frequentes foram encontradas no intervalo de 5 a  $10 \mu\text{m}$ , mas também houve uma presença significativa entre 10 e  $20 \mu\text{m}$ , cujo intervalo possui a média do *fit* gaussiano localizado em  $15 \mu\text{m}$ , evidenciando a heterogeneidade das espessuras das fibras.

**Figura 5.29:** Histograma da espessura das fibras da M-CMQD em função da frequência observada, juntamente com a gaussiana, desvio padrão e ponto médio.

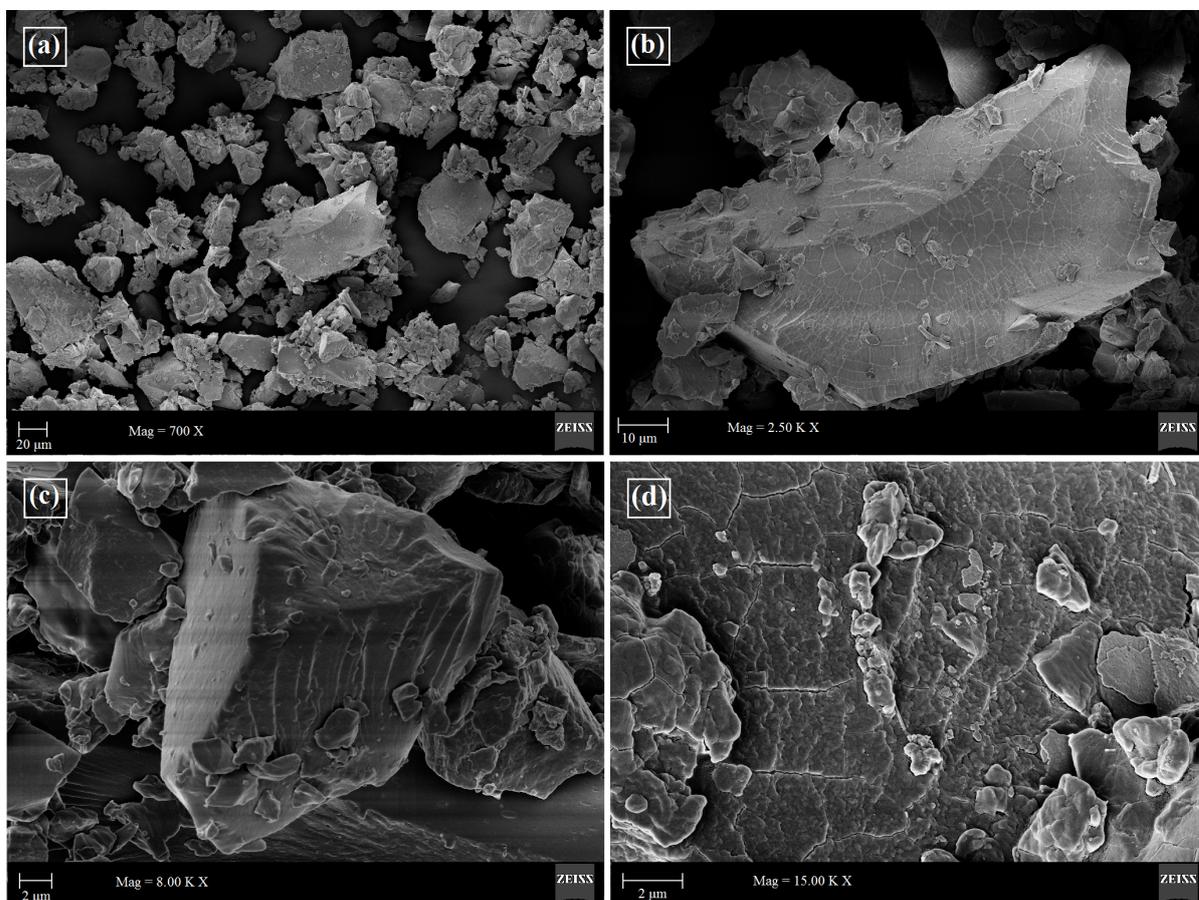


Fonte: Elaboração própria.

#### 5.4.3 NaCMQH e M-CMQH

A partir das micrografias da amostra NaCMQH (ver **Figura 5.30**), com aproximações de 700x (a), 2.500x (b), 8.000x (c) e 15.000x (d), observou-se que há similaridade com a amostra NaCMQD, ou seja, NaCMQH possui uma superfície (quase) lisa, bem definida e com diferentes padrões geométricos. Entretanto, os grãos encontrados na NaCMQD são menores em relação à amostra NaCMQH.

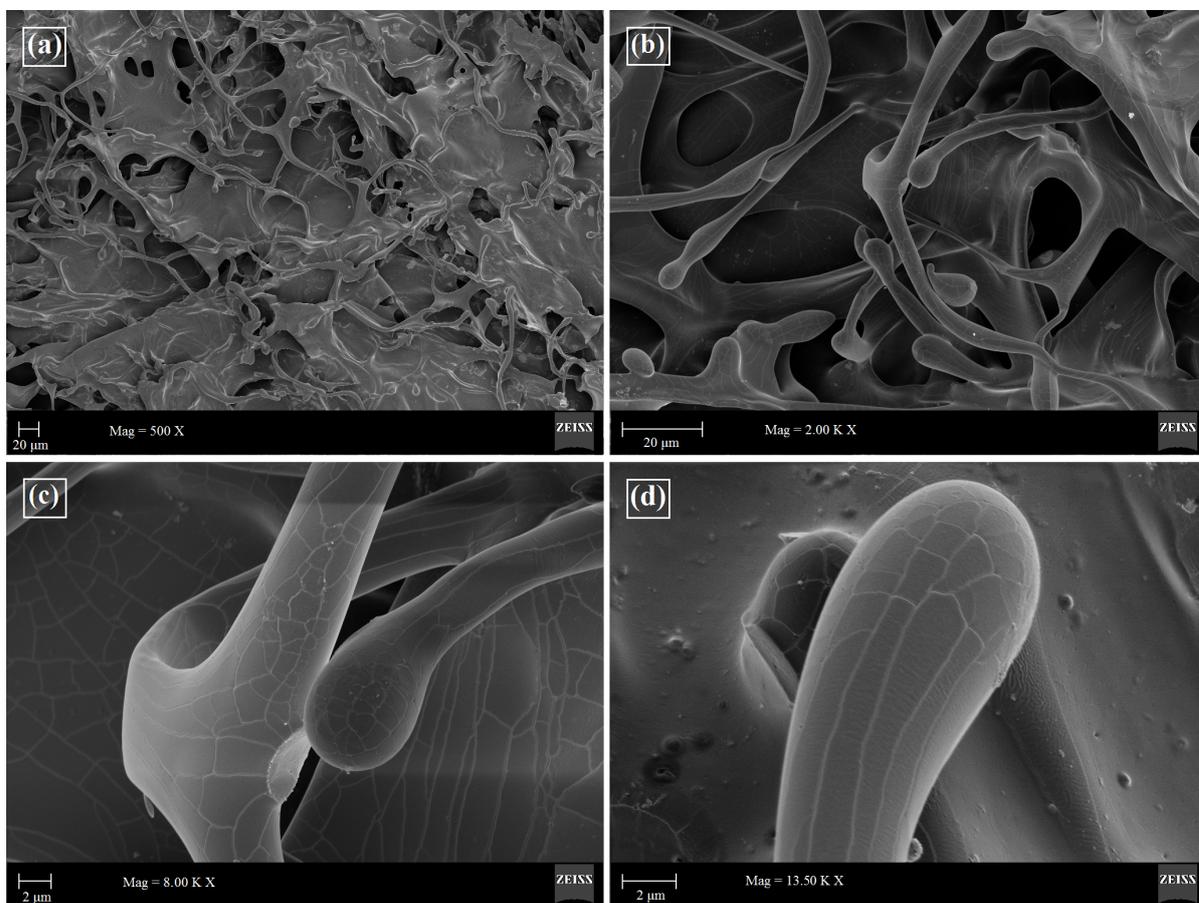
**Figura 5.30:** Micrografia da amostra NaCMQH com aproximações: (a) 700x; (b) 2.500x; (c) 8.000x; (d) 15.000x.



Fonte: Elaboração própria.

As micrografias da M-CMQH (ver **Figura 5.31**), com aproximações de 500x (a), 2.000x (b), 8.000x (c) e 13.500x (d), retratam uma grande distribuição de tamanho de poros em torno de 5  $\mu\text{m}$  (similar à distribuição apresentada na M-CMQD). Além disso, sua superfície apresenta ranhuras com tamanhos variáveis ao longo das fibras da membrana. Semelhante à M-CMQH, essas ranhuras também estão presentes na M-CMQD e nos pós de NaCMQH e NaCMQD, como pode ser visto nas figuras anteriores.

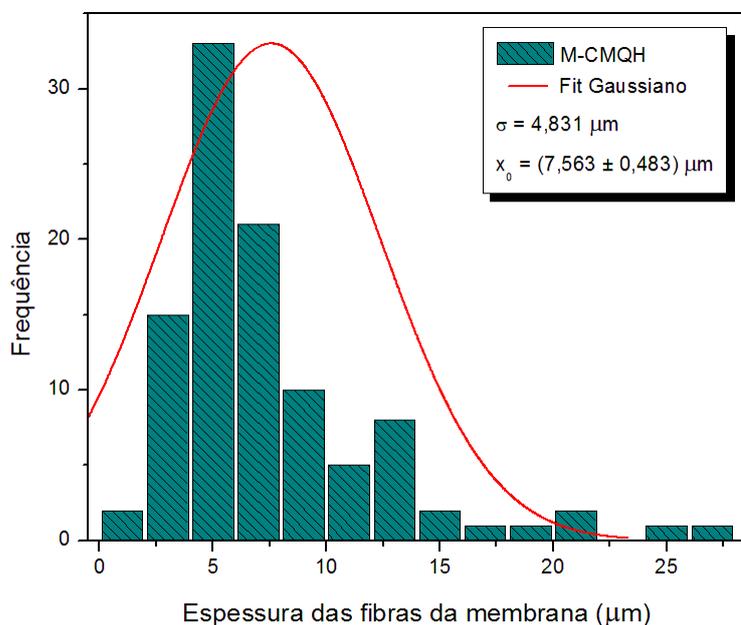
**Figura 5.31:** Micrografia da amostra M-CMQH com aproximações: (a) 500x; (b) 2.000x; (c) 8.000x; (d) 13.500x.



Fonte: Elaboração própria.

O histograma apresentado para a M-CMQH na **Figura 5.32** exibiu uma grande frequência em torno  $5 \mu\text{m}$ , assim como uma significativa presença entre 5 e  $10 \mu\text{m}$ , onde o ponto médio do *fit* gaussiano está localizado em, aproximadamente,  $7 \mu\text{m}$ . As medidas máximas e mínimas constatadas na micrografia foram de  $1,20$  e  $26,03 \mu\text{m}$ , respectivamente.

**Figura 5.32:** Histograma da espessura das fibras da M-CMQH em função da frequência observada, juntamente com a gaussiana, desvio padrão e ponto médio.



Fonte: Elaboração própria.

Através das micrografias das amostras Q, NaCMQD e NaCMQH, pôde-se observar que a quitosana possui um menor tamanho de grãos em relação à NaCMQD e NaCMQH. Em relação às membranas M-Q, M-CMQD e M-CMQH, a M-Q apresentou poros mais bem definidos se comparados com as outras membranas, bem como a espessura de suas fibras que apontaram maior número de ocorrências no intervalo em torno de 0,15 μm, diferentemente de M-CMQD (dentro de um intervalo de intervalo de 5 a 10 μm) e M-CMQH (em torno de 5 μm).

## 5.5 ANÁLISE POR TGA/DTG

A análise termogravimétrica (TGA) foi aplicada para analisar a estabilidade térmica das amostras na forma de pó (Q, NaCMQD e NaCMQH) e na forma de membrana (M-Q, M-CMQD, M-CMQH) através da avaliação de suas alterações de massa em função da temperatura. A termogravimetria derivada (DTG) foi empregada para visualizar os intervalos de temperatura correspondentes à variação de massa presentes nas curvas de TGA. O ponto de inflexão em cada curva de DTG corresponde à tempe-

ratura em que a respectiva reação está ocorrendo mais rapidamente [49, 99, 100]

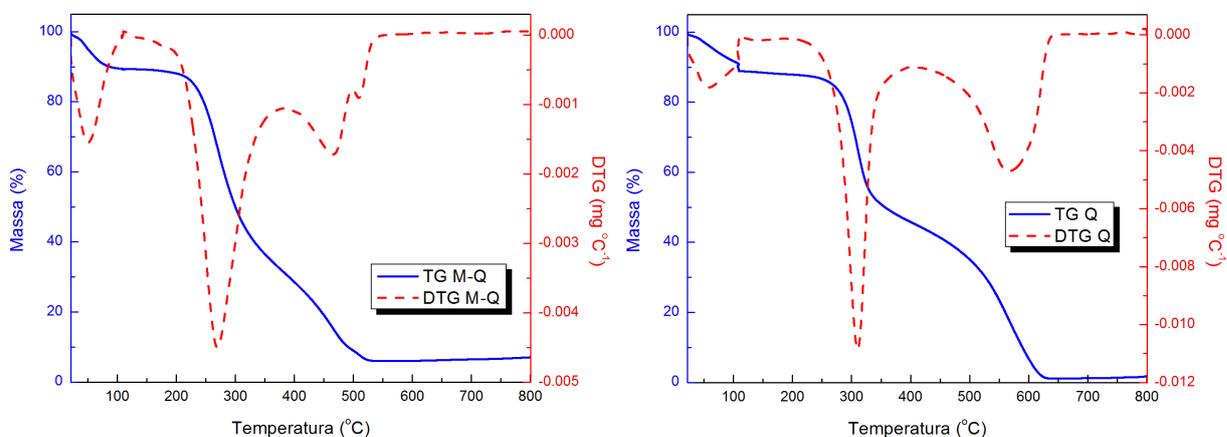
As curvas termogravimétricas das amostras de Q, M-Q NaCMQD, M-CMQD, NaCMQH e M-CMQH estão representadas em **Figura 5.33**, **Figura 5.34** e **Figura 5.35**. Tais curvas são divididas em dois estágios principais localizados nos seguintes intervalos:

- 25 °C – 110 °C: corresponde ao desprendimento de água adsorvida;
- 200 °C – 400 °C: corresponde à pirólise do polímero onde ocorrem duas etapas de decomposição: a primeira dentro do intervalo de 200°C – 400 °C e a segunda acima de 400 °C, no qual há perda de massa resultante da decomposição oxidativa dos subprodutos do primeiro estágio de decomposição.

### 5.5.1 Análise das Curvas de TGA/DTG das Amostras Q e M-Q

A partir das curvas de TGA e DTG das amostras de quitosana em pó (Q) e membrana (M-Q) (**Figura 5.33**), observou-se que a quitosana apresentou uma proporção similar de umidade em ambas as formas físicas (11%). Tal similaridade não foi notada nos principais eventos ( $T_{\max}$  e  $T_{\text{final}}$ ) apontados pela DTG, o que pode estar relacionado tanto com as formas físicas estudadas (pó e membrana), quanto com à sua cristalinidade.

**Figura 5.33:** Curvas termogravimétricas (linha contínua) das amostras de Q (à esquerda) e M-Q (à direita) e suas derivadas (linha tracejada).



Fonte: Elaboração própria.

**Tabela 5.9:** Valores de temperatura inicial de degradação ( $T_{\text{onset}}$ ), temperatura de máxima degradação ( $T_{\text{max}}$ ), temperatura final de degradação ( $T_{\text{final}}$ ) e porcentagem de perda de massa da amostra Q e M-Q

Amostra	$T_{\text{onset}}$ (°C)	$T_{\text{max}}$ (°C)	$T_{\text{final}}$ (°C)	Teor de água (%)	Perda de massa (%)	Teor de cinzas (%)
Q	283	310	567	11	87	2
M-Q	233	270	509	11	83	6

Fonte: Elaboração própria.

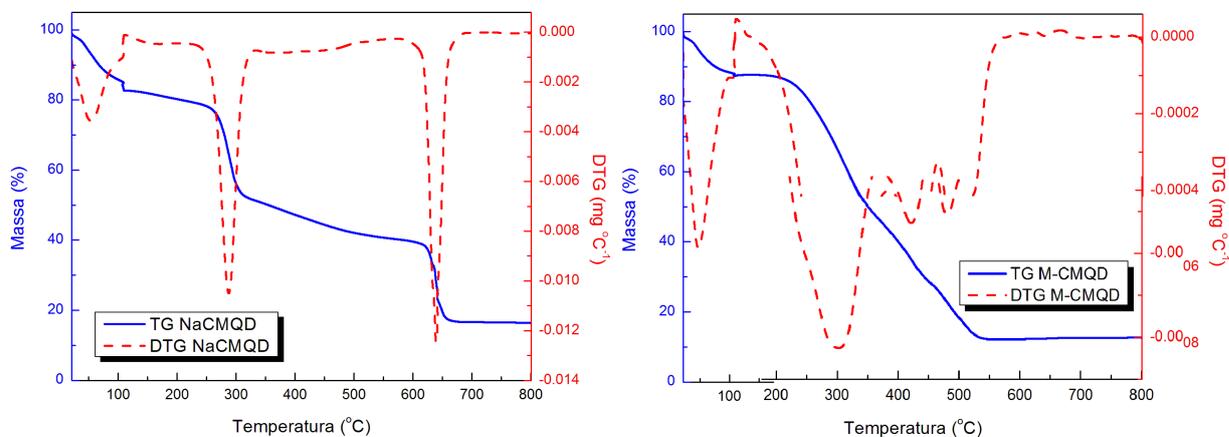
Segundo Paoli (2009) [101], o grau de cristalinidade do polímero influencia indiretamente as reações que ocorrem durante o seu processo de degradação e quando esse polímero apresenta baixa cristalinidade, ou seja, alto grau de enovelamento, permite uma maior probabilidade na quebra das ligações químicas. De acordo com a **Tabela 5.7**, a amostra Q possui maior grau de cristalinidade em relação à M-Q: 45% e 35%, respectivamente. Com isso, Q apresentou maior estabilidade térmica por possuir baixo grau de enovelamento (ou seja, alta cristalinidade) e menor teor de cinzas (2%), em relação à amostra M-Q. Similarmente, Signini e Campana-Filho (2001) [97] encontraram valores em torno de 2% para a massa residual de quitosanas que foram purificadas de diferentes formas.

### 5.5.2 Análise das Curvas de TG/DTG das Amostras NaCMQD e M-CMQD

As curvas de TG e DTG para as amostras NaCMQD e M-CMQD apresentadas abaixo evidenciam as temperaturas dos eventos térmicos, assim como o teor de água perdido durante o primeiro estágio da curva termogravimétrica e a massa da amostra degradada durante o segundo estágio correspondente à pirólise.

Através da curva de DTG (linha vermelha tracejada na **Figura 5.34**), observa-se que o evento térmico caracterizado pela máxima degradação do polímero ( $T_{\text{max}}$ ) possui comportamento diferente nas duas amostras. Para a NaCMQD, a curva é acentuada indicando que o evento ocorre rapidamente. O mesmo evento ocorre de forma mais lenta na M-CMQD, o que pode estar atribuído à sua cristalinidade (como pôde

**Figura 5.34:** Curvas termogravimétricas (linha contínua) das amostras de NaCMQD (à esquerda) e M-CMQD (à direita) e suas derivadas (linha tracejada).



Fonte: Elaboração própria.

ser observado na amostra M-Q), além da forma física da amostra [13, 81]. Os valores de  $T_{\text{onset}}$ ,  $T_{\text{max}}$  e  $T_{\text{final}}$  estão apresentados na **Tabela 5.10**. A perda de massa correspondente à primeira fase de aquecimento das amostras é referente à perda de água adsorvida no material, onde é maior na amostra em pó (NaCMQD, 18%), bem como o seu teor de cinzas que está associado material resultante da decomposição térmica, como o íon de sódio encontrado na forma em pó das carboximetilquitosanas. Novamente, a amostra em pó (NaCMQD) apresentou maior estabilidade térmica em relação à membrana produzida com o mesmo material, do mesmo modo como apresentado pela amostra Q e relação à sua membrana M-Q.

**Tabela 5.10:** Valores de temperatura inicial de degradação ( $T_{\text{onset}}$ ), temperatura de máxima degradação ( $T_{\text{max}}$ ), temperatura final de degradação ( $T_{\text{final}}$ ) e porcentagem de perda de massa da amostra NaCMQD e M-CMQD

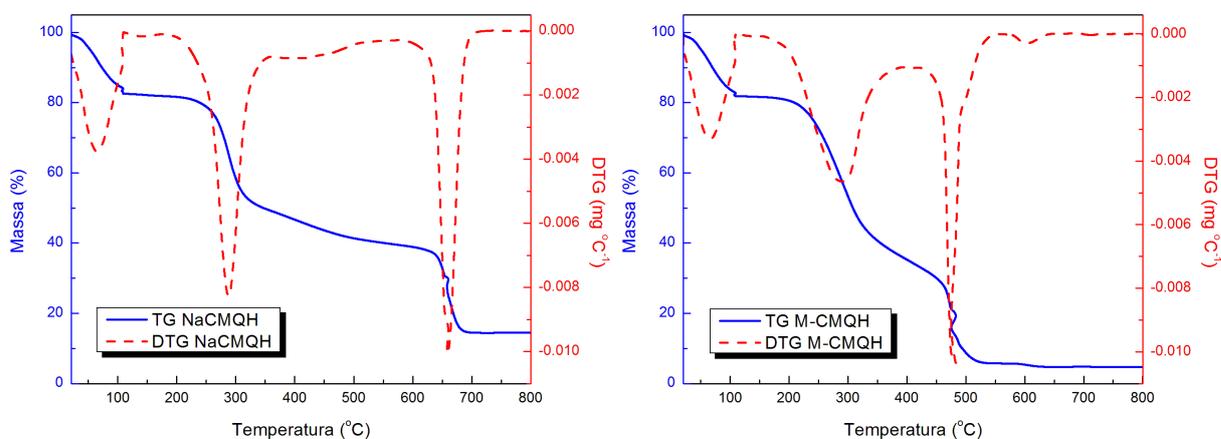
Amostra	$T_{\text{onset}}$ (°C)	$T_{\text{max}}$ (°C)	$T_{\text{final}}$ (°C)	Teor de água (%)	Perda de massa (%)	Teor de cinzas (%)
NaCMQD	269	288	639	18	65	17
M-CMQD	220	302	510	12	77	11

Fonte: Elaboração própria.

### 5.5.3 Análise das Curvas de TG/DTG das Amostras NaCMQH e M-CMQH

As amostras NaCMQH e M-CMQH (ver **Figura 5.35**) manifestaram comportamentos semelhantes às amostras anteriores (NaCMQD e M-CMQD) em relação à perda de massa às temperaturas dos principais eventos.

**Figura 5.35:** Curvas termogravimétricas (linha contínua) das amostras de NaCMQH (à esquerda) e M-CMQH (à direita) e suas derivadas (linha tracejada).



Fonte: Elaboração própria.

As amostras NaCMQH e M-CMQH apresentaram comportamentos térmicos similares às amostras NaCMQD e M-CMQD mostradas na **Figura 5.34** e **Tabela 5.10**, bem como a maior estabilidade térmica apresentada na forma de pó. Entretanto, as porcentagens correspondentes ao teor de água, perda de massa e teor de cinzas apresentados na **Tabela 5.11** indicam que, além do grau de cristalinidade, a diferença entre as estruturas moleculares (analisadas por RMN  $^{13}\text{C}$  na **Figura 5.1** e **Figura 5.2**) das CMQD's e CMQH's influenciaram no comportamento térmico.

Comparando as duas amostras em pó de carboximetilquitosana (NaCMQ's) e as duas em membrana (M-CMQ's), pode-se observar que a forma física influenciou na determinação de suas temperaturas inicial e final (menores nas M-CMQs, 220 a 233 °C e 483 a 510 °C, respectivamente) e na determinação da degradação da massa (maiores nas M-CMQ's, 77%). Já a diferença encontrada entre as amostras Q's e CMQ's nos principais eventos térmicos está atribuída ao fato das CMQ's possuírem um maior número de ligações provenientes dos grupos laterais inseridos em virtude da carboximetilação,

como pode ser visto em **Figura 2.3** e **Figura 2.4**, tornando necessária uma maior quantidade de energia para a quebra dessas ligações [101].

**Tabela 5.11:** Valores de temperatura inicial de degradação ( $T_{\text{onset}}$ ), temperatura de máxima degradação ( $T_{\text{max}}$ ), temperatura final de degradação ( $T_{\text{final}}$ ) e porcentagem de perda de massa da amostra NaCMQH e M-CMQH

Amostra	$T_{\text{onset}}$ (°C)	$T_{\text{max}}$ (°C)	$T_{\text{final}}$ (°C)	Teor de água (%)	Perda de massa (%)	Teor de cinzas (%)
NaCMQH	261	288	659	17	68	15
M-CMQH	233	290	483	18	77	5

Fonte: Elaboração própria.

Ao ser estabilizado termicamente, o polímero adquiriu energia suficiente para quebrar as ligações intramoleculares ocasionando a sua degradação térmica. Entretanto, quando o polímero apresenta baixa cristalinidade, como é o caso das membranas M-CMQ's, seus movimentos macromoleculares são restritos devido ao alto grau de envelhecimento. Quanto maior for esse grau de envelhecimento, menor será a sua dissipação térmica e, assim, promovendo a quebra de ligações químicas em temperaturas baixas [13, 101].

## 6 CONCLUSÃO

A partir dos processos de purificação das amostras em pó (Q, NaCMQD e NaCMQH), realizou-se as sínteses das membranas (M-Q, M-CMQD e M-CMQH) que ocorreram de maneira satisfatória. As técnicas utilizadas para a obtenção de dados foram: Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13 (RMN  $^{13}\text{C}$ ), Difração de Raios X (DRX), Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Análise Termogravimétrica/Termogravimetria Derivada (TGA/DTG).

Através dos espectros obtidos por meio do RMN  $^{13}\text{C}$ , foi calculado grau de acetilação ( $\overline{GA}$ ) e substituição ( $\overline{GS}$ ) do C-3, C-6 e N para a determinação da estrutura molecular das amostras de N,O-carboximetilquitosana sódica. A amostra NaCMQD apresentou dois tipos de estrutura por conta dos seus grupos laterais. Com isso, os seus sítios reativos, representados por "R", foram compostos por:  $R_1 = -\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{O}^-\text{Na}^+$ ,  $R_2 = -\text{H}$  e  $R_3 = -\text{H}$ ; e em outro monômero:  $R_1 = -\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{O}^-\text{Na}^+$ ,  $R_2 = -\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{O}^-\text{Na}^+$  e  $R_3 = -\text{H}$ . Já a amostra NaCMQH apresentou apenas um tipo de estrutura:  $R_1 = -\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{O}^-\text{Na}^+$ ,  $R_2 = -\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{O}^-\text{Na}^+$  e  $R_3 = -\text{H}$ . Deste modo, foi possível estabelecer a estrutura molecular para as CMQ's.

Os difratogramas das amostras em forma de pó (Q, NaCMQD e NaCMQH) e membrana (M-Q, M-CMQD e M-CMQH) foram obtidos através da DRX, onde as amostras Q e M-Q apresentaram maior quantidade de picos cristalinos. Já as CMQ's, tanto em pó, quanto em membrana, apresentaram uma redução e alargamento de picos atribuídas ao alto grau de desordem. Tal fato pode ser comprovado através percentual de cristalinidade. As amostras sob a forma de pó, Q, NaCMQD e NaCMQH, apresentaram percentual de cristalinidade em torno de 45%, 40% 30% , respectivamente. Já as amostras sob a forma de membrana, M-Q, M-CMQD e M-CMQH, a cristalinidade ficou em torno de 35%, 30% e 30%, respectivamente. Entre as amostras em pó e membrana, Q e M-Q apresentaram maior percentual de cristalinidade devido ao tamanho dos seus grupos laterais que, por serem menores que os grupos apresentados pelas CMQ's, permitiu uma melhor acomodação de suas cadeias poliméricas. Já as CMQ's, apresentaram menor cristalinidade devido aos grupos laterais inseridos em suas estruturas por consequência da carboximetilação.

Os parâmetros de cela unitária ( $a$ ,  $b$ ,  $c$ ,  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , volume e grupo espacial) das amostras Q's e CMQ's foram definidos através do Método de Le Bail. Desta maneira, observou-se que, além de ter influenciado no grau de cristalinidade das amostras, a carboximetilação da quitosana interviu no aumento dos parâmetros de cela  $a$  e  $b$  das CMQ's devido a necessidade de acomodação dos grupos laterais inseridos, como constatado no RMN  $^{13}\text{C}$ .

As micrografias da Q, NaCMQD e NaCMQH apresentaram grãos com tamanhos variados e geometria destituída de um padrão. Já as membranas M-Q, M-CMQD e M-CMQH apresentaram poros com tamanhos variados, mas todos classificados como macroporos (poros com tamanhos maiores que 50 nm), sendo que a amostra M-Q apresentou poros mais bem definidos, pois o processo de purificação e síntese para obtenção dessa membrana influenciou a forma e tamanho desses poros. O mesmo padrão de poros não foi encontrado nas M-CMQ's devido ao extenso processo de purificação aplicado, bem como a síntese de suas membranas. As espessuras de suas fibras foram contabilizadas através do programa *ImageJ* e analisadas por meio de um histograma onde classificou as espessuras das fibras obtidas de acordo com a frequência encontrada. Assim, as espessuras das fibras foram encontradas com maior frequência em torno de  $0,15\ \mu\text{m}$  (M-Q), entre  $5$  e  $10\ \mu\text{m}$  (M-CMQD) e em torno de  $5\ \mu\text{m}$  (M-CMQH).

O comportamento térmico das amostras em pó e membrana submetidas a variações de temperatura foi verificado através da Análise Termogravimétrica (TGA) e sua Derivada Termogravimétrica (DTG). Os principais eventos térmicos ( $T_{onset}$ : temperatura inicial de degradação do polímero;  $T_{max}$ : temperatura máxima de degradação; e  $T_{final}$ : temperatura final de degradação) ocorridos durante o aquecimento das amostras sofreram influência da forma física das amostras analisadas, bem como o seu grau de cristalinidade (quanto maior o grau de enovelamento das cadeias do polímero, menos cristalino ele é). Os pós apresentaram maior estabilidade térmica em relação às membranas, com destaque para a amostra Q, cuja temperatura inicial de degradação foi de  $283\ ^\circ\text{C}$ . Entre as membranas, as amostras M-Q e M-CMQH apresentaram estabilidades térmicas similares indicando que necessitaram de uma quantidade de energia maior para realizar a quebra das ligações em sua estrutura.

Desta forma, espera-se ter contribuído através desta pesquisa com dados es-

truturais e morfológicos que auxiliem na caracterização desta classe de materiais poliméricos.

## REFERÊNCIAS

- 1 WU, Y. et al. Preparation and characterization of chitosan–poly(acrylic acid) polymer magnetic microspheres. **Polymer**, v. 47, n. 15, p. 5287–5294, 2006.
- 2 LARANJEIRA, M. C. M.; FÁVERE, V. T. Quitosana: biopolímero funcional com potencial industrial biomédico. **Química Nova**, v. 32, p. 672–678, 2009.
- 3 FIAMINGO, A. **Membranas porosas de N,O-carboximetilquitosana/quitosana para aplicação na prevenção de adesões pericárdicas pós-cirúrgicas**. Dissertação (Mestrado) — Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012.
- 4 LOPES, J. B. et al. Synergism between keratinocyte growth factor and carboxymethyl chitosan reduces pericardial adhesions. **Annals Thoracic Surgery**, v. 90, n. 2, p. 566–572, 2010.
- 5 JAMEELA, S. R. et al. Progesterone-loaded chitosan microspheres: a long acting biodegradable controlled delivery system. **Journal of Controlled Release**, v. 52, n. 1-2, p. 17–24, 1998.
- 6 DU, J.; SUN, R.; ZHANG, S. Novel polyelectrolyte carboxymethyl konjac glucomannan–chitosan nanoparticles for drug delivery. **Macromolecular Rapid Communications**, v. 25, n. 1, p. 954–958, 2004.
- 7 ANAL, A. K.; STEVENS, W. F.; REMUNAN, C. Iontropic cross-linked chitosan microspheres for controlled release of ampicillin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 312, n. 1-2, p. 166–173, 2006.
- 8 MUZZARELLI, R. A. A. Genipin-crosslinked chitosan hydrogels as biomedical and pharmaceutical aids. **Carbohydrate Polymers**, v. 77, n. 1, p. 1–9, 2009.
- 9 CARTIER, N.; DOMARD, A.; CHANZY, H. Single crystals of chitosan. **International Journal of Biological Molecules**, v. 12, p. 289–294, 1990.
- 10 OKUYAMA, K. et al. Structural diversity of chitosan and its complexes. **Carbohydrate Polymers**, v. 21, n. 3, p. 237–247, 2000.
- 11 RINAUDO, M. Chitin and chitosan: Properties and applications. **Progress in Polymer Science**, v. 31, n. 7, p. 603–632, 2006.
- 12 LISBÃO, A. S. **Estrutura e propriedades dos polímeros**. 1<sup>st</sup>. ed. São Paulo: EdUFSCar, 2004. 168 p.
- 13 CANEVAROLO JR., S. V. **Ciência dos Polímeros: Um texto básico para tecnólogos e engenheiros**. 2<sup>a</sup>. ed. São Paulo: Artliber Editora, 2006. 280 p.
- 14 NICHOLSON, J. W. **The Chemistry of Polymer**. 3<sup>rd</sup>. ed. [S.l.]: RSC Publishing, 2006.

- 15 AKCELRUD, L. **Fundamentos da Ciência dos Polímeros**. São Paulo: Manole, 2007. 288 p.
- 16 CALLISTER, W. D. **Materials Science and Engineering: An introduction**. 7<sup>th</sup>. ed. [S.l.]: John Wiley & Sons, 2007. 285 p.
- 17 MUZZARELLI, R. A. A. **Chitin**. 1<sup>st</sup>. ed. Great Britain: Pergamon Press, 1977. 310 p.
- 18 JENKINS, A. D. et al. Glossary of basic terms in polymer science. **Pure and Applied Chemistry**, v. 68, n. 12, p. 2287–2311, 1996.
- 19 HUDSON, S. M.; SMITH, C. Polysaccharides: Chitin and Chitosan: Chemistry and Technology of Their Use as Structural Materials. In: KAPLAN, D. L.; DAVID, L. (Ed.). **Biopolymers from Renewable Resources**. Berlin: Springer-Verlag, 1998. cap. 4, p. 96–118.
- 20 CAMPANA-FILHO, S. P. et al. Extração, estruturas e propriedades de  $\alpha$ - e  $\beta$ -quitina. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 644–650, 2007.
- 21 DASH, M. et al. Chitosan – a versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. **Progress in Polymer Science**, v. 36, n. 8, p. 981–1014, 2011.
- 22 RAABE, D.; SACHS, C.; ROMANO, P. Preferred crystallographic texture of  $\alpha$ -chitin as a microscopic and macroscopic design principle of the exoskeleton of the lobster *Homarus americanus*. **Acta Biomaterialia**, v. 3, p. 822–895, 2007.
- 23 ZHANG, Y. et al. Determination of the degree of deacetylation of chitin and chitosan by X-ray powder diffraction. **Carbohydrate Research**, v. 340, n. 11, p. 1914–1917, 2005.
- 24 KUMIRSKA, J. et al. Biomedical activity of chitin/chitosan based materials – Influence of physicochemical properties apart from molecular weight and degree of N-acetylation. **Polymers**, v. 3, p. 1875–1901, 2011.
- 25 SANTOS, J. E. et al. Caracterização de quitosanas comerciais de diferentes origens. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 13, n. 4, p. 242–249, 2003.
- 26 SHAHIDI, F.; ARACHCHI, J. K. V.; JEON, Y. J. Food applications of chitin and chitosans. **Trends in Food Science & Technology**, v. 10, n. 2, p. 37–51, 1999.
- 27 VENKATESAN, J. et al. Chitin and chitosan composites for bone tissue regeneration. In: KIM, S. K. (Ed.). **Advances in Food and Nutrition Research: Marine Carbohydrates – Fundamentals and Applications, Part B**. [S.l.]: Elsevier Inc, 2014. v. 73, cap. 5, p. 59–81.
- 28 FRÁGUAS, R. M. Caracterização química e efeito cicatrizante de quitosana, com baixos valores de massa molar e grau de acetilação, em lesões cutâneas. **Polímeros**, v. 25, p. 205–211, 2015.
- 29 KENNEDY, R. et al. Prevention of experimental postoperative peritoneal adhesions by N,O-carboxymethyl chitosan. **Surgery**, v. 120, n. 5, p. 866–870, 1996.

- 30 LIU, Y. F. et al. Preparation and characterization of glutaraldehyde cross-linked *O*-carboxymethylchitosan microsphere for controlled delivery of pazufloxacin mesilate. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 41, n. 1, p. 87–93, 2007.
- 31 DAROZ, L. R. D. et al. Prevenção de aderências pericárdicas pós-operatórias com uso de carboximetilquitosana termoestéril. **Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular**, v. 23, n. 4, p. 480–487, 2008.
- 32 ZHOU, J. et al. Reduction in postsurgical adhesion formation after cardiac surgery by application of *N,O*-carboxymethyl chitosan. **Acquired Cardiovascular Disease**, v. 140, n. 4, p. 801–806, 2010.
- 33 CHEN, X. G.; PARK, H. J. Chemical characteristic of *O*-carboxymethyl chitosans related to the preparation conditions. **Carbohydrate Polymers**, v. 53, p. 355–359, 2003.
- 34 COSTAIN, D. J. et al. Prevention of postsurgical adhesion with *N,O*-carboxymethyl chitosan: Examination of the most efficacious preparation and the effect of *N,O*-carboxymethyl chitosan on postsurgical healing. **Surgery**, v. 121, n. 3, p. 314–319, 1997.
- 35 DIAMOND, M. P. C. Reduction of postoperative adhesion by *N,O*-carboxymethylchitosan: a pilot study. **Fertility and Sterility**, v. 80, p. 631–636, 2003.
- 36 ZHOU, J.; ELSON, C.; LEE, T. D. G. Reduction in postoperative adhesion formation and re-formation after an abdominal operation with the use of *N,O*-carboxymethyl chitosan. **Surgery**, v. 135, p. 307–312, 2004.
- 37 CANNATA, A. et al. Postsurgical intrapericardial adhesions: Mechanisms of formation and prevention. **Annals Thoracic Surgery**, v. 95, n. 5, p. 1818–1826, 2013.
- 38 LIH E. AND, O. S. H. et al. Polymers for cell/tissue anti-adhesion. **Progress in Polymer Science**, v. 44, p. 28–61, 2015.
- 39 JONES, R. G. et al. **Compendium of Polymer Terminology and Nomenclature: IUPAC Recommendations**. 2<sup>nd</sup>. ed. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 2008, 443 p.
- 40 HILAL, N.; ISMAIL, A. F.; WRIGHT, C. **Membrane Fabrication**. [S.l.]: CRC Press, 2015. 758 p.
- 41 SCHNABLEGGER, H.; SINGH, Y. **The SAXS Guide: getting acquainted with the principles**. 2<sup>nd</sup>. ed. Austria: Anton Paar, 2011. 98 p.
- 42 WARD, B. C.; PANITCH, A. Abdominal adhesions: current and novel therapies. **Journal of Surgical Research**, v. 165, p. 91–111, 2011.
- 43 CHEN, Z. et al. A novel bioabsorbable pericardial membrane substitute to reduce postoperative pericardial adhesions in a rabbit model. **Interactive CardioVascular and Thoracic Surgery**, p. 1–8, 2015.
- 44 MCNAUGHT, A. D.; WILKINSON, A. **Compendium of Chemical Terminology (the “Gold Book”)**. 2<sup>nd</sup>. ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1997.

- 45 ROUQUEROL, J. et al. Recommendations for the characterization of porous solids. **Pure and Applied Chemistry**, v. 66, n. 8, p. 1739–1758, 1994.
- 46 RICHARDSON, E. S. et al. The Pericardium. In: IAIZZO, P. A. (Ed.). **Handbook of Cardiac Anatomy, Physiology, and Devices**. [S.l.]: Humana Press, 2009. cap. 8, p. 125–136.
- 47 MEDICINA Geriátrica: Pericardite aguda nos idosos. Disponível em: [www.medicinageriatrica.com.br/2007/08/19/pericardite/](http://www.medicinageriatrica.com.br/2007/08/19/pericardite/). Acesso em: 15 ago. 2015.
- 48 LOPES, J. B. et al. Keratinocyte growth factor: a new mesothelial targeted therapy to reduce postoperative pericardial adhesions. **European Journal of Cardio-Thoracic Surgery**, v. 35, n. 2, p. 313–318, 2009.
- 49 ABREU, F. R.; CAMPANA-FILHO, S. P. Characteristics and properties of carboxymethylchitosan. **Carbohydrate Polymers**, v. 75, p. 214–221, 2009.
- 50 MACEDO JR., F. C. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de  $^{13}\text{C}$  no estudo de rotas biossintéticas de produtos naturais. **Química Nova**, v. 30, p. 116–124, 2007.
- 51 MOURYA, V. K.; INAMDAR, N. N.; TIWARI, A. Carboxymethyl chitosan and its applications. **Advanced Materials Letters**, v. 1, n. 1, p. 11–33, 2010.
- 52 PAIVA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S. **Introdução à Espectroscopia**. [tradução: Pedro Barros], São Paulo: Cengage Learning, 2013.
- 53 RINAUDO, M. Substituent distribution on *O,N*-carboxymethylchitosans by  $^1\text{H}$  and  $^{14}\text{C}$  N. M. R. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 14, n. 3, p. 112–128, 1992.
- 54 ASHCROFT, N. W.; MERNIN, N. D. **Solid State Physics**. 1<sup>st</sup>. ed. Nova York: Cengage Learning, 1976. 826 p.
- 55 CULLITY, B. D. **Elements of X-ray diffraction**. 2<sup>nd</sup>. ed. New York: Addison-Wesley, 1978. 555 p.
- 56 KITTEL, C. **Introduction to solid state physics**. 7<sup>th</sup>. ed. New York: John Wiley & Sons, 1996. 674 p.
- 57 DE ROSA, C.; AURIEMMA, F. **Crystals and crystallinity in polymers: Diffraction Analysis of Ordered and Disordered Crystals**. New Jersey: John Wiley & Sons, 2013. 480 p.
- 58 RODRIGUES, J. D. A. **Raios X: difração e espectroscopia**. São Carlos: EdUFSCar, 2013. 51 p. (Série APONTAMENTOS).
- 59 SMITH, W. F.; HASHEMI, J. **Foundations of Materials Science and Engineering**. 5<sup>th</sup>. ed. United State of America: The McGraw-Hill Companies, 2009. 1056 p.
- 60 KLUG, H. P.; ALEXANDER, L. E. **X-Ray Diffraction Procedures: for polycrystalline and amorphous materials**. 2<sup>nd</sup>. ed. New York: John Wiley & Sons, 1974. 992 p.

- 61 SANCHES, E. A. **Estudos de XRD e SAXS aplicados à polianilina e à poli(*o*-metoxianilina)**. Tese (Doutorado) — Instituto de Física de São Carlos, Instituto de Química de São Carlos, Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2011.
- 62 WANG, Y. et al. Crystalline structure and thermal property characterization of chitin from Antarctic krill (*Euphausia superba*). **Carbohydrate Polymers**, v. 92, n. 1, p. 90–97, 2013.
- 63 TERINTE, N.; IBBETT, R.; SCHUSTER, K. C. Overview on native cellulose and microcrystalline cellulose i structure studied by X-ray diffraction (WADX): comparison between measurements technique. **Lenzinger Berichte**, v. 89, p. 118–131, 2011.
- 64 RAMBO, M. K. D.; FERREIRA, M. M. Determination of cellulose crystallinity of banana residues using near infrared spectroscopy and multivariate analysis. **Journal of the Braziliam Chemical Society**, v. 26, n. 7, p. 1491–1499, 2015.
- 65 PEAK Fitting Module. OriginLab Corporation, One Roundehouse Plaza, Northampton.
- 66 MICROCAL Origin Software. Version 7.5. OriginLab Corporation, One Roundehouse Plaza, Northampton.
- 67 GETELINA, J. C. A.; MATSUDA, C. K.; MIYAHARA, R. Y. **Análise de difratogramas através do método de refinamento estrutural**. Anais II SIEPE — Semana de Integração Ensino, Pesquisa e Extensão: [s.n.], 2011.
- 68 RODRÍGUEZ-CARVAJAL, J. Recent advances in magnetic structure determination. **Physica B: Condensed Matter**, v. 192, p. 55–69, 1993.
- 69 RIETVELD, H. M. A profile refinement method for nuclear and magnetic structures. **Journal of Applied Crystallography**, v. 2, n. 2, p. 65–71, 2006.
- 70 LEBAIL, A.; DUROY, H.; FOURQUET, J. L. . 1998). ab- initio structure determination of  $Li_2O_6$  by x-ray powder diffraction. **Materials Research Bulletin**, v. 23, n. 3, p. 447–452, 1998.
- 71 PAWLEY, G. S. Unit-cell refinement from powder diffraction scans. **Journal Applied Crystallography**, v. 14, p. 357–361, 1981.
- 72 JANSEN, E.; SCHAFER, W.; WILL, G. R-values in analysis of poder diffraction data using Rietveld refinement. **Journal of Applied Crystallography**, v. 27, p. 492–496, 1994.
- 73 THOMPSON, P.; COX, D.; HASTINGS, J. Rietveld refinement of Debye-Scherrer synchrotron x-ray data from  $Al_2O_3$ . **J. Appl. Cryst.**, v. 20, p. 79–83, 1987.
- 74 ARAÚJO, J. C. D. et al. Síntese da hidroxiapatita e refinamento estrutural por difração de raios X. **Química Nova**, v. 30, n. 8, p. 1853–1859, 2007.
- 75 RODRÍGUEZ-CARVAJAL, J. Recent developments of the program FullProf. **Newsletter: Comission on Powder Diffraction (IUCr)**, v. 26, p. 12–19, 2001.

- 76 RODRÍGUEZ-CARVAJAL, J. FullProf Program. version 2005. Laboratoire Léon Brillouin (CEA-CNRS), [S.l.].
- 77 ROISNEL, T.; RODRÍGUEZ-CARVAJAL, J. WinPLOT: a Windows tool for powder diffraction patterns analysis. materials Science Forum, Proceedings of the 7<sup>th</sup> European Powder Diffraction Conference (EPDIC 7). 2000. p. 118–123.
- 78 GONZÁLEZ-PLATAS, J.; RODRÍGUEZ-CARVAJAL, J. **GFourier: A Windows/Linux program to calculate and display Fourier maps**. Program available within the FullProf Suite: [s.n.].
- 79 SILVA, A. et al. Structural and morphological characterization of Poly(o-ethoxyaniline) Emeraldine-salt form using FTIR, XRD, Le Bail method and SEM. **Journal of Molecular Structure**, v. 1071, p. 1–5, 2014.
- 80 HELENE, O. A. M.; VANIN, V. R. **Tratamento estatístico de dados em física experimental**. 2<sup>a</sup>. ed. São Paulo: Edgard Blücher, 1991. 105 p.
- 81 GALLAGHER, P. K.; BROWN, M. E. **Handbook of Thermal Analysis & Calorimetry**. Amsterdam: Elsevier, 1998. 755 p.
- 82 MORAIS, S. B. P. et al. Efeito do grau de acetilação na conformação e solubilidade de filamentos finitos de quitina e quitosana. in: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 34<sup>a</sup>, Florianópolis. resumo...Sociedade Brasileira de Química (SBQ). 2011. 1 p.
- 83 SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 7<sup>th</sup>. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2007. 490 p.
- 84 ABREU, F. R.; CAMPANA-FILHO, S. P. Preparation and characterization of carboxymethyl chitosan. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 15, p. 79–83, 2005.
- 85 TAO, S. et al. Preparation of carboxymethyl chitosan sulfate for improved cell proliferation of skin fibroblasts. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 54, p. 160–165, 2013.
- 86 CLARK, G. L.; SMITH, A. F. X-ray diffraction studies of chitin, chitosan, and derivatives. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 40, p. 863–879, 1936.
- 87 OGAWA, K. Effect of heating an aqueous suspension of chitosan on the crystallinity and polymorphs. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 55, n. 9, p. 2375–2379, 1991.
- 88 OGAWA, K.; YUI, T.; MIYA, M. Dependence on the preparation procedure of the polymorphism and crystallinity of chitosan membranes. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 56, p. 858–862, 1992.
- 89 MAZEAU, K.; WINTER, W. T.; CHANZY, H. Molecular and crystal structure of a high-temperature polymorph of chitosan from electron diffraction data. **Macromolecules**, v. 27, p. 7606–7612, 1994.
- 90 OKUYAMA, K. et al. Structural study of anhydrous tendon chitosan obtained via chitosan/acetic acid complex. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 26, n. 4, p. 285–293, 1999.

- 91 OGAWA, K.; YUI, T.; OKUYAMA, C. K. Three D structures of chitosan. **International Journal of Biological**, v. 34, n. 1-2, p. 1–8, 2004.
- 92 MUZZARELLI, R. A. A. Human enzymatic activities related to the therapeutic administration of chitin derivatives. **Cellular and Molecular Life Science**, v. 53, n. 2, p. 131–140, 1997.
- 93 CARLSTRÖM, D. The crystal structure of  $\alpha$ -chitin (Poly-*N*-acetyl-D-glucosamine). **The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology**, v. 3, p. 669–683, 1957.
- 94 OGAWA, K.; INUKAI, S. X-ray diffraction study of sulfuric, nitric, and halogen acid salts of chitosan. **Carbohydrate Research**, v. 160, p. 425–433, 1987.
- 95 BEZERRA, E. B. et al. Obtenção e caracterização de membranas obtidas a partir de blendas poliméricas de poliamida 6. **Polímeros**, v. 24, n. 3, p. 381–387, 2014.
- 96 MOURA, M. R. et al. Preparação de novos nanobiocompósitos comestíveis ativos contendo nanoemulsão de canela e pectina. **Polímeros**, v. 24, n. 4, p. 486–490, 2014.
- 97 SIGNINI, R.; CAMPANA-FILHO, S. P. Características e propriedades de quitosanas purificadas nas formas neutra, acetato e cloridrato. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 11, n. 2, p. 58–64, 2001.
- 98 SUH, J. K. F.; MATTHEW, H. W. T. Application of chitosan-based polysaccharide biomaterials in cartilage tissue engineering: a review. **Biomaterials**, v. 21, n. 24, p. 2589–2598, 2000.
- 99 SREEDHAR, B. et al. Preparation and characterization of HAP/carboxymethyl chitosan nanocomposites. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 105, n. 2, p. 928–934, 2007.
- 100 PEREIRA, F. S. et al. Thermal studies of chitin-chitosan derivatives. **Journal of Thermal Analysis Calorimetry**, v. 114, p. 321–327, 2013.
- 101 DE PAOLI, M. A. **Degradação e estabilização de polímeros**. São Paulo: Artliber, 2009. 286 p.