

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS

**Desenvolvimento e Caracterização de filmes de
quitosana reforçados com *whiskers* de beta-quitina**

Ana Paula Prudente e Silva

São Carlos

2017

ANA PAULA PRUDENTE E SILVA

**Desenvolvimento e Caracterização de filmes de
quitosana reforçados com *whiskers* de beta-quitina**

Monografia apresentada ao Instituto de Química de São Carlos,
Universidade de São Paulo, como trabalho de conclusão de curso.

Professor Responsável : Prof. Dr. Sérgio Paulo Campana Filho

São Carlos

2017

Agradecimentos

Primeiramente agradeço imensamente a Deus por ter colocado esse sonho no meu coração e por ter me acalmado com sua presença nos momentos mais difíceis e deixar transparecer seu amor nos momentos mais alegres.

A meus pais, Suely e Paulo, que são as pessoas que eu mais quero dar orgulho no mundo e que sempre estiveram ao meu lado me dando apoio psicológico e financeiro durante toda minha graduação. Além de acreditarem em mim sempre, mesmo quando eu não acreditava.

A minha irmã Ana Carolina e meus tios Gildo e Juarez e minha amiga Cássia por sempre me acolherem nos finais de semana com felicidade.

A meus amigos da UFU, Ana Beatriz, Lorraine e Filipe por serem verdadeiros amigos e que apesar da distância sempre estiveram ao meu lado.

Aos meus melhores amigos do Grupo de Oração (GOU), Frank e Joice por todos os momentos de oração, choros e risadas que vivemos dentro e fora da universidade.

Aos meus orientadores, Daniella Morgado e Odílio Assis e amigos e técnicos da Embrapa Instrumentação, Bruna, Tais, Silviane e Adriana que me proporcionaram ampliar meus conhecimento técnicos e científicos.

A minha orientadora Valérie Thierry na França que me deu a oportunidade de realizar um estágio em um laboratório francês e ao meu tutor Quentin por todo o auxílio.

Ao professor Sérgio Campana que aceitou ser meu orientador para gerar este trabalho e aos doutorandos, Danilo e Andrea que me auxiliaram, me deram apoio e acompanharam meu trabalho de perto. Além dos alunos de iniciação Vinicius, Barbara e Amanda com quem compartilhei bons momentos no laboratório.

Aos amigos de graduação 011, 012 e 013 que passaram por experiências parecidas e me acolheram bem durante esses anos juntos e aos mestres que se empenharam a nos ensinar e nos preparar profissionalmente, principalmente professor Artur e Aprígio e também a toda infraestrutura fornecida pela Universidade de São Paulo e do instituto de Química de São Carlos que foi fundamental para minha formação.

Resumo

O processo de obtenção de *whiskers* de quitina consiste em submeter esse polímero à hidrólise ácida. Dentre os principais fatores que influenciam as características das nanofibras formadas (principalmente razão comprimento/diâmetro e carga superficial) obtidas por esse processo estão o tipo de ácido empregado, a razão mássica quitina/solução ácida, o tempo e a temperatura de hidrólise bem como a granulometria da quitina de partida. Na literatura há poucos estudos envolvendo a utilização de *whiskers* de beta-quitina e que relatam a influência da granulometria na propriedade das nanofibras obtidas. Nesse sentido, faz-se necessário a realização de novos estudos para a melhor compreensão do efeito desse fator na produção de nanofibras à base de quitina. Nesse trabalho, filmes compósitos de quitosana e *whiskers* de beta-quitina foram formulados a partir de quitosana ($\approx 439\ 000\ \text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$; $\overline{GA}= 17.6\ \%$) produzida via *N*-desacetilação assistida por irradiação ultrassom de alta intensidade e *whiskers* de beta-quitina em duas granulometrias diferentes $< 125\ \mu\text{m}$ (w) e $> 425\ \mu\text{m}$ (W). Os filmes formados não diferiram significativamente na espessura e a luminosidade, porém a análise morfológica (MEV) indicou que a dispersão dos *whiskers* na matriz de quitosana é heterogênea e que a heterogeneidade é maior no caso dos *whiskers* produzidos a partir da fração de beta-quitina contendo partículas maiores, pois nesses filmes foram observados aglomerados. A imagem de TEM dos *whiskers* de maior granulometria mostrou que foram formadas nanofibras e, provavelmente os *whiskers* de menor granulometria, que estão mais dispersos na matriz, são nanocristais. O caráter hidrofílico dos filmes compósitos se mostrou superior ao do filme de quitosana e as propriedades mecânicas foram significativamente melhores nos compósitos, principalmente o alongamento na ruptura. O módulo de Young é a propriedade mecânica mais similar entre todos os filmes analisados. As caracterizações realizadas indicam que nos filmes compósitos Qsw e QsW os *whiskers* atuam como reforço e que conferem propriedades interessantes a esses materiais, com potencial aplicação como materiais biomédicos.

Abstract

The process to obtain chitin whiskers consists in subjecting this polymer to an acid hydrolysis. Among the main factors that influence the characteristics of the nanofibers formed (mainly, the length / diameter ratio and the surface charge) by this process, are the type of acid used, the chitin / acid solution mass ratio, the time and the temperature of the hydrolysis as well as the granulometry of the initial chitin. In the literature, there are few studies involving the use of beta-chitin whiskers and specially reporting the influence of the grain size on the properties of the obtained nanofibers. Therefore, it is necessary to carry out new studies to better understand the effect of this factor on the production of beta-chitin-based nanofibers. In this work, the composite films of chitosan and beta-chitin whiskers were formulated from chitosan ($\approx 439\,000\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$; $\overline{GA}= 17.6\%$) produced *via* *N*-deacetylation of beta-chitin by high-intensity ultrasound irradiation and beta-chitin whiskers in two different granulometries $< 125\text{ }\mu\text{m}$ (w) e $> 425\text{ }\mu\text{m}$ (W). The films formed did not differ significantly in thickness and luminosity, but the morphological analysis (SEM) showed that the dispersion of beta-chitin whiskers in the chitosan matrix is heterogeneous and that the heterogeneity is higher for the whisker produced from the larger granulometry, which also formed agglomerates. The TEM image of the whiskers of higher dimension showed that nanofibers were formed and probably the acid hydrolysis of beta-chitin of smaller granulometry produced nanocrystals, which are better dispersed in the matrix. The hydrophilic character of the composite films was superior to that of the chitosan film and the mechanical properties were significantly better in the composites, especially the elongation. The Young's modulus is the most similar mechanical property among all films analyzed. The characterizations of the composite films showed that Qsw and QsW whiskers act as a reinforcement and confer interesting properties to these materials, indicating their potential application as biomedical materials.

Lista de Figuras

Figura 1: Estrutura idealizada de quitina.....	5
Figura 2 : Representação esquemática das estruturas polimórficas de quitina, sendo que as setas representam as cadeias poliméricas no sentido do terminal não-redutor para o redutor.	6
Figura 3: Estrutura idealizada da quitosana.	7
Figura 4: Principais tipos de Compósitos fibrosos e particulados.....	10
Figura 5 : Corpo de prova e suas dimensões.	20
Figura 6: Espectro de ¹ H RMN da Quitosana (Qs).	22
Figura 7: Imagens dos whiskers > 425 µm.	24
Figura 8: Imagens superfície do filme Qs, sendo S-lado de secagem e P-lado placa.	25
Figura 9: Imagens de superfície dos filmes Qsw10, QsW10, Qsw20 e QsW20, sendo S-lado de secagem e P-lado em contato com a placa.	26
Figura 10: Imagens de MEV do corte transversal do filme Qs e dos compósitos Qsw20 e QsW20. ...	27
Figura 11: Interação com a água representada pelo decaimento do ângulo de contato em função do tempo para cada filme analisados, (A) superfície de secagem, (B) superfície em contato com a placa. Filmes com o mesma letra não são significativamente diferentes ($p > 0,05$) através do Teste de Tukey.....	29
Figura 12: Perda de água em função do tempo dos filmes da Tabela 2. Colunas com o mesma letra não são significativamente diferentes ($p > 0,05$) através do Teste de Tukey.....	31
Figura 13: Análise Mecânica, (A) Curvas represasentativas dos compósitos, (B) Módulo Young, (C) Tensão de Ruptura (MPa) e (D) Alongamento (%). Colunas com o mesma letra não são significativamente diferentes ($p > 0,05$) através do Teste de Tukey.....	32
Figura 14: Dados obtidos pela medida de colorimetria dos filmes. Colunas com o mesma letra não são significativamente diferentes ($p > 0,05$) através do Teste de Tukey.....	34

Lista de Tabelas

Tabela 1: Fontes de alguns polissacarídeos.....	3
Tabela 2: Filmes de quitosana e de compósitos preparados a partir do método casting.	18
Tabela 3 : Ângulo Hue para cada filme compósito analisado para ambos os lados dos filmes.	35

Sumário

1. Introdução	1
1.1. Polissacarídeos	2
1.1.1. Quitina.....	4
1.1.2. Quitosana.....	7
1.2. Compósitos.....	9
1.3. Whiskers.....	11
2. Objetivos	13
3. Procedimento Experimental	13
3.1. β -quitina	13
3.2. Quitosana.....	14
3.3. Whiskers de β -quitina	15
3.4. Caracterização da Quitosana (Qs)	15
3.4.1. Determinação do grau médio de acetilação (GA)	15
3.4.2. Determinação da Viscosidade Intrínseca e Massa molecular viscosimétrica média	16
3.5. Caracterização dos whiskers de β -quitina	17
3.5.1. Determinação da concentração de whiskers.....	17
3.5.2. Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM)	17
3.6. Preparação dos filmes compósitos	17
3.7. Caracterização dos filmes.....	18
3.7.1. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	18
3.7.2. Medida de espessura.....	19
3.7.3. Medida de ângulo de contato.....	19
3.7.4. Taxa de Transmissão ao Vapor da água (WVTR).....	19
3.7.5. Análise Mecânica	20
3.7.6. Análise Óptica	21
3.7.7. Análise estatística.....	21

4. Resultados e Discussão	22
4.1. Caracterização Quitosana (Qs).....	22
4.1.1. Grau de acetilação (GA)	22
4.2.2. Massa Molecular	23
4.2. Whiskers de β -quitina	23
4.2.1. Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM)	23
4.3. Preparação dos filmes.....	24
4.3.1. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	24
4.3.3. Ângulo de Contato	28
4.3.4. Taxa de Transmissão ao Vapor da Água (WVTR)	30
4.3.5. Análise Mecânica	32
4.3.6. Análise Óptica.....	34
5. Conclusão	36
6. Referências Bibliográficas	36

1. Introdução

Diversas pesquisas têm se dedicado ao desenvolvimento de nanocompósitos poliméricos, isto é, classe de materiais produzidos através da combinação de uma matriz polimérica e partículas ou fibras com dimensões nanométricas (< 100 nm) incorporadas como reforço (Maneghetti e Qutubuddi, 2006) produzidos a partir de recursos renováveis visando aplicações nas indústrias farmacêutica, de alimentos e de cosméticos. Os biopolímeros, como os polissacarídeos, estão disponíveis abundantemente e representam uma alternativa viável para a produção de materiais biodegradáveis e não poluentes (Qin *et al.*, 2016). Um dos principais objetivos de produzir materiais biodegradáveis é promover a substituição dos materiais produzidos a partir de fontes não-renováveis, como os materiais poliméricos produzidos a partir do petróleo.

Os estudos e propostas de utilização de biopolímeros para a produção de embalagens biodegradáveis, películas comestíveis e materiais de revestimento para alimentos aumentou consideravelmente nos últimos anos, principalmente devido ao seu caráter renovável e abundância de polissacarídeos (amido, celulose, quitina e quitosana) e proteínas (de soja, de trigo, caseína e gelatina) que podem ser utilizados para a produção de filmes poliméricos (Rhim, Park e Ha, 2013).

Além de serem aplicados em embalagens alimentícias, os filmes poliméricos também são desenvolvidos para a indústria farmacêutica, no desenvolvimento de curativos, pois o processo de cicatrização de feridas envolve frequentemente o uso de um material com propriedades cicatrizantes, antifúngicas e antibacterianas para proteger a lesão de qualquer infecção bacteriana, inibir o sangramento, evitar o contato com a água e distúrbios eletrolíticos (Zahedi *et al.*, 2010).

Moreira e colaboradores (2011) produziram filmes de polímeros sintéticos hidrossolúveis, a saber poli(acetato de vinila) (PVA) e polietilenoglicol (PEG), para serem aplicados como adesivos cutâneos devido atividade antimicrobiana contra as cepas de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*.

Porém os filmes poliméricos podem apresentar algumas limitações, como baixa barreira a vapor de água, propriedades mecânicas inadequadas para a aplicação final e dificuldade de processamento. Essas limitações podem ser superadas através da adição de reforços, por exemplo cargas minerais, fibras naturais e sintéticas, e pela adição de plasticizantes que

melhoram as propriedades mecânicas dos filmes e suas propriedades de barreira (Martins *et al.*, 2013; Rhim, Park e Ha, 2013).

Uma alternativa interessante é o reforço dos filmes com fibras de dimensões nanométricas, também denominadas nanofibras, que apresentam grande área superficial para interação com a matriz polimérica do filme e promovem a melhoria das suas propriedades mecânicas. Os materiais nanofibrosos de origem vegetal mais utilizados são os nanocristais de celulose produzidos através da hidrólise ácida, que provoca a despolimerização das cadeias celulósicas das regiões amorfas, mais acessíveis, e permite o isolamento dos nanocristais das regiões cristalinas, pois essas não sofrem o ataque ácido (Abdul Khalil *et al.*, 2017). Assim, por exemplo, quando nanocelulose, fibra celulósica de dimensões nanométricas obtidas em maior proporção da madeira (40-50%), ou da parede celular de diversas plantas, é utilizada como reforço, a transparência dos compósitos de resina de époxi não é alterada, porém a permeabilidade a gases diminui (Shimazaki *et al.*, 2007).

1.1. Polissacarídeos

Os polissacarídeos são polímeros naturais constituídos de um ou mais tipos de monossacarídeos e podem ter cadeias lineares ou ramificadas. Podem ser extraídos de fontes vegetais, tais como algas, exsudatos, sementes, frutas e cereais, de animais e de microorganismos, como fungos e bactérias. (Cunha, 2009). Alguns exemplos de polissacarídeos e suas origens são mostrados na Tabela 1.

Tabela 1: Fontes de alguns polissacarídeos.

Origem	Polissacarídeo	Fonte
Algas	Alginato	Algas pardas
	Agaranas	Algas vermelhas
	Carragenanas	Algas vermelhas
Exsudato de plantas	Goma Arábica	<i>Acacia spp</i>
	Tragacante	<i>Astragalus spp</i>
	Goma de Cajueiro	<i>Anacardium occidentale</i>
Sementes	Guar	<i>Cyamopsis tetragonolobus</i>
	Alfarroba	<i>Ceratonia siliqua</i>
	Tamarindo	<i>Tinissa indica</i>
Frutas	Pectina	Maçãs e laranjas
Tubérculos, cereais	Amido	Milho, trigo, batatas
	Inulina	Chicória, <i>Jerusalem artichokes</i>
Animais	Ácido Hialurônico	Humor vítreo de bovinos, cristas de galináceos
	Heparina	Pulmão de bovinos e intestinos de porcos
	Quitina	Carapaças de crustáceos
	Quitosana	Paredes celulares de leveduras e fungos
Fungos	Glucanas	<i>P.ostreatus, Agaricus blazei</i>
Bactérias	Xantana	<i>Xanthomonas spp</i>
	Dextrana	<i>Leuconostoc spp</i>
	Gelana	<i>Sphingomonas elodea</i>

Fonte: adaptado Cunha, Paula e Feitosa, 2009.

Os polissacarídeos obtidos de sementes possuem funções de reserva e estruturais nas fontes de origem, já os obtidos de exsudatos de plantas atuam nos mecanismos de defesa contra estresse físico e ataques microbianos. O principal polissacarídeo de tubérculos e cereais, o amido, é o principal polissacarídeo de reserva energética de glicose. Os polissacarídeos de animais, como o ácido hialurônico, são polissacarídeos de sustentação, assim como a quitina que é um polissacarídeo estrutural dos exoesqueletos de crustáceos, a exemplo da celulose que desempenha papel semelhante nos vegetais (Cunha, Paula e Feitosa, 2009).

Os exopolissarídeos produzidos por bactérias também atuam nos mecanismos de defesa contra as adversidades do meio ambiente. A goma xantana, exopolissacarídeo produzido por *Xanthomonas*, é muito utilizada como espessante em bebidas e alimentos devido a propriedades gelificantes e espessantes. A pectina extraída de frutas também possui propriedades gelificantes e os alginatos e carragenas extraídos de algas, além de gelificantes são agentes de suspensão em formulações que tendem a ocorrer a deposição de sólidos, sendo que ambos são muito utilizados nas indústrias alimentícia e de cosméticos (Fani, 2013).

Dentre as diversas atividades biológicas dos polissacarídeos, estes podem apresentar propriedades antivirais, antitumorais, antioxidantes, anticoagulantes e antitrombóticas (Cunha, Paula e Feitosa, 2009), que são propriedades importantes para o desenvolvimento de materiais para a área biomédica e farmacêutica, além de alguns apresentarem propriedades intrínsecas, como biocompatibilidade e biodegradabilidade, que abrem possibilidades mais amplas de aplicações na área de saúde humana. Os polissacarídeos são obtidos de fontes renováveis e possuem propriedades físicas interessantes, pois são formadores de filmes e podem promover a gelificação e o espessamento. Adicionalmente, são facilmente processados em diferentes formas, tais como filmes, partículas de diferentes dimensões, cápsulas e fibras (Rinaudo, 2006).

1.1.1. Quitina

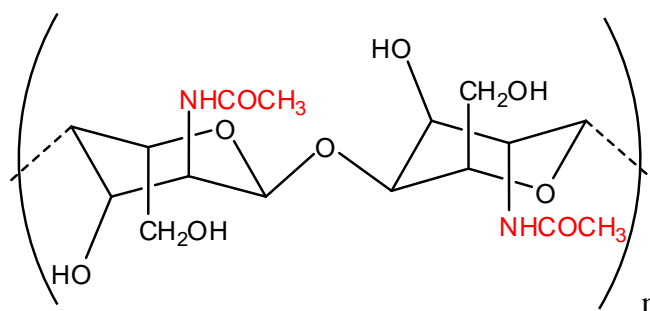
A quitina é um dos polissacarídeos mais abundante da biosfera, sendo um dos poucos polissacarídeos nitrogenados e dentre esses é o mais abundante (Qin et al., 2016). A quitina é um polissacarídeo que pode ser utilizado para a produção de biomaterias, por apresentar propriedades peculiares como biodegradabilidade e atividades antibacteriana e antifúngica, além de possuir atividade anti-inflamatória e não ser tóxico (Izumi *et al.*, 2016; Qin *et al.*, 2016; Robles *et al.* 2016).

Um biomaterial é um material que pode ser utilizado de forma temporária ou permanente como parte do sistema que trate ou substitua qualquer tecido, órgão ou função do corpo (Azeredo *et al.*, 2007). Lee e colaboradores (2000) formularam um gel de beta-quitina, polietilenoglicol e sulfadiazina de prata que foi liofilizado. O biomaterial resultante foi aplicado como curativo em lesões de animais e promoveu o controle de infecções, favorecendo a cura da lesão.

A quitina é um copolímero formada predominantemente (> 80 %) por unidades de 2-acetamido-2-desoxi-D-glicopirranose (GlcNAc) unidas por ligações glicosídicas β -(1 \rightarrow 4) e

que apresenta baixo teor ($< 10\%$) de unidades 2-amino-2-desoxi-D-glicopirranose (GlcN), conforme representado na Figura 1. É um polímero fibroso semicristalino e é o constituinte básico que fornece estrutura e sustentação aos exoesqueletos de diferentes espécies de crustáceos, bivalves, insetos e paredes celulares de fungos (Gupta, 2010; Hamley, 2010).

Figura 1: Estrutura idealizada de quitina.



A quitina encontrada na natureza não apresenta composição única, as variações existentes incluem o tamanho médio das cadeias poliméricas, a quantidade e distribuição das unidades GlcNAc e GlcN nas cadeias e a disposição das cadeias nos domínios ordenados (Delezuk, 2013).

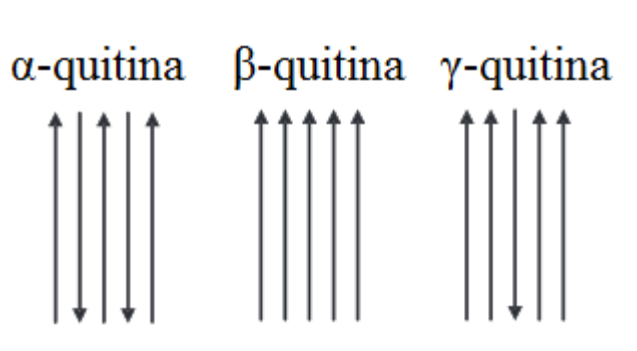
O teor médio de unidades GlcNAc nas cadeias é expresso como grau médio de acetilação (\overline{GA}). Quando $\overline{GA} > 50 - 60\%$ o polímero é denominado quitina, enquanto $\overline{GA} < 50 - 60\%$ corresponde a quitosana (Pillai, Paul, Sharma, 2009). Adicionalmente, quitina e quitosana diferem quanto à solubilidade pois o primeiro polímero é insolúvel na maioria dos solventes aquosos e solventes orgânicos mais comumente empregados enquanto quitosana é solúvel em meios aquosos de acidez moderada ($pH < 5,0$).

As principais propriedades de quitina e quitosana estão relacionadas ao grau médio de acetilação (\overline{GA}), pois este parâmetro afeta suas propriedades químicas e físicas (Kajac, 2015). A biodegradação e a compatibilidade celular, além de outras atividades biológicas destes polímeros, também dependem de \overline{GA} (Freirer *et al.*, 2005).

Existem três poliformas de quitina, a saber α -quitina, β -quitina e γ -quitina. A forma α -quitina é a mais abundante e está presente nas carapaças de caranguejos e lagostas, cascas de camarões e paredes celulares de fungos e leveduras (Rinaudo, 2006). Já a β -quitina pode ser encontrada em gládios de lulas (Paillet e Dufresne, 2001; Morin e Dufresne, 2002). Com relação ao empacotamento molecular, as interações intramoleculares da β -quitina são menos numerosas que as da α -quitina, logo a β -quitina é mais reativa e mais suscetível a dissolução em alguns

solventes do que a α -quitina (Mincea, Negrulescu e Ostafe, 2012). Isso ocorre devido à disposição antiparalela das cadeias poliméricas da α -quitina nos domínios cristalinos. As ligações hidrogênio intermoleculares envolvendo cadeias de lamelas diferentes estão presentes em maior proporção em alfa-quitina do que em beta-quitina, pois neste último caso as cadeias estão orientadas paralelamente, o que desfavorece o estabelecimento de ligações hidrogênio entre as cadeias de lamelas diferentes. Portanto a poliforma β -quitina é menos densamente empacotada que α -quitina, o que favorece as interações com solventes e promove maior intumescimento e aumenta a solubilidade de beta-quitina em relação à alfa-quitina (Campana Filho *et al.*, 2007). Um esquema da disposição das cadeias nas poliformas de quitina é ilustrado na Figura 2.

Figura 2 : Representação esquemática das estruturas polimórficas de quitina, sendo que as setas representam as cadeias poliméricas no sentido do terminal não-redutor para o redutor.



Fonte : Campana Filho *et al.*, 2007.

A associação de cadeias de quitina leva a formação de agregados fibrosos altamente cristalinos, denominados de nanocristais ou nanofibras de quitina, que despertaram um interesse crescente na comunidade científica devido ao seu potencial como reforços em nanocompósitos (João, Silva e Borges, 2015; João *et al.*, 2017). Vários métodos de obtenção de nanocristais foram estudados e relatados com sucesso, produzindo materiais em diferentes nanoescalas de espessuras e comprimentos. A razão entre comprimento e espessura de nanocristais ou nanofibras é uma característica do material denominada aspecto (Akeland, 1996).

Dentre os métodos de obtenção de nanofibras/nanocristais estão a oxidação mediada por radical de 1-oxil-2,2,6,6-tetrametilpiperidina (TEMPO) (Fan, Saito e Isogai, 2008a), moagem mecânica (Chen *et al.*, 2014; Fan, Saito e Isogai, 2008b), irradiação com ultrassom (Deng *et al.*, 2014) e homogeneização a alta pressão (Salaberria *et al.*, 2015). Os autores citados utilizaram as nanofibras/nanocristais de quitina produzidas a partir de diferentes métodos de

obtenção como reforços estruturais ou funcionais em materiais desenvolvidos para a cicatrização de feridas, na Engenharia de Tecidos, a administração de medicamentos em sistemas de controle de e liberação de farmacos, sensores, cosméticos e absorventes (João *et al.*, 2016).

Madhumathi *et al.* (2009) e Kumar *et al.* (2010) desenvolveram nanocompósitos de hidrógeis de beta-quitina e nanopartículas de prata liofilizados para aplicações na cicatrização de lesões. A caracterização biológica mostrou que esses materiais não apresentam toxicidade, promovem a adesão celular e permitem a rápida coagulação sanguínea, além de serem bactericidas contra *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.

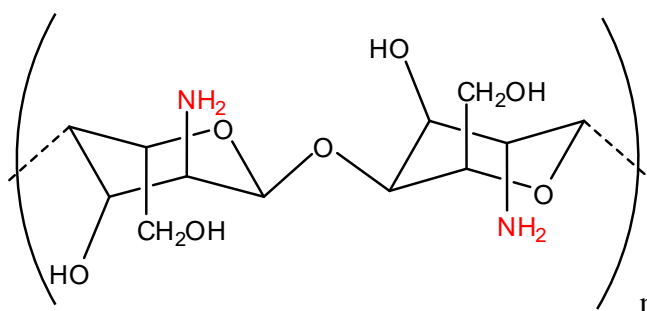
Nakorn *et al.* (2008) desenvolveram um sistema de imobilização de proteínas, para a detecção de glicose contendo *nanowhiskers* (300 nm) de alfa-quitina e nanopartículas (39 nm) de quitosana.

Morganti e colaboradores (2008 e 2011) exploraram as propriedades da nanofibras de alfa-quitina no tratamento cosmético da pele e do cabelo. Os autores mostraram que as nanofibras ligam-se a compostos utilizados em cosméticos, como por exemplo, os anti-oxidantes (luteína, melatonina e ácido lipóico) e os moduladores imunológicos, melhorando a atividade biológica e a eficácia.

1.1.2. Quitosana

A quitosana é obtida através da *N*-desacetilação da quitina e é composta de unidades 2-acetamido-2-desoxi-D-glicopirranose (GlcNAc) e 2-amino-2-desoxi-D-glicopirranose (GlcN), com predomínio (> 50-60 %) do último tipo de unidade (Figura 3).

Figura 3: Estrutura idealizada da quitosana.



A quitosana é facilmente processada em diferentes formas, tais como filmes, membranas, micro e nanopartículas, géis, soluções, o que proporciona uma ampla variedade de aplicações biomédicas, como na Engenharia de Tecidos e na Nanobiotecnologia, no desenvolvimento de curativos para feridas ou para encapsulação e entrega de fármacos (Nagarwal *et al.*, 2009).

A quitosana é solúvel em meios aquosos moderadamente ácidos ($\text{pH} \approx 4,5$) devido à protonação dos grupos amino de suas unidades GlcN e exibe propriedades de polieletrólitos catiônicos nesses meios. Assim, é proposto que suas propriedades antibacterianas se devem, ao menos em parte, ao fato de suas cadeias positivamente carregadas interagirem com as cargas negativas presentes nas membranas celulares de bactérias, causando perturbações na sua organização e podendo provocar o rompimento da membrana celular (Coma *et al.*, 2003 ; Zivanovic *et al.*, 2005). A atividade bactericida da quitosana depende de vários fatores que podem ser classificados em quatro categorias (Kong *et al.*, 2010):

- 1) Fatores relacionados às espécies de bactérias;
- 2) Fatores intrínsecos da quitosana, incluindo massa molecular, grau médio de acetilação e sequência de unidades GlcN e GlcNAc ao longo das cadeias.
- 3) Estado físico: solução, pó ou filme;
- 4) Condições ambientais, como o pH e a temperatura.

Embora os materiais à base de quitosana tenham encontrado um grande número de aplicações industriais em diferentes áreas, frequentemente possuem propriedades mecânicas e hidrofobicidade inferiores quando comparados a materiais poliméricos produzidos a partir de polímeros sintéticos (João *et al.*, 2017).

Diferentes estudos, utilizando a quitosana processada de várias formas propõem a incorporação de cargas (orgânicas ou inorgânicas) à matriz de quitosana, na tentativa de combinar as vantagens do polímero e dessas cargas de maneira a desenvolver materiais com novas propriedades.

Corsello e colaboradores (2017) desenvolveram compósitos de quitosana e nanocristais de celulose. A carga de nanocristais foi variada de 1 a 10%, sendo que acima de 3% foi observado segregação de fases, confirmada pela fraca interação entre a matriz e o reforço vista no espectro de infravermelho. Embora o filme formado possua características heterogêneas, a hidrofiliabilidade diminui quando comparado aos filmes de quitosana.

Tanese e Spiridon (2014) formularam blendas de poli (ácido láctico), queratina e quitosana para avaliação em células com osteossarcoma. As blendas apresentaram comportamento mecânico melhor do que o filme composto apenas por quitosana. Em relação aos testes *in vivo*, esses sugeriram que a blenda tem importante potencial para aplicação na Medicina.

João e colaboradores (2017) estudaram a preparação de filmes em que *whiskers* de α -quitina foram incorporados à matriz de quitosana. Os resultados evidenciaram a existência de duas fases, uma formada predominantemente por camadas de quitosana e outra fase composta por camadas de *whiskers* de quitina.

Embora a quitosana ocorra naturalmente nas paredes celulares de algumas espécies de fungos e leveduras, é produzida em indústrias e laboratórios de pesquisa *via N*-desacetilação de quitina, reação que corresponde à hidrólise dos grupos acetamido de unidades GlcNAc, resultando em unidades GlcN. O produto desta reação é denominado quitosana, quando o teor de unidades GlcN presentes na cadeias poliméricas é superior a 50-60 %. O polímero é solúvel em meios aquosos moderadamente ácidos, o que é atribuído à presença de numerosas cargas positivas ao longo das cadeias, devido à protonação dos grupos amino das unidades GlcN.

Processos enzimáticos e químicos podem promover a *N*-desacetilação de quitina, porém no processo mais empregado nas indústrias e também em laboratórios de pesquisa, a reação ocorre em meio fortemente alcalino, tipicamente solução aquosa concentrada de hidróxido de sódio, em diferentes condições em termos de tempo e temperatura reacionais (Kumar, 2000; Domard, 2011).

Embora a hidrólise dos grupos acetamido das unidades GlcNAc seja uma reação simples, a conversão de quitina em quitosana tem importantes limitações, pois é um processo heterogêneo que tende a apresentar baixa reprodutibilidade, a reação deve ser repetida por várias vezes consecutivas se o objetivo é produzir quitosana extensivamente desacetilada ($\overline{GA} < 5 \%$), o que provoca acentuada despolimerização, principalmente se a reação é executada em temperatura elevada (Lamarque, Viton e Domard, 2004). Entretanto, o desenvolvimento de um novo processo de desacetilação, denominado processo de desacetilação assistida por irradiação de ultrassom de alta intensidade (Delezuk *et al.* 2011), tem permitido a produção eficiente de quitosanas com características e propriedades definidas, inclusive quitosanas extensivamente desacetiladas ($\overline{GA} < 5 \%$) e de elevada massa molecular média viscosimétrica ($\overline{Mv} \approx 10^6 \text{ g mol}^{-1}$) (Fiamingo, 2016).

1.2. Compósitos

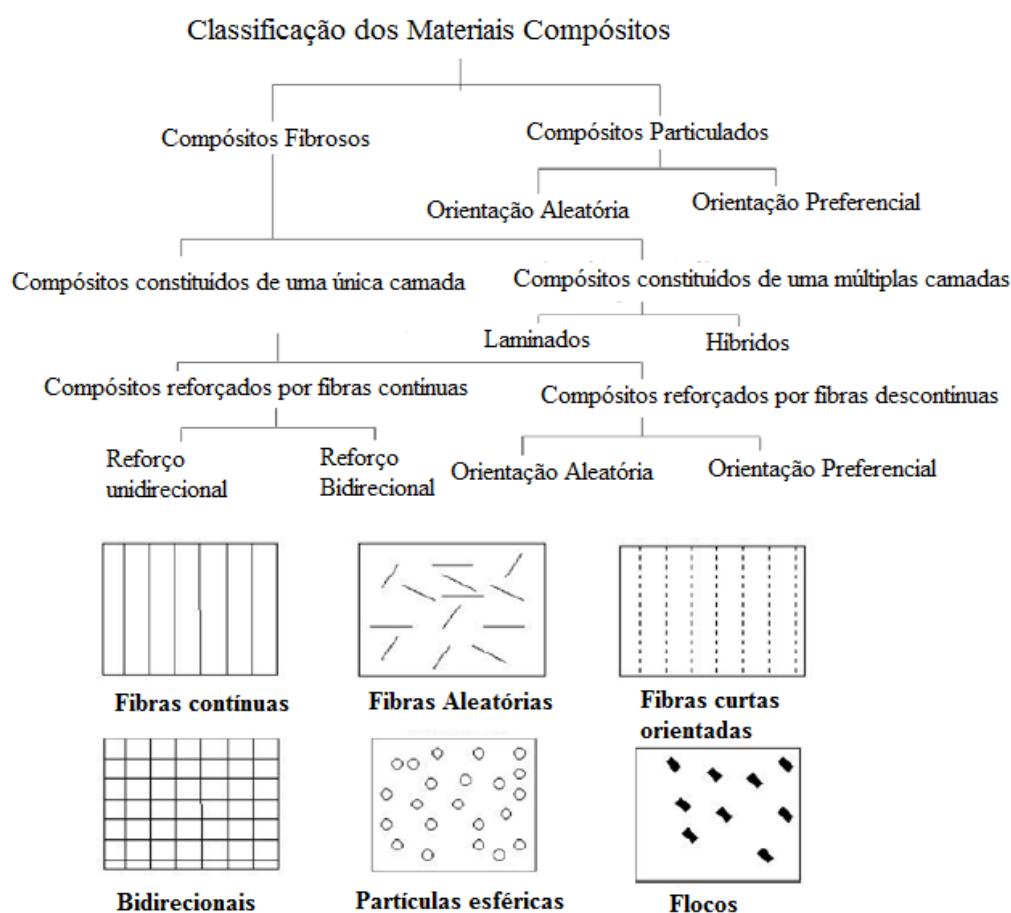
Compósitos são materiais constituídos de duas ou mais fases com diferentes propriedades químicas e físicas. Uma dessas fases é uma fase contínua chamada de matriz e a outra é uma fase dispersa dita de reforço ou modificadora. A matriz é responsável por conferir estrutura ao compósito e o reforço possui a função de conferir novas propriedades físico-químicas e

melhorar as propriedades mecânicas dos compósitos. Os principais exemplos de matrizes são os metais, os polímeros e as cerâmicas e como reforços os mais utilizados são as fibras (vidro, carbono, orgânicas) e o grafite (Levy Neto e Pardini, 2016).

Os compósitos de fibra e polímeros naturais são formulados com materiais renováveis e sustentáveis, pois fibra e polímero podem ser de origem biológica. A matriz polimérica termoplástica, isto é, a matriz formada por cadeias poliméricas cujas interações intermoleculares são facilmente rompidas com o aumento da temperatura, são muito utilizada para produção de filmes e embalagens, devido à facilidade de serem remoldados ou reciclados. Exemplos de polímeros sintéticos termoplásticos utilizados nessas formulações incluem o polietileno (PE), polipropileno (PP), cloreto de polivinila (PVC). Os polímeros sintéticos não são biodegradáveis, mas podem ser reciclados (Väisänen, Das e Tomppo, 2017).

Além das fibras, os reforços podem ser partículas, a Figura 4, mostra os tipos de compósitos reforçados com fibras ou partículas.

Figura 4: Principais tipos de Compósitos fibrosos e particulados.



Fonte: Ventura, 2009.

Nas últimas duas décadas, os compósitos reforçados com fibras têm atraído o interesse de pesquisadores no mundo todo e muitos esforços têm sido direcionados ao desenvolvimento de novos materiais. No passado, o uso de fibras de vidro como reforços para materiais compósitos poliméricos era comum, contudo as fibras de vidro apresentam algumas desvantagens tais como não serem renováveis e causarem problemas de saúde e segurança, além de não poderem ser recicladas termicamente por incineração (Singleton et al., 2003). Por outro lado, a utilização de fibras naturais como reforços de materiais poliméricos representa uma opção econômica e não prejudicial ao meio ambiente. De fato, as fibras provenientes de recursos renováveis requerem baixa energia nos processos de extração/produção e no caso das fibras vegetais, por exemplo, estas podem ser eliminadas por compostagem no final do seu ciclo de utilidade (Kiruthika, 2017).

Os nanocompósitos, cujo reforço apresenta dimensões nanométricas (< 100 nm), podem ser utilizados em diversas áreas, desde a construção civil, no desenvolvimento de materiais estruturais de habitações domiciliares (Kiruthika, 2017) até a biomedicina com a regeneração de tecidos (Armentano et al., 2010). Um exemplo na construção civil é o trabalho de Yan (2016) que avaliaram o desempenho de compósitos à base de resina epóxi reforçados com fibras de linho para componentes de concreto. Cilindros e vigas de concreto simples com e sem as fibras foram testados e os resultados indicaram que o concreto com as fibras apresenta melhor tensão, energia de fratura e ductilidade.

Para a regeneração de tecidos, os materiais devem ser biocompatíveis e estimularem, diferenciação, adesão e proliferação celular. Além disso, os materiais regeneradores devem apresentar propriedades mecânicas apropriadas. Polímeros biodegradáveis não satisfazem estes requisitos, portanto, materiais poliméricos multi-componentes são desenvolvidos para obter materiais com propriedades adequadas para a regeneração de tecidos (Armentano et al., 2010).

1.3. Whiskers

Whiskers são fases secundárias que atuam como reforços em compósitos, como as partículas e as fibras. Os *whiskers* são monocristais alongados, apresentam tipicamente diâmetros de 5 a 20 nm e comprimento é variável, em geral superior a 100 nm. He e Wang (2008) constataram que o reforço de matrizes com *whiskers* resultam em materiais com melhores propriedades mecânicas quando comparados com materiais reforçados com fibras.

Polissacarídeos semicristalinos renováveis, como celulose, quitina e amido podem ser utilizados para a obtenção de nanofibras, nanocristais e *whiskers*. Devido à presença de domínios cristalinos e domínios amorfos na estrutura destes polímeros é possível formar nanofibras, pois os domínios amorfos podem ser removidos por acidólise e os *whiskers* são isolados em nanoescala (Zeng *et al.*, 2012).

As partículas cristalinas nanométricas produzidas a partir de polissacarídeos, conhecidas como nanocristais, podem ser usadas como reforços em nanocompósitos de matriz polimérica, pois apresentam excelentes propriedades intrínsecas, elevada área superficial, biodegradabilidade, são atóxicas, apresentam baixa densidade, podem ser facilmente obtidas e, em geral, possuem grande quantidade de grupos hidroxila (Habibi, Lucia e Rojas, 2010; Angelier, Molina-Boisseau e Dufresne, 2005).

A quitina forma fibrilas, pequenos filamentos com diâmetros de 2,5 a 25 nm dependendo da sua origem biológica (Revol e Marchessault, 1993). Fam, Saito e Isogai (2010) obtiveram *whiskers* de α -quitina de diâmetros de $6,2 \pm 1,1$ nm e 250 ± 140 nm de comprimento. Já Morin e Dufresne (2002) observaram *whiskers* de beta-quitina com comprimento de 2,2 μ m, porém 75% dos *whiskers* apresentavam comprimento abaixo de 3 μ m.

Devido a semelhança estrutural da quitina e da celulose, Marchessault e colaboradores relataram pela primeira vez a preparação de uma suspensão de cristais de quitina através da hidrólise ácida que rompe as macromoléculas obtendo fibrilas nanométricas em suspensão (Marchessault *et al.*, 1959 ; Revol e Marchessault, 1993).

Os *whiskers* de quitina são atualmente obtidos como suspensões aquosas estáveis e estão sendo estudados para serem utilizadas como reforços de nanocompósitos biodegradáveis, em cápsulas biomédicas para fármacos, Engenharia de Tecidos e cosmética (Mincea, Negrulescu, Ostafe, 2012). O efeito de reforço dos *whiskers* de quitina resulta da formação de uma rede de percolação baseada em forças de ligação hidrogênio (Dufresne, 2010).

Morin e Dufresne (2002) prepararam nanocompósitos de uma suspensão aquosa de β -quitina com elevado aspecto (equivalente a 120), como reforço e o látex de PCL (policaprolactona) como matriz. A dispersão cristalina coloidal foi misturada com a suspensão de látex em quantidades diferentes, para obtenção de filmes compósitos com uma fração de *whiskers* variando de 0 a 10%.

Ma *et al.* (2011) empregaram nanofibras de quitina e *whiskers* celulose, com diâmetro de 5 a 10 nm para o desenvolvimento de membranas para ultrafiltração de água capazes de adsorver vírus conforme observado em testes com bacteriófagos MS2. A membrana produzida apresenta

essa capacidade, pois possui superfície carregada negativamente e elevada relação superfície/volume.

Dolphen e Thiravetyan (2011) demonstraram que *whiskers* de alfa-quitina são muito promissores para a adsorção de melanoidinas e outros pigmentos, muito utilizados em alimentos e bebidas. Esses pigmentos quando descarregados em um sistema de recursos hídricos são considerados poluentes ambientais. Os autores mostraram que as nanofibras de quitina estabelecem uma interação eletrostática e química com a melanoidina e que a absorção desse pigmento aumenta com o aumento de temperatura.

Existem poucos trabalhos na literatura relatando a síntese e utilização de *whiskers* de beta-quitina como reforço de compósitos. A maioria dos trabalhos emprega nanofibras e nanocristais de celulose e de alfa-quitina. Contudo beta-quitina também possui domínios cristalinos que podem ser isoladas através da hidrólise ácida para produzir materiais cristalinos de dimensões nanométricas interessantes para serem aplicadas em compósitos.

2. Objetivos

Este trabalho teve como objetivo a preparação e caracterização de filmes de quitosana reforçados com *whiskers* de β -quitina. Nesse sentido, duas frações de beta-quitina compostas por partículas com diferentes dimensões médias ($< 125 \mu\text{m}$; $> 425 \mu\text{m}$) foram submetidas à hidrólise ácida para produzir *whiskers*. Os filmes foram produzidos por *casting* de solução aquosa de quitosana à qual foram adicionados teores variáveis de *whiskers* (2,5 % - 20 %) produzidos a partir de duas frações de beta-quitina, distintas quanto às dimensões médias das partículas. Os efeitos da variação do teor de *whiskers* e do tamanho médio das partículas de beta-quitina nas propriedades físico-químicas e mecânicas dos filmes compósitos foram avaliados.

3. Procedimento Experimental

3.1. β -quitina

A β -quitina utilizada neste trabalho foi extraída de gládios de lulas. Os gládios foram lavados em água, para remoção dos vestígios de carne e secos em estufa com circulação de ar a 30°C durante 12 h. Após a secagem, os gládios foram triturados em um moinho de facas (modelo MA048 MARCONI).

Segundo a metodologia de Claussard *et al.* (2004), 200 g de β -quitina foram tratadas em 3,0 L de solução de NaOH 1M durante 18 h, visando a remoção de impurezas e proteínas.

Após o tratamento com NaOH, a β -quitina foi novamente lavada em água, a fim de neutralizá-la e seca em estufa com circulação de ar a 30°C por 12 h. A β -quitina tratada foi então triturada em um moinho de facas (modelo MA048 MARCONI) e posteriormente separadas em frações em uma sequência de tamizes.

A fração selecionada para utilização na preparação da quitosana foi de 125-425 μ m e para a preparação dos *whiskers* foram utilizadas duas granulometrias: > 425 μ m e < 125 μ m.

3.2. Quitosana

A quitosana foi obtida através da *N*-desacetilação da β -quitina assistida por irradiação de ultrassom de alta intensidade, processo DAIUS. O processo ultrassônico utilizado foi Hielscher Sonifier UP400S (ν = 24 kHz), e os parâmetros do processo DAIUS foram:

- I) Sonda UPR sonotrodo Hielscher H22D (diâmetro = 22 mm e comprimento = 100 mm)
- II) Intensidade de irradiação: 50 % de intensidade máxima nominal do equipamento, ou seja, 200 W.
- III) Irradiação intermitente: ciclos de 50 % de pulsação.

Foram pesados 5,0 g de β -quitina que foram transferidos para um reator cilíndrico de parede dupla (diâmetro interno = 3,5 cm) e 50 mL de solução NaOH 40% (m/m), foram adicionados ao reator sob agitação de 300 rpm e acoplado a um banho de circulação de água, que mantém a temperatura constante de 60 ± 1 °C. O sonotrodo foi então mergulhado (2/3 do seu comprimento) na suspensão e iniciou-se a reação de *N*-desacetilação da β -quitina. A reação foi mantida por 50 min.

Ao final da reação, gelo de água destilada foi adicionado ao meio reacional para parar a reação. Em um banho de gelo, o meio reacional foi neutralizado com a adição de 50 mL de HCl concentrado. Após a neutralização, a quitosana, resultante da primeira desacetilação foi filtrada e lavada em água corrente, até obter pH próximo a 7. Para a produção dos filmes, foi utilizada a quitosana duplamente desacetilada, ou seja, produto da segunda desacetilação em que 5 g da quitosana cuja obtenção foi descrita acima foram submetidos ao mesmo processo descrito para a *N*-desacetilação da β -quitina.

A fim de verificar a existência de íons cloreto, o teste qualitativo com solução de nitrato de prata $0,0017 \text{ mol.L}^{-1}$ foi realizado, se o sal de cloreto de prata, AgCl , fosse obtido, a quitosana era lavada novamente sob água corrente, a fim de a quitosana livre de íons cloreto.

3.3. *Whiskers* de β -quitina

Os *whiskers* de β -quitina foram preparados segunda a metodologia de Nair e Dufresne (2003) com algumas modificações. Em um balão de fundo redondo foram adicionados 150 mL de solução HCl 3M e 5,0 g de β -quitina nos diâmetros descritos no item 3.1. A mistura foi agitada para promover a homogeneização da solução. O balão foi então acoplado a um sistema de refluxo e banho de glicerina a 90°C (temperatura de ebulição) para a produção de *whiskers* de β -quitina a partir da hidrólise ácida. O sistema foi mantido sob refluxo por 3 h.

Após este período, o sistema foi resfriado suavemente em um banho de gelo, para parar a hidrólise. A solução obtida foi centrifugada a uma velocidade de 10000 rpm por 5 min. O sobrenadante foi descartado e os *whiskers* foram suspensos em água deionizada (45- 50 mL) e centrifugados novamente até obter pH em torno de 5 a 7. O centrifugado resultante foi dialisado por 48 horas e a água destilada foi trocada durante esse período.

O produto dialisado foi disperso por 5 min a uma velocidade de 19000 rpm com o auxílio do Ultra Turrax modelo TI8 marca IKA em banho de gelo e sonicado por 5 min no ultrassom, Hielscher Sonifier UP400S ($\nu = 24 \text{ kHz}$) utilizando os mesmos parâmetros empregados na preparação da quitosana (item 3.2).

A suspensão formada foi armazenada sob refrigeração em geladeira ($3\text{-}5^\circ\text{C}$).

3.4. Caracterização da Quitosana (Qs)

3.4.1. Determinação do grau médio de acetilação (\overline{GA})

A quitosana obtida após a aplicação de dois processos consecutivos de desacetilação assistida por irradiação de ultrassom de alta intensidade, foi avaliada por espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio ($\text{RMN } ^1\text{H}$) para a determinação do grau médio de acetilação (\overline{GA}). O espectro de $\text{RMN } ^1\text{H}$ foi obtido no equipamento Bruker ADVANCE III spectrometer ($t = 400 \text{ MHz}$), a 80°C . Foram pesados 10 mg da quitosana (Qs), que foram dissolvidos em 1 mL de 1% $\text{HCl/D}_2\text{O}$ por agitação à temperatura ambiente por 24 h. O grau médio de acetilação (\overline{GA}) foi obtido pela relação entre as áreas dos sinais correspondentes aos hidrogênios metílicos dos grupos acetamido em torno de 2,0 – 2,1 ppm (a) e o hidrogênio ligado

ao carbono 2 dos anéis de glicopirranose em trono de 3,1-3,2 ppm (b). Essa relação é indicada na Equação 1 (Hirai, Odani e Nakajima, 1991).

$$\overline{GA}(\%) = \frac{a}{3b} \times 100$$

Equação 1

3.4.2. Determinação da Viscosidade Intrínseca e Massa molecular viscosimétrica média

A viscosidade intrínseca da quitosana foi obtida em triplicata através da dissolução de 12 mg de quitosana (Qs) em 50 mL de solução tampão 0,3 mol.L⁻¹ ácido acético/ 0,2 mol.L⁻¹ de acetato de sódio. As soluções foram previamente filtradas através de membranas 0,8 µm/0,45 µm de ésteres de celulose (WSCWP / Millipore).

O viscosímetro AVS-360 e a bureta automática AVS-20, ambos da Schott-Geräte, foram utilizados para as medições de viscosidade. O capilar de vidro (l = 0,53 mm) contendo 15 mL da solução de quitosana foi imersa num banho de água mantido a 25 ± 0,01 °C e volumes previamente programados do solvente 0,3 mol.L⁻¹ ácido acético/ 0,2 mol.L⁻¹ de acetato de sódio foram adicionados sequencialmente para obter diluições sucessivas.

A viscosidade intrínseca do polímero e sua concentração foram determinadas através da equação de Huggins (Equação 2).

$$\frac{\eta_{sp}}{C} = [\eta] + k_H[\eta]^2 \cdot C$$

Equação 2

Onde :

$\frac{\eta_{sp}}{C}$ = viscosidade reduzida (mL.g⁻¹)

$[\eta]$ = viscosidade intrínseca (mL.g⁻¹)

k_H = constante de Huggins

C = concentração da solução (g.mL⁻¹)

Conforme a Equação 2, a viscosidade intrínseca ($[\eta]$) é determinada pela extrapolação da curva de viscosidade reduzida versus a concentração à diluição infinita. A viscosidade intrínseca e a massa molecular média viscosimétrica (M_v) são relacionadas pela relação de Mark-Houwink, presente na Equação 3.

$$[\eta] = K' M_v^\alpha$$

Equação 3

Onde K' e α são constantes do polímero, neste caso a quitosana em que K' e α foram propostas por Rinaudo e colaboradores e de acordo com o valor de grau médio de acetilação (DA) (Rinaudo, Milas e le Dung, 1993; Signini, Campana Filho, 1999).

3.5. Caracterização dos *whiskers* de β -quitina

3.5.1. Determinação da concentração de *whiskers*

A concentração de *whiskers* foi determinada através da pesagem em triplicata de 1,0 g de solução resultante. Esta foi então liofilizada e submetida a uma nova pesagem para a determinação da concentração mássica de *whiskers*.

3.5.2. Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM)

A morfologia das nanofibras obtidas a partir da quitina de maior granulometria ($> 425\mu\text{m}$) foram examinadas por TEM em um microscópio Zeiss EM 109 equipado com um sistema de captura de imagem digital Olympus MegaView V. A suspensão de nanofibras foi diluída para concentração próxima a 0,01% (m/v) e sonicadas por 3 minutos com ultrassom nas mesmas parâmetros condições de preparo da quitosana encontrado no item 3.2., em banho de gelo e sob agitação magnética a 500 rpm. Logo em seguida, uma gota dessa suspensão foi depositada em grade de transmissão de cobre recoberta com Formvar e secas a 40 °C. As amostras foram observadas a 80 kV.

3.6. Preparação dos filmes compósitos

Filmes de quitosana e *whiskers* de β -quitina e compósitos dos dois materiais foram preparados pelo método *casting*. O método “*casting*” consiste em espalhar a solução precursora do filme em uma superfície lisa. A solução é então seca em uma capela de exaustão, estufa com circulação de ar ou temperatura ambiente (Fonseca, 2009).

O processo de secagem dos filmes ocorre para que o solvente seja evaporado. Após a remoção do solvente, os filmes secos são destacados da placa e estão prontos para serem analisados.

Em cada placa de polipropileno foram colocados 30 mL ou 30 g de solução. A partir de agora filmes quitosana será nomeada de Qs e *whiskers* de β -quitina de menor granulometria ($< 125\mu\text{m}$) de w (minúsculo) e de maior granulometria ($> 425\mu\text{m}$) de W (maiúsculo).

Os filmes de quitosana (Qs) foram preparados a partir da deposição em placas de polipropileno (diâmetro 6cm) de 30 g da solução de quitosana 1% (m/v) dissolvida em ácido acético 1% (v/v) que foram previamente agitadas durante 12 h. Os filmes foram secos em estufa de circulação de ar a 40 °C durante 24 h.

Os compósitos foram preparados através da dispersão dos *whiskers* em diferentes cargas no volume de água destilada utilizada para a dissolução da quitosana durante 3 min, velocidade de 19000 rpm com o auxílio do Ultra Turrax modelo TI8 marca IKA em banho de gelo. Em seguida a massa de quitosana para obter uma concentração 1% (m/v) foi adicionada e a mistura foi agitada por um agitador mecânico de hélices tipo pá. Para a completa dissolução da quitosana no meio, o ácido acético 1% (v/v) foi adicionado, os *whiskers* foram adicionados e a mistura foi mantida sob agitação por 12 h. Após este período, as soluções foram vertidas em placas de polipropileno (diâmetro 6 cm) e os filmes foram secos em estufa de circulação de ar a 40 °C durante 24 h. Na Tabela 2 são identificados todos os filmes preparados.

Tabela 2: Filmes de quitosana e de compósitos preparados a partir do método *casting*.

Suspensão de <i>Whiskers</i> granulometria	Composição dos Filmes	Sigla dos Filmes
Filmes Qs	Qs 1%	Qs
Compósitos com <i>whiskers</i> (w) de granulometria < 125 µm	Qs 1% + w 2,5%	Q _s W _{2,5}
	Qs 1% + w 5%	Q _s W ₅
	Qs 1% + w 10%	Q _s W ₁₀
	Qs 1% + w 20%	Q _s W ₂₀
Compósitos com <i>whiskers</i> (W) de granulometria > 425µm	Qs 1% + W 2,5%	Q _s W _{2,5}
	Qs 1% + W 5%	Q _s W ₅
	Qs 1% + W 10%	Q _s W ₁₀
	Qs 1% + W 20%	Q _s W ₂₀

3.7. Caracterização dos filmes

3.7.1. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A estrutura dos filmes foi avaliada por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). O equipamento utilizado foi o Microscópio Eletrônico de Varredura digital LEO-440, aplicando uma tensão de 10 kV. Antes da análise, as amostras foram recobertas com uma fina camada de ouro (40-50 nm) no metalizador Coating System BAL-TEC MED 020 (BAL-TEC, Liechtenstein). Foram analisadas a superfície e a secção transversal dos filmes

selecionados, sendo que os filmes foram fraturados manualmente após congelamento em nitrogênio líquido.

3.7.2. Medida de espessura

Para mensurar as espessuras dos filmes compósitos foi utilizado um micrômetro digital de avanço rápido com precisão de 0,001 mm, sendo realizadas 10 medidas aleatórias de cada filme compósitos.

3.7.3. Medida de ângulo de contato

As medidas de ângulo de contato foram obtidas utilizando goniômetro CAN101 Optical Contact Angle Meter (One attention®) a 25 °C, segundo o método proposto pela ASTM D5725-99. Amostras dos filmes de dimensões de 10,0 mm x 6,3 mm (comprimento por largura), foram fixadas em lâmina de vidro para manter a superfície na horizontal. Em seguida, gota de água deionizada ($\approx 5 \mu\text{L}$) foi colocada sobre a superfície da amostra com auxílio de seringa e a imagem da gota foi captada por câmera digital por período de 60 s. Os ângulos de contato dos lados direito e esquerdo da gota foram calculados por meio do software One attention®. Os valores do ângulo de contato representam a média dos ângulos de três repetições que foram obtidos por somatória e divisão dos ângulos direito e esquerdo de cada gota com a superfície.

Para ângulos inferiores a 90° o líquido é considerado molhável e para ângulos acima de 90° não-molhável. O que permite a caracterização das substâncias em hidrofílicas e hidrofóbicas. A água possui caráter polar e quando ela apresenta com outra superfície um ângulo de contato menor que 90° esta superfície é considerada hidrofílica, porém, se este ângulo de contato for maior que 90°, o material é considerado hidrofóbico (Farias, 2011).

3.7.4. Taxa de Transmissão ao Vapor da água (WVTR)

A transmissão ao vapor da água, em inglês *Water Vapor Transmission Rate* (WVTR) foi determinada gravimetricamente segundo método proposto pela ASTM (American Society for Testing and Material), E96/E96M 16 (ASTM,2016) modificado, à temperatura de 25 °C. Amostras de filmes foram dimensionadas em formato circular com 9 mm de diâmetro e aplicadas em células de permeação contendo água destilada. Estas células foram colocadas em

dessecador contendo sílica gel azul (umidade relativa de $\approx 0\%$) de forma a assegurar um gradiente hídrico no sistema, e o conjunto foi armazenado a 25 °C. Ao longo de 2 dias, houve monitoramento do peso das células e filmes em intervalos de 2h, de forma a acompanhar a variação de peso no período. A transmissão do vapor de água nos filmes ($\text{g/m}^2\cdot\text{h}$) consiste no coeficiente angular da reta obtida por meio da regressão linear dos dados de perda de massa em função do tempo. Cinco medidas foram realizadas para cada amostra.

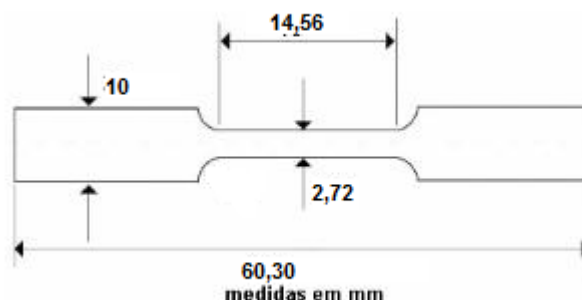
3.7.5. Análise Mecânica

Os materiais utilizados na produção de filmes devem apresentar características adequadas para proporcionar propriedades mecânicas desejadas (Whodo e Moraru, 2013).

A deformabilidade, resistência à tração, porcentagem de alongamento e módulo de Young de filmes dependem da composição e das condições ambientais em que se encontram. As características mecânicas de filmes podem ser melhoradas com a adição de plastificantes ou materiais de reforço que em geral provocam o aumento da porcentagem de alongamento e a diminuição da resistência à tração (Sothornvit e Krochta, 2001).

As propriedades mecânicas de tensão na ruptura (T), alongamento máximo na ruptura (A) e módulo de elasticidade (ME), relacionadas ao ensaio de tração do filme de quitosana e compósitos de quitosana e *whiskers* de β -quitina foram realizadas em um texturômetro TA.XT2i Stable Micro Systems a 25°C, com base na norma ASTM D 882–09 (2009) . Os corpos de prova dos compósitos foram cortados de acordo com a Figura 5 e então tracionados a um a velocidade de 5 mm/min e distância inicial das garras de 40 mm.

Figura 5 : Corpo de prova e suas dimensões.



As propriedades determinadas a partir das curvas de tensão em função da deformação obtidas no software Texture Expert 1.15 dos filmes foram: módulo de elasticidade (MPa), alongamento

na ruptura (%) e tensão na ruptura (MPa). Pelo menos 8 corpos de prova foram avaliados para cada formulação. Os ensaios foram realizados no Laboratório de Processamento de Frutas e Hortaliças da Embrapa Instrumentação, localizado em São Carlos-SP.

3.7.6. Análise Óptica

A aparência do filme pode ser determinada através de suas propriedades ópticas através da avaliação da cor de sua superfície, em geral medida por um colorímetro (Iahnke, 2015).

A determinação da coloração dos filmes é geralmente obtida pela utilização de um colorímetro que apresenta o sistema CIELAB, sendo os parâmetros L^* , a^* , b^* , onde :

- L^* é a luminosidade, com variação de 0 (preto) a 100 (branco);
- a^* , do verde (-) ao vermelho (+);
- b^* , do azul (-) ao amarelo (+).

A transparência ou opacidade de filmes é medida através da sua transmitância interna. Quanto maior o valor de transmitância, mais transparente é o filme. A opacidade da matriz polimérica é inversamente proporcional à sua transparência e depende de sua homogeneidade. A presença de heterogeneidades estruturais nos filmes com diferentes índices de refração promove espalhamento de luz e consequente maior opacidade (Pastor et al., 2013).

A luminosidade e a tendência da *scores* dos compósitos foram obtidos através do software presente no equipamento Colorímetro Meter CR-400/410 (Konica Minolta), de acordo com o Sistema CIELAB e os parâmetros L^* , a^* e b^* .

As leituras dos parâmetros L , a^* e b^* permitiram calcular o ângulo Hue, ou seja, determinar a tonalidade. O ângulo Hue equivale ao [arco tangente (b^*/a^*)] (Minolta, 1994).

3.7.7. Análise estatística

Os resultados das análises foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey com significância de 5 % de probabilidade, com auxílio do programa Statistica for Windows versão 10.0 da StatSoft.

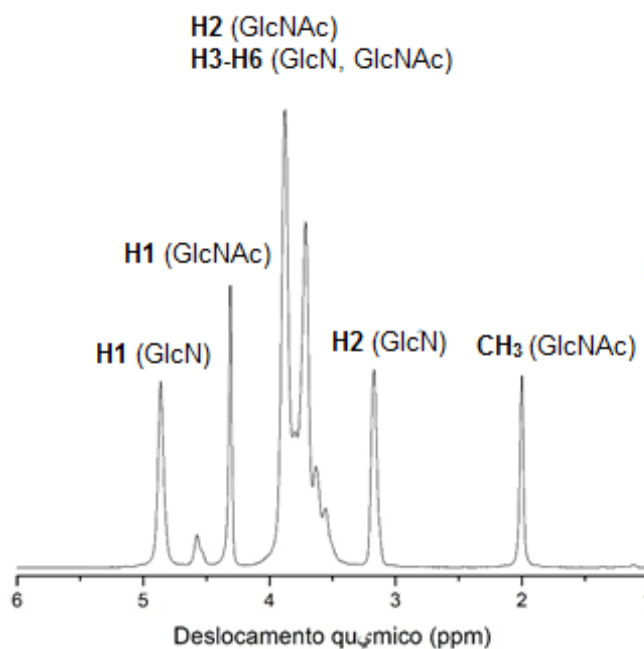
4. Resultados e Discussão

4.1. Caracterização Quitosana (Qs)

4.1.1. Grau de acetilação (\overline{GA})

O grau de acetilação foi obtido pela Equação 1 descrita no item 3.5.1., através das áreas dos picos identificados como a e b do espectro de RMN ^1H apresentado na Figura 6.

Figura 6: Espectro de ^1H RMN da Quitosana (Qs).



Aplicando na Equação 1 estes valores, obtém-se que o (\overline{GA}) da Qs é igual a 17,6%.

A quitosana obtida pelo processo de *N*-desacetilação da β -quitina assistida por ultrassom de alta intensidade é uma quitosana com elevado grau de desacetilação, superior a quitosana de elevado grau de desacetilação produzida comercialmente.

Fiamingo et al. (2016) encontrou para a *N*-desacetilação da β -quitina, um grau de acetilação para a quitosana duplamente desacetilada de 15%. Portanto o resultado é similar ao da literatura.

4.2.2. Massa Molecular

A massa molecular da Quitosana foi obtida pela medida de viscosidade. O coeficiente linear da reta obtida do gráfico da concentração (g.L^{-1}) versus a viscosidade reduzida representa a viscosidade intrínseca.

A média da viscosidade intrínseca obtida para a Quitosana duplamente desacetilada foi de $1435 \pm 15 \text{ mL.g}^{-1}$. Aplicando a Equação 3, para obter a massa molecular e utilizando os parâmetros pré-estabelecidos por Rinaudo, Milas e le Dung (1993), para $\overline{GA} = 21\%$, $K = 0,074$ e $\alpha = 0,76$, tem-se que a massa molecular da Qs é equivalente a $439 \pm 7 \text{ KDa}$.

A massa molecular obtida é considerada alta quando comparada as quitosanas vendidas comercialmente, porém quando comparada a literatura com a massa molecular encontrada por Fiamingo *et al.* (2016), a massa molecular obtida representa a metade da massa molecular encontrada pelos pesquisadores, embora o grau de acetilação seja muito parecido. O \overline{GA} encontrado foi de 18% e Fiamingo encontrou um DA de 15% para a Qs. Essa grande diferença pode estar relacionada as condições de *N*-desacetilação, uma vez que as metodologias diferem. Fiamingo e colaboradores (2016) partiu de uma granulometria de β -quitina mais fina do que a utilizada neste trabalho.

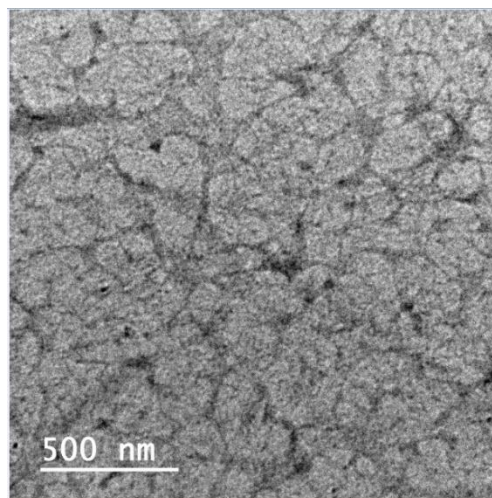
4.2. Whiskers de β -quitina

Os *whiskers* de beta-quitina foram obtidos na forma de uma suspensão aquosa aparentemente estável. A concentração média de *whiskers* foi de $20,73 \pm 0,41 \text{ mg.g}^{-1}$ para a suspensão de *whiskers* de beta-quitina de granulometria $< 125 \mu\text{m}$. Já para a suspensão de *whiskers* de beta-quitina de granulometria $> 425 \mu\text{m}$ a concentração média de *whiskers* foi de $22,16 \pm 1,83 \text{ mg.g}^{-1}$. O teste de Tukey ($p > 0,05$) mostra as concentrações dos *whiskers* obtida para as duas granulometrias não são significativamente diferentes e que o método de produção de *whiskers* por hidrólise ácida é reprodutível.

4.2.1. Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM)

Afim de observar o formato e a disposição dos *whiskers* produzidos, imagens de Microscopia Eletrônica de Transmissão foram obtidas para os *whiskers* $> 425 \mu\text{m}$ e são ilustradas na Figura 7.

Figura 7: Imagens dos *whiskers* > 425 μm .



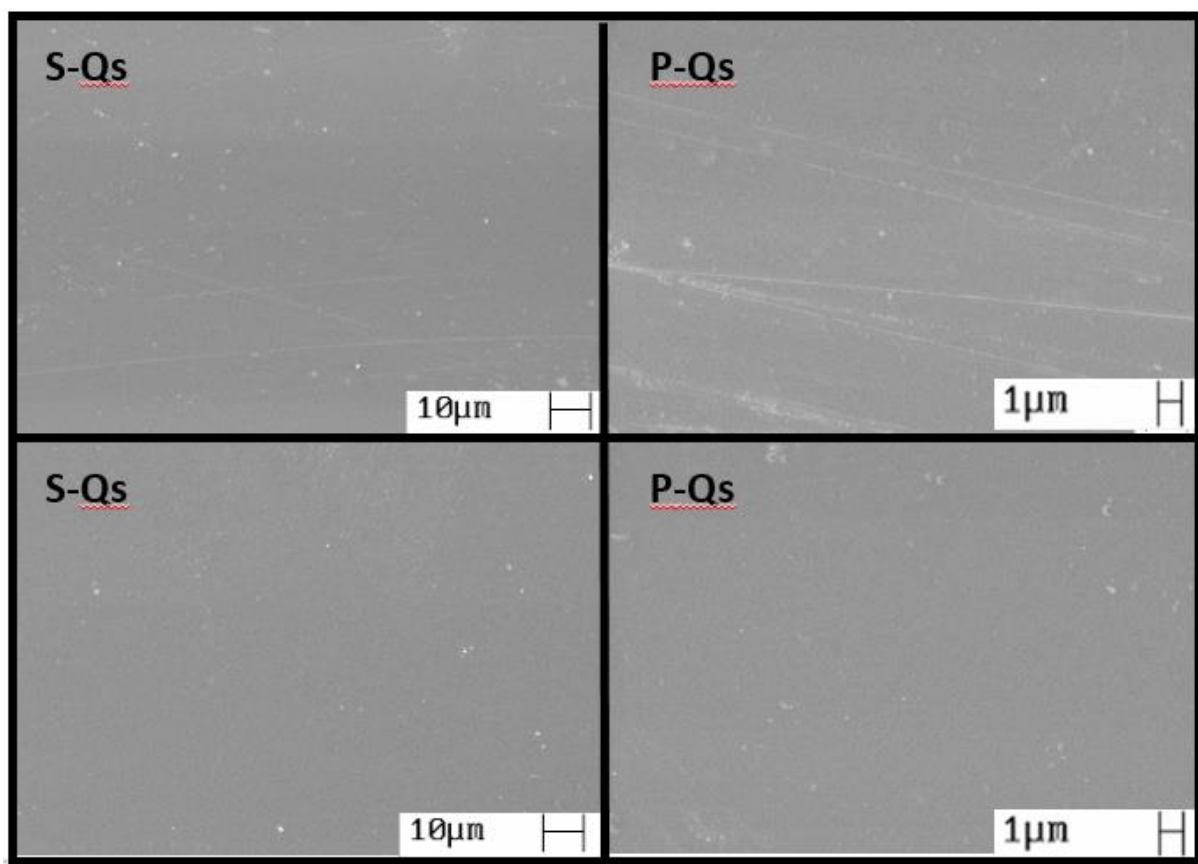
O estudo da suspensão aquosa de *whiskers* de beta-quitina está em desenvolvimento. Porém as primeiras imagens obtidas e que está ilustrada na Figura 7, mostra que o processo de hidrólise ácida formou nanofibras de beta-quitina que estão dispostas de forma aleatória, segundo a classificação proposta por Ventura (2009). Não foi possível obter o aspecto.

4.3. Preparação dos filmes

4.3.1. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Os filmes tiveram a superfície dos dois lados (S-secagem e P-placa) e a fratura dos filmes avaliados por microscopia eletrônica de varredura. A Figura 8 representa as imagens da superfície do filme puro de quitosana.

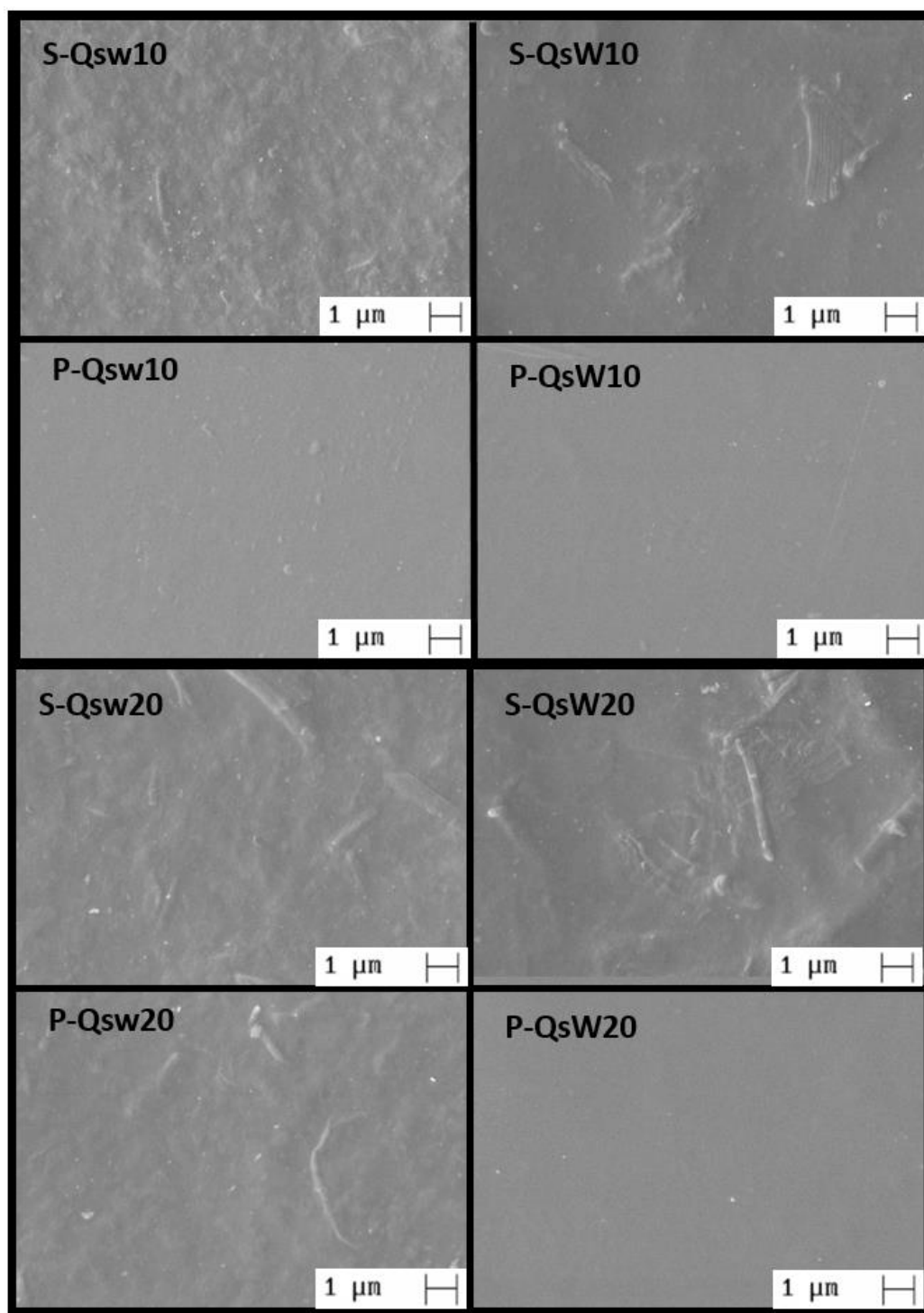
Figura 8: Imagens superfície do filme Qs, sendo S-lado de secagem e P-lado placa.



A imagem da superfície revela que ambos os lados do filme de quitosana são aparentemente homogêneos. No lado da placa existem ranhuras, provavelmente provenientes do manuseio e destaque da placa.

Para visualizar as imagens de superfície dos compósitos, as imagens dos dois filmes com maiores cargas de *whiskers* (10 e 20%) das duas granulometrias estudadas são mostradas na Figura 9.

Figura 9: Imagens de superfície dos filmes Qsw10, QsW10, Qsw20 e QsW20, sendo S-lado de secagem e P-lado em contato com a placa.



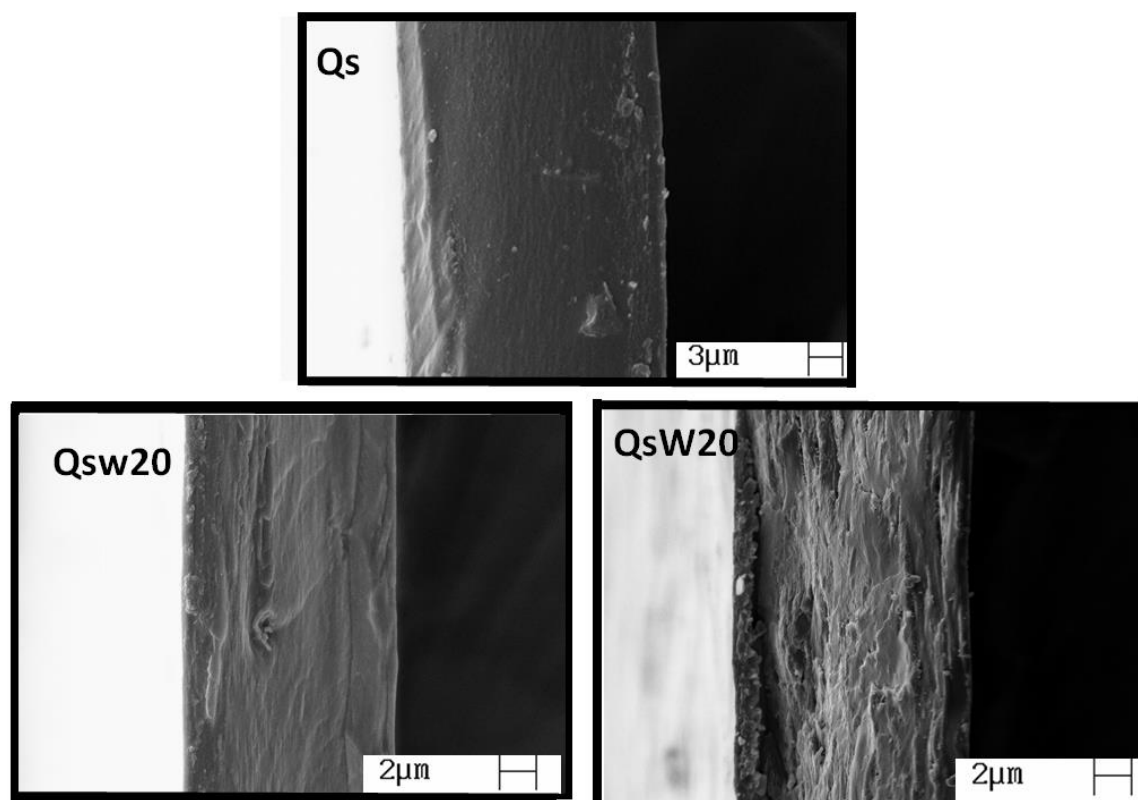
O lado em contato com a placa de polipropileno em quase todos os filmes se mostrou liso e homogêneo, exceto o filme de menor granulometria com 20% de *whiskers*, indentificado na Tabela 2 como Qsw₂₀. A superfície de secagem dos filmes no entanto se mostrou mais rugosa.

Os compósitos contendo *whiskers* de menor granulometria apresentam os *whiskers* aparentemente mais homogeneamente dispersos na matriz de quitosana do que os filmes com *whiskers* de maior granulometria. Na Figura 9 para as superfícies filmes identificados como S-QsW₁₀ e S-QsW₂₀ é possível visualizar aglomerados de *whiskers*, sugerindo que estes *whiskers* obtidos de partículas de beta-quitina de maior diâmetro médio não se dispersam na matriz tão homogeneamente quanto aqueles preparados a partir da fração de beta-quitina composta por partículas de menores dimensões, resultando que neste último caso a distribuição dos *whiskers* parece mais homogênea.

A diferença da dispersão e interação dos *whiskers* com a matriz pode estar associada às dimensões dos nanocristais ou nanofibras formados. Assim, os resultados indicam que, provavelmente, a hidrólise ácida da fração de β -quitina contendo partículas de maiores dimensões resultou em nanofibras enquanto a da fração com partículas de maiores dimensões gerou nanocristais.

A Figura 10 apresenta as imagens de MEV do corte transversal do filme de quitosana (Qs) e os compósitos com maiores cargas de *whiskers* e ambas as granulometrias formuladas.

Figura 10: Imagens de MEV do corte transversal do filme Qs e dos compósitos Qsw20 e QsW20.



As imagens da fratura mostram crescente heterogeneidade dos filmes, sendo o filme puro da matriz o mais homogêneo e o compósito de maior carga e granulometria de *whiskers* QsW₂₀ o mais heterogêneo. A heterogeneidade da fratura indica maior plasticidade dos filmes com *whiskers* de maior granulometria.

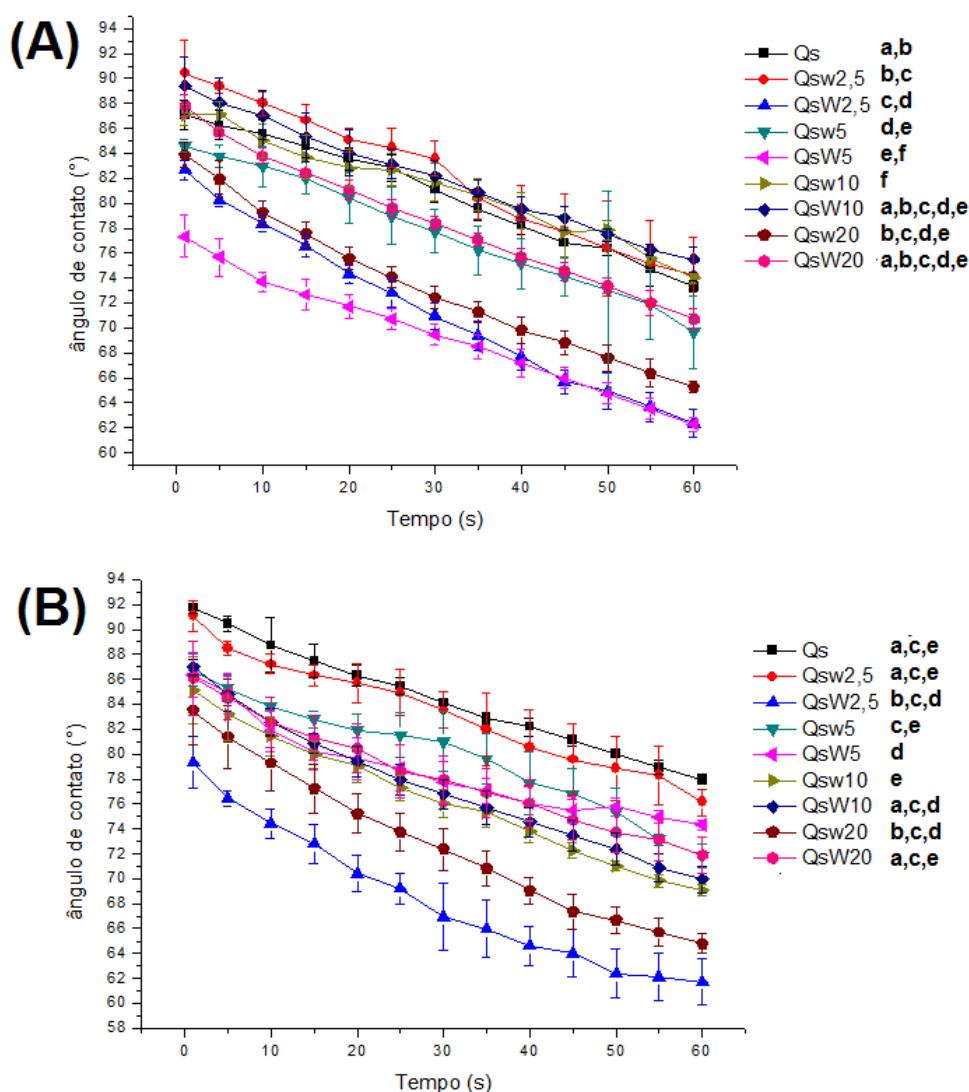
Nas imagens dos compósitos não foi possível visualizar as fibras, porém aparentemente os *whiskers* de menor granulometria interagem melhor com a matriz de quitosana formando um filme mais homogêneo e menos plástico que os compósitos de *whiskers* de maior granulometria que são visualmente mais heterogêneos, como observado nas imagens das superfícies dos filmes.

João *et al.* (2017) obtiveram compósitos heterogêneos de quitosana e *whiskers* de α -quitina porém com uma característica lamelar, em camadas, que não foi observada nas imagens de corte da Figura 10. João *et al.* (2017) observaram também que heterogeneidade dos filmes aumenta conforme aumenta a carga de *whiskers*, o que corrobora com os resultados do presente trabalho.

4.3.3. Ângulo de Contato

O ângulo de contato da água com as superfícies de secagem (S) e em contato com a placa (P) dos compósitos relacionados na Tabela 2 foi avaliado. Os gráficos dos Θ° pelo tempo (s) estão representados na Figura 11.

Figura 11: Interação com a água representada pelo decaimento do ângulo de contato em função do tempo para cada filme analisados, (A) superfície de secagem, (B) superfície em contato com a placa. Filmes com o mesma letra não são significativamente diferentes ($p > 0,05$) através do Teste de Tukey.



Através das curvas das médias de três análises, observa-se que a o decaimento do ângulo de contato em função do tempo (s) são similares para ambas as faces dos filmes compósitos. Pode-se dizer também que a preseça de *whiskers* aumentou a hidrofílicidade dos filmes.

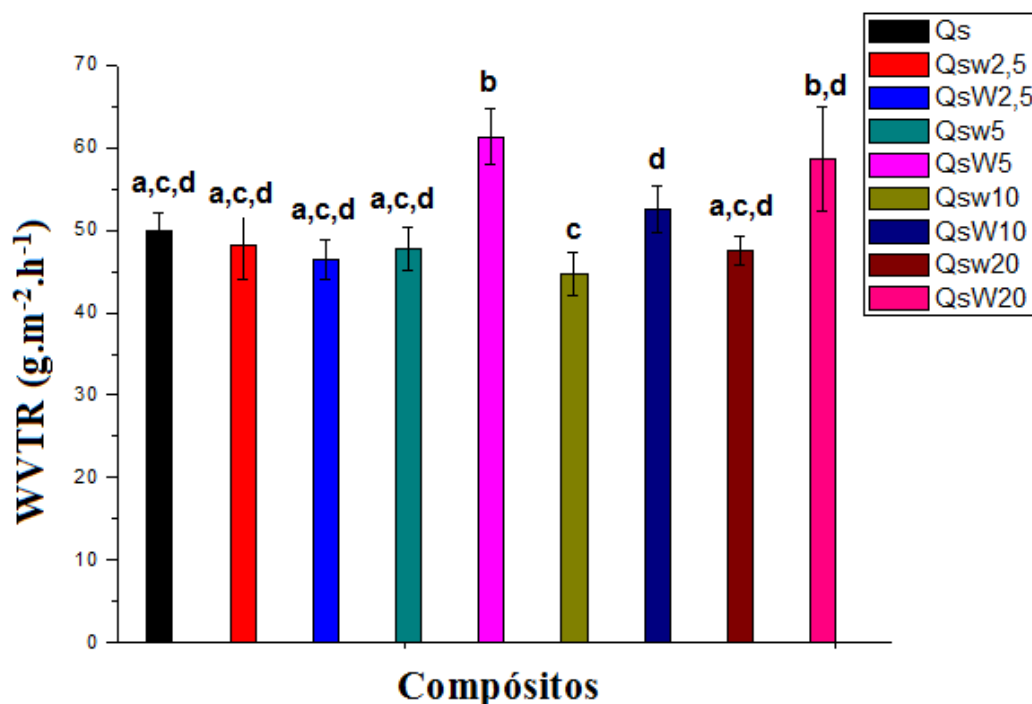
Uma possível explicação para esta observação é a diferença de rugosidade das superfícies do filme Qs e dos filmes compósitos. Conforme visualidado nas Figuras 8 e 9 da superfície dos filmes (MEV), respectivamente a superfície do filme de quitosana é menos rugoso do que a superfície dos filmes com *whiskers*, ou seja, a rugosidade está diretamente relacionada com o caráter hidrofílico, pois apresentar maior rugosidade significa apresentar maior superfície de contato e consequentemente maior interação com o líquido. Quanto maior a interação com o líquido ou quanto maior a rugosidade, menor é o ângulo de contato.

As medidas de ângulo de contato nas diferentes faces do filme Qs revelaram variação de 88-77° em 60s e 92-79° em 60s, nas faces de secagem e em contato com a placa, respectivamente. Na Figura 11A, três grupos de filmes compósitos podem ser observados: i) mais hidrofóbicos, os quais apresentam ângulo de contato inicial $> 90^0$, ii) menos hidrofóbicos, que apresentam $85^0 < \text{ângulo contato inicial} < 90^0$, iii) mais hidrofílicos, que apresentam ângulo de contato inicial $< 85^0$. As medidas de ângulo de contato variam nos intervalos 91-77°, 88-71° e 84-63°, respectivamente. Os filmes do último grupo são os que possuem a maior variação, sendo o filme Qsw₂₀ pertencente a este grupo e com a variação do ângulo de contato de 84-66°. O filme com a maior carga de *whiskers* e menor granulometria (Qsw₂₀) é mais rugoso do que QsW₂₀ conforme imagens de MEV dispostas na Figura 9 e também mais hidrofílico, uma vez que a variação do ângulo de contato para QsW₂₀ é de 88-72°. Na Figura 11B foram observados dois grupos filmes com comportamentos similares àqueles observados na Figura 11A.

4.3.4. Taxa de Transmissão ao Vapor da Água (WVTR)

Na Figura 12 estão representados a perda de massa, diretamente proporcional ao vapor de água transmitido, em função do tempo para os filmes produzidos de quitosana e *whiskers* de β -quitina.

Figura 12: Perda de água em função do tempo dos filmes da Tabela 2. Colunas com o mesma letra não são significativamente diferentes ($p > 0,05$) através do Teste de Tukey.



A matriz de quitosana é hidrofílica, afim de minimizar os efeitos de transmissão ao vapor de água adicionou-se o reforço de *whiskers* de beta-quitina. Porém a adição de *whiskers* não diminui significativamente a perda de vapor de água. A taxa de transmissão de vapor de água está associada ao efeito da espessura dos filmes, pois a transmissão varia do centro para as bordas dos filmes. A espessura do conjunto de filmes analisados não é significativamente diferente sendo equivalente a $\approx 84 \mu\text{m}$, o que explica a baixa transmissão dos compósitos produzidos para ambas as granulometrias de *whiskers* empregadas. Quando os *whiskers* de menor granulometria foram adicionais, os valores de WVTR diminuíram para todas as cargas de *whiskers* adicionadas, embora essa diminuição não seja significativa, para a maioria das cargas de *whiskers* adicionadas. Apenas para a carga de 10% foi observada uma diminuição mais acentuada.

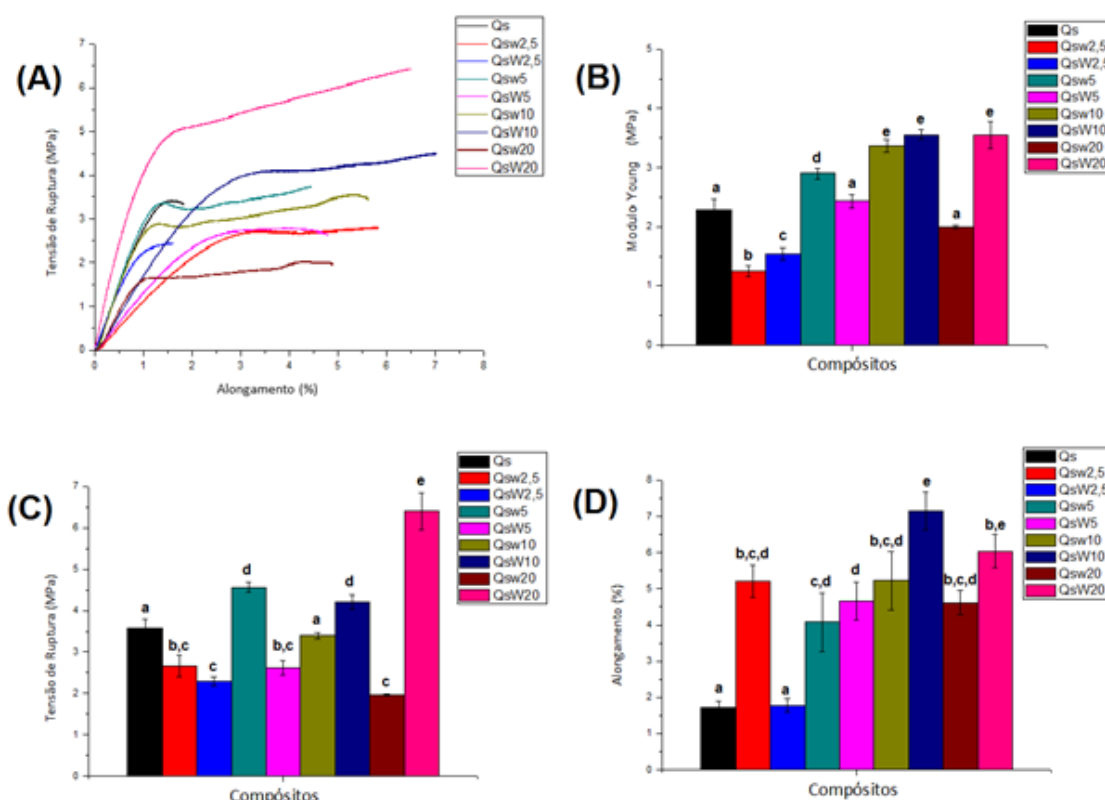
Quando os *whiskers* de maior granulometria foram adicionados, os valores de WVTR também não apresentaram uma tendência. Uma vez que diminuiu para as cargas de 2,5 e 10 % de *whiskers* e aumentou para 5 e 20 % de *whiskers*. Nas imagens de MEV dispostas na Figura 9 foram observados aglomerados para os filmes de maior carga de *whiskers* e que provocaram a redução da eficácia dos *whiskers* de beta-quitina na matriz de quitosana, devido a diminuição da taxa de transmissão ao vapor da água, isto é, a dispersão uniforme dos *whiskers* nos filmes compósitos é importante para obter propriedade de barreira ao vapor de água.

Resultado similar foi obtido por Salaberria e colaboradores (2015) com filmes de amido de milho e nanocristais e nafibras de α -quitina que atribuíram a baixa transmissão de vapor de água à formação de aglomerados quando elevadas cargas de *whiskers* foram utilizadas.

4.3.5. Análise Mecânica

A resistência mecânica dos filmes da Tabela 2 foi obtida, através das medidas tensão de ruptura e alongamento. As curvas representativas e a análise estatística das propriedades dos filmes estão indicados na Figura 13.

Figura 13: Análise Mecânica, (A) Curvas represasentativas dos compósitos, (B) Módulo Young, (C) Tensão de Ruptura (MPa) e (D) Alongamento (%). Colunas com o mesma letra não são significativamente diferentes ($p > 0,05$) através do Teste de Tukey.



As curvas representativas dos filmes compósitos mostram que os filmes com *whiskers* apresentaram melhores propriedades mecânicas quando comparados ao filme de quitosana, indicando que os *whiskers* desempenham o papel de reforços.

Em relação ao módulo de Young, a variação para os filmes analisados foi de 1,3 a 3,5 MPa, sendo o menor valor de módulo de Young a do filme compósito Qsw_{2,5} e o maior valor de 3,5 MPa para o filme QsW₂₀. O filme Qs apresentou um módulo de elasticidade de 2,4 MPa. Com exceção dos filmes compósitos com menor carga de *whiskers*, as demais cargas conferiram módulos de Young superiores ou iguais ao filme de quitosana.

A tensão de ruptura dos filmes analisados variou no intervalo 2,1 MPa - 6,5 MPa. O filme Qsw₂₀ foi o que apresentou a menor tensão de ruptura e o filme QsW₂₀ obteve a maior tensão de ruptura. Apesar de formar aglomerados e interferirem negativamente nas propriedades de barreira, as maiores cargas de *whiskers* exercem função de reforço, suportando mais força aplicada do que o filme de quitosana que rompe a 3,7 MPa, enquanto a tensão na ruptura do filme QsW₂₀ foi 6,5 MPa.

Já para a propriedade de alongamento, todos os filmes se alongaram mais do que a o filme da matriz de quitosana. A variação do alongamento obtida foi de 1,8 a 7,1%. Sendo o menor alongamento observado para o filme Qs e QsW_{2,5} que possui baixo teor de *whiskers* que tendem a formar aglomerados. Já a maior porcentagem de alongamento foi a do filme compósito QsW₁₀, isto é, a propriedade de alongamento está de acordo com as observações feitas para a propriedade de tensão de ruptura. Apesar de aglomerados terem sido visualizados nas imagens de MEV dos compósitos formulados com os *whiskers* > 425 µm, esses possuem características plásticas como visualizado nas imagens de MEV da fratura e conferem aos compósitos melhores propriedades mecânicas quando comparados a matriz polimérica, exercendo função de reforço. O efeito plasticizante dos *whiskers* se deve provavelmente à presença de água nos *whiskers* que foram obtidos e incorporados à quitosana na forma de suspensão aquosa.

Embora os compósitos formulados com os *whiskers* < 125 µm tenham apresentado menor alongamento do que os filmes de mesma carga e maior granulometria, esses ainda apresentaram maior alongamento do que o filme Qs, atuando como também como reforço.

João *et al.* (2017) relataram valores superiores de módulo Young, tensão de ruptura e alongamento para compósitos de quitosana e *whiskers* de α -quitina com cargas menores (0,75, 1,5 e 3%). O filme de quitosana de elevada massa molecular apresentou módulo Young equivalente a $2,01 \pm 0,36$ GPa e o filme com menor carga de *whiskers* 0,75% foi de $5,3 \pm 1,3$ GPa enquanto o de maior carga 3% apresentou o módulo Young próximo ao de quitosana puro é $2,25 \pm 0,48$ GPa.

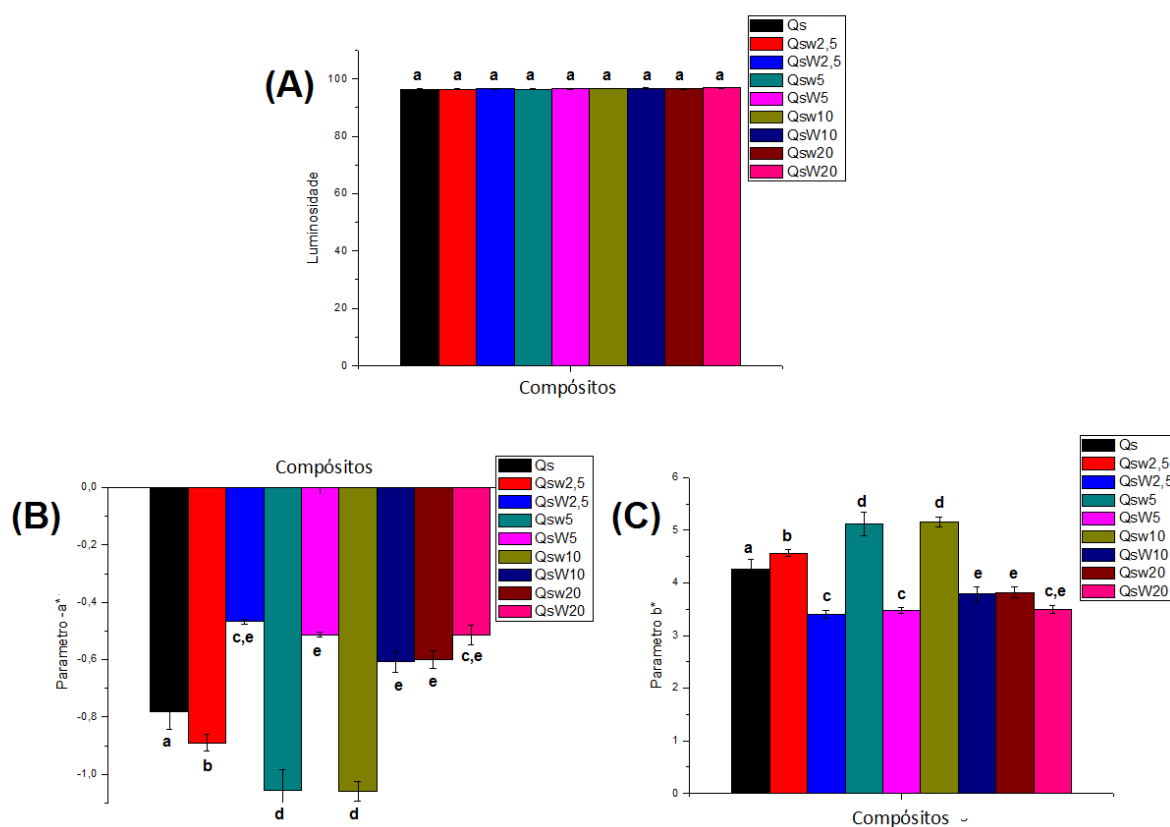
Ou seja embora, a grandeza dos resultados sejam diferentes, devido a diferença de equipamento utilizado e pré-carga aplicada, a presença dos *whiskers* nos compósitos melhorou as propriedades mecânicas da matriz polimérica. A análise mecânica dos filmes compósitos

Qsw e QSW foram realizadas também no equipamento de DMA (Análise Dinâmico-Mecânica), em que os filmes não foram rompidos mesmo após atingir a carga máxima do equipamento (≈ 18 MPa), ou seja é possível que os baixos valores obtidos neste estudo estejam na realidade relacionados aos parâmetros utilizados para a análise e não da falta ou baixa resistência dos materiais.

4.3.6. Análise Óptica

Os filmes foram analisados quanto a luminosidade, parâmetro (a^*) e (b^*) do sistema CIELAB, os dados encontrados estão dispostos na Figura 14.

Figura 14: Dados obtidos pela medida de colorimetria dos filmes. Colunas com o mesma letra não são significativamente diferentes ($p > 0,05$) através do Teste de Tukey.



Os resultados revelam que, apesar de visualmente os filmes com maiores cargas de *whiskers* formados por partículas de beta-quitina de maiores dimensões parecerem mais opacos que aqueles de quitosana e dos outros compósitos, os valores de luminosidade dos filmes não

apresentaram diferença significativa, já que todos apresentaram alta luminosidade ($> 95\%$), ou seja, não absorveram muita luz.

Resultado similar foi obtido por Qin e colaboradores (2016), as luminosidades dos filmes de amido de milho e *whiskers* de α -quitina (0,5 , 1, 2 e 5%) não apresentaram diferenças apesar da carga de *whiskers* ter alterado a matriz de amido de milho.

Já os parâmetros a^* e b^* diferem de filme para filme, embora tenham a mesma tendência, isto é, a^* é negativo e indica verde para todas as amostras e b^* é positivo e indica amarelo para todas as amostras. O fato de um filme ser mais amarelo que o outro, no caso, Qsw₅ e Qsw₁₀ serem mais amarelos que os demais pode estar relacionado a maneira e forma de armazenamento. Uma vez que os filmes foram preparados em bateladas e armazenados por períodos diferentes, é possível que os resultados estejam afetados pelo tempo de armazenamento, que aparentemente resulta em alteração da coloração dos filmes, que tendem a ser mais amarelados quanto maior o tempo de armazenamento.

Da mesma forma que para a luminosidade os resultados estão de acordo com os encontrados por Qin e colaboradores (2016), que relataram $a^* \approx -1,5$ e $b^* \approx 1$, indicando predominância de amarelo e de verde, respectivamente. Qin e colaboradores (2016) relataram que o aumento da carga de *whiskers* diminuiu o valor de a^* e aumentou o valor de b^* , enquanto neste trabalho não foi observada uma tendência definida de variação desses parâmetros em função da carga e das dimensões dos *whiskers* de beta-quitina.

Na Tabela 3 estão dispostos os valores de ângulo Hue, obtidos para os filmes compósitos analisados.

Tabela 3 : Ângulo Hue para cada filme compósito analisado para ambos os lados dos filmes.

Filme Compósito	Ângulo (°) lado Secagem	Ângulo (°) lado Placa
Qs	100,4	100,4
Qsw2,5	101,1	101,0
Qsw5	101,8	101,6
Qsw10	101,7	101,5
Qsw20	99,0	98,9
QsW2,5	97,9	97,8
QsW5	98,5	98,4
QsW10	99,3	99,1
QsW20	98,6	98,3

Conforme os dados da Tabela X os ângulos de Hue compósitos analisados varia de 98 A 101°, ou seja, todos tendem a amarelo, pois valores de ângulo de Hue entre 0°-90° indicam vermelho, 90°-180° amarelo, 180°-270° verde e 270°-360° azul. Para os filmes formulados com *whiskers* de maior granulometria o ângulo é menor do para os filmes formulados com *whiskers* de menor granulometria que são mais similares ao filme Qs.

5. Conclusão

Os filmes compósitos à base de quitosana e *whiskers* de beta-quitina apresentaram propriedades que quando comparadas aos trabalhos disponíveis na literatura indicam sua potencialidade para aplicações biomédicas. A hidrólise ácida da beta-quitina proporcionou a formação de *whiskers*, que foram incorporados como reforços na matriz de quitosana. Assim, foi observado que as propriedades mecânicas dos filmes compósitos, isto é aqueles aos quais *whiskers* de beta-quitina foram incorporados, foram superiores em comparação ao filme composto apenas por quitosana, principalmente no que diz respeito ao alongamento na ruptura. A incorporação dos *whiskers*, independentemente da fração de beta-quitina empregada, não alterou a espessura e luminosidade dos filmes, porém a utilização dos *whiskers* produzidos a partir da fração de beta-quitina composta por partículas maiores ($> 425 \mu\text{m}$), resultou em aglomerados, enquanto os *whiskers* produzidos a partir da outra fração de beta-quitina (partículas $< 125 \mu\text{m}$) apresentaram melhor dispersão na matriz polimérica. O caráter hidrofílico foi mais acentuado nas superfícies dos filmes compósitos em comparação ao filme de quitosana. Tais resultados indicam que importantes características e propriedades dos materiais estudados, isto é filmes cuja matriz de quitosana é reforçada com *whiskers* de beta-quitina, são afetadas pela carga e pelas dimensões dos reforços incorporados. O potencial uso desses materiais na formulação de curativos é indicado desde que estudos avançados sejam desenvolvidos.

6. Referências Bibliográficas

- AKELAND, D. R. **The science and engineering of materials**. 3ª edição, Ed. Chapman & Hall, 1996.
- ARMENTANO, I. ; DOTTORI, M. ; FORTUNATI, E., MATTIOLI, S. ; KENNY, J.M. Biodegradable polymer matrix nanocomposites for tissue engineering : A review. **Polymer Degradation and Stability**, v. 95, p. 2126-2146, 2010.
- AZEREDO, V.V.C. ; CHAVES, S.A. ; BEZERRA, D.C. ; LIA FOOK, M.V. ; COSTA, A.C.F.M. Quitina e Quitosana : aplicações como biomateriais. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**. v. 2.3, p. 27-34, 2007.

- CAMPANA-FILHO, S.P ; DE BRITTO, D. ; CURTI, E. ; ABREU, F.R. ; CARDOSO, M.B. ; BATTISTI, M.V. ; SIM, P.C. ; GOY, R.C. ; SIGNINI, R., LAVALL, R. Extração, estruturas e propriedades de α - e β -quitina. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 644-650, 2007.
- CHEN, C. ; LI, D. ; HU, Q. ; & WANG, R. Properties of polymethyl methacrylate-based nanocomposites: Reinforced with ultra-long chitin nanofiber extracted from crab shells. **Journal of Materials & Design**, v.56(C), p.1049–1056, 2014.
- CLAUSSARD, G. ; DOMARD, A. New aspects of the extraction of chitin from squid pens. **Biomacromolecules**, p. 599-564, 2004.
- COMA, V. ; DESCHAMPS, A. ; MARTIAL-GROS, A. Bioactive packaging materials from edible chitosan polymer-Antimicrobial activity assessment on dairy-related contaminants. **Journal of Food Science**, v.68 ? n.9, p.2788–2792, 2003.
- CORSELLO, F.A. ; BOLLA, P.A. ; ANBINDER, P.S. ; SERRADELL, M.A. ; AMALVY, J.I. ; PERUZZO, P.J. Morphology and properties of neutralized chitosan-cellulose nanocrystals biocomposite films. **Carbohydrate Polymers**, v.156, p.452-459, 2017.
- CUNHA, P.L.R.; PAULA, R. C. M.; FEITOSA, J. P. A. Polissacarídeos da biodiversidade brasileira: Uma oportunidade de transformar conhecimento em valor econômico. **Química nova**, v.32, n.3, p.649-660, 2009.
- DENG, Q.; LI, J.; YANG, J.; LI, D. Optical and flexible \hat{I} ±-chitin nanofibers reinforced poly(vinyl alcohol) (PVA) composite film: Fabrication and property.Composites Part A. **Applied Science and Manufacturing**, v.67(C), p.55–60, 2014.
- DOLPHEN, R.; THIRAVETTYAN, P. Absorption of melanoidins by chitin nanofibers. **Chemical Engineering Journal**, v.166, p.890-895, 2011.
- DOMARD, A. A perspective on 30 years research on chitin and chitosan. **Carbohydrate Polymers**, v.84, p.696–703, 2011.
- DOMARD, A. ; RINAUDO, M. **Preparation and characterization of fully deacetylated chitosan. International Journal of Biological Macromolecules**, 5,C. Jeuniaux, R. A. A. Muzzarelli, & G. A. F. Roberts (Eds.). Advances in chitin science (Vol. 1, pp. 204–209). Lyon: André Publisher, 1983.
- DUFRESNE, A. Processing of Polymer Nanocomposites Reinforced with Polysaccharide Nanocrystals. **Molecules**, v.15, n.6, p.4111-4128, 2010.
- FAM, Y. ; SAITO, T., ISOGAI, A. Individual chitin nano-*whiskers* prepared from partially deacetylated α -chitin by fibrilsurface cationization. **Carbohydrate Polymers**, v.79, p. 1046-1051, 2010.
- FAN, Y. ; SAITO, T. ; & ISOGAI, A. Chitin nanocrystals prepared by TEMPO-mediated oxidation of chitin. **Biomacromolecules**, v.9, n.1, p.192–198, 2008a.
- FAN, Y. ; SAITO, T. ; & ISOGAI, A. Preparation of chitin nanofibers from squidpen -chitin by simple mechanical treatment under acid conditions. **Biomacromolecules**, v.9, n.7, p.1919–1923, 2008b.
- FANI, M. Gelifiantes. **Food Ingredients Brasil**, n. 27, v. XV, 2013.
- FARIAS, M.G; DE LIMA, R.F.M; DE CARVALHO, C.W.P. Efeito do ângulo de contato e atividade de água em filmes de amido. III SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PÓS-COLHEITA – SPC, 2011. p. 343-346.
- FIAMINGO, A. ; DELEZUK, J.A.M. ; TROMBOTTO, S. ; DAVID, L. ; CAMPANA-FILHO, S.P. Extensively deacetylated high molecular weight chitosan from multistep ultrasound-assisted deacetylation of beta-chitin. **Ultrasonics Sonochemistry**, v.32, p. 79-85, 2016.
- FONSECA, S.F.; Utilização de embalagens comestíveis na indústria de alimentos. Pelotas. 34 p. Trabalho acadêmico da disciplina Seminário de Alimentos – Universidade Federal de Pelotas, 2009.
- GUPTA, N. S. **Chitin-Formation and Diagenesis**. Springer : 2010. 1 st ed., v. 34.
- HABIBI, Y.; LUCIA, L. A.; ROJAS, O. J. Cellulose nanocrystals : chemsitry, self-assembly and applications. **Chemical Reviews**, v.110, n.6, p.3479-3500, 2010.
- HAMLEY, I. W. Liquid crystal phase formation by biopolymers. **Soft Matter**, v.6, n.9, p.1863–1871, 2010.
- HE, Y. ; WANG, J. A novel method to prepare ZnS whiskers. **Materials Letters**, v.62, p. 1379-1381, 2008.
- HIRAI, A. ; ODANI, H. ; NAKAJIMA, A. Determination of degree of deacetylation of chitosan by 1H NMR spectroscopy. **Polymer Bulletin**, v.26, p.87–94, 1991.
- IZUMI, R.; AZUMA, K.; IZAWA, H.; MORIMOTO, M.; NAGASHIMA, M.; OSAKI, T. Chitin nanofibrils suppress skin inflammation in atopic dermatitis-like skin lesions in NC/Nga mice. **Carbohydrate Polymers**, v.146, p.320–327, 2016.

- JOÃO, C. F. C. ; BAPTISTA, A. C. ; FERREIRA, I. M. M., SILVA, J. C. ; & BORGES, J. P. **Natural nanofibres for composite applications**. In S. Rana, & R. Figueiro (Eds.), *Fibrous and textile materials for composite applications*. 2016. Singapore: Springer Singapore. p. 261–299.
- JOÃO, C. F. C. ; SILVA, J. C. ; BORGES, J. P. **Chitin-based nanocomposites: Biomedical applications**. In V. K. Thakur, & M. K. Thakur (Eds.), *Eco-friendly polymer nanocomposites* (v. 74, p. 439–457, 2015). New Delhi: Springer India.
- JOÃO, C.F.C. ; ECHEVERRIA, C. ; VELHINHO, A. ; SILVA, J.C. ; GODINHO, M.H. ; BORGES, J.P. Bio-inspired production of chitosan/chitin films from liquid crystalline suspension. **Carbohydrate Polymers**, v.155, p. 372–381, 2017.
- KIRUTHIKA, A.V. A review on physico-mechanical properties of bast fibre reinforced polymer composites. **Journal of Building Engineering**, v.9, p.91–99, 2017.
- KONG, M.; CHEN, X.G. ; XING, K. ; PARK, H.J. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: a state of the art review. **International Journal of Food Microbiology** v.144, n.1, p.51–63, 2010.
- KUMAR, M.N.V.R. A review of chitin and chitosan applications. **Reactive and Functional Polymers**, v.46, p.1–27, 2000.
- KUMAR, P.T.S.; ABHILASH, S.; MANZOOR, K. Preparation and characterization of novel β -chitin/nanosilver composite scaffolds for wound dressing applications. **Carbohydrate Polymers**, v.80, p.761–767, 2010.
- LAMARQUE, G.; VITON, C.; DOMARD, A. Comparative study of the first heterogeneous deacetylation of alpha- and beta-chitins in a multistep process. **Biomacromolecules**, v. 5, p.992–1001, 2004.
- LEE, Y.M.; KIM S.S. ; PARK, M.H. ; SONG K.W. ; SUNG Y.K. ; KANG, I.K. β -Chitin-based wound dressing containing sulfurdiazine. **Journal of Materials Science : Materials in Medicine**, v.11, p. 817–823, 2000.
- LEVY NETO, F.; PARDINI, L.C. *Compósitos Estruturais. Ciência e Tecnologia*. 2ed. Edgard Blucher: São Paulo, 2016. 416 p.
- MA, H.Y.; BURGER, C.; HSIAO, B.S.; CHU, B. Ultrafine Polysaccharide Nanofibrous Membranes for Water Purification. **Biomacromolecules**, v. 12, p.970–976, 2011.
- MADHUMATHI, K. ; KUMAR, P.T.S.; ABHILASH, S. Development of novel chitin/nanosilver composite scaffolds for wound dressing applications. *Journal of materials science*. **Journal of Materials Science : Materials in Medicine**, v.21, p.807–813, 2009.
- MANEGHETTI, P. ; QUTUBUDDI, S. Synthesis, thermal properties and applications of polymer-clay nanocomposites. **Thermochimica Acta**, v.442, p.74–77, 2006.
- MARCHESSAULT, R. H.; MOREHEAD, F. F.; WALTER, N. M. Liquid crystal systems from fibrillar polysaccharides. **Nature**, v.184, p.632–633, 1959.
- MARTINS, J. T.; BOURBON, A. I. ; PINHEIRO, A. C. ; SOUZA, B. W. S. ; CERQUEIRA, M. A.; VICENTE, A. A. Biocomposite films based on carrageenan/locust bean gum blends and clays: physical and antimicrobial properties. **Food and Bioprocess Technology**, v.6, p.2081–2092, 2013.
- MINCEA, M.; NEGRULESCU, A. ; OSTAFE, V. Preparation, modification and applications of chitin nanowhiskers: a review. **Reviews on advanced Materials Science**, v.30, p. 225–242, 2012.
- MINOLTA. Precise Color Communication: **Color Control from Feeling to Instrumentation**. Osaka: MINOLTA Co. Ltda., 1994. 49 p.
- MOREIRA, P.S.V. ; RODRIGUES, T. ; RODRIGUES, F.A. Desenvolvimento e Caracterização de filmes poliméricos para utilização com adesivos cutâneos. XV Congresso de Iniciação Científica, Universidade de Mogi das Cruzes. 2011.
- MORGANTI, P. Chitin nanofibrils and their derivatives as cosmeceuticals. In: Kim S-K (ed) *Chitin, chitosan, oligosaccharides and their derivatives: biological activities and applications*, CRC Press, New York, 2011.
- MORGANTI, P. ; MORGANTI, G. Chitin nanofibrils for advanced cosmeceuticals. **Clinics in Dermatology**, v.26, p.334–340, 2008.
- MORIN, A. ; DUFRESNE, A. Nanocomposites of chitin whiskers from *Riftia* Tubes and Poly(caprolactone) **Macromolecules**, v.35, n. 6, p. 2190–2199, 2002.
- NAGARWAL, R.C. ; KANT, S. ; SINGH, P.N. ; MAITI, P. ; & PANDIT, J. K. Polymeric nanoparticulate system: A potential approach for ocular drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v.136, p. 2–13, 2009.
- NAIR, K.G. ; DUFRESNE, A. Crab shell whisker reinforced Natural Rubber Nanocomposites. 1 Processing and swelling Behavior. **Biomacromolecules**, v.4, n.3, p. 657–665, 2003.

- PAILLET, M.; DUFRESNE, A. Chitin whisker reinforced thermoplastic nanocomposites. **Macromolecules**, v.34, n.19, p. 6527-6530, 2001.
- PASTOR, C.; SANCHEZ6GONZALEZ, L.; CHIRALT, A.; CHAFER, M.; GONZALEZ-MARTINEZ, C. **Physical and antioxidant properties of chitosan and methylcellulose based films containing resveratrol**. *Food Hydrocolloids*, v. 30, n. 1, p. 272-280, 2013.
- PILLAI, C.K.S.; PAUL, W.; SHARMA, C. P. Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation. **Progress in Polymer Science**, v.34, n.7, p. 641-678, 2009.
- QIN, Y.; ZHANG, S.; YU, J.; YANG, J.; XIONG, L.; & SUN, Q. Effects of chitinnano-whiskers on the antibacterial and physicochemical properties of maizestarch films. **Carbohydrate Polymers**, v.147, p.372-378, 2016.
- RHIM, J.W., PARK, H.M., & HA, C.S. Bio-nanocomposites for food packagingapplications. **Progress in Polymer Science**, v.38, p.1629-1652, 2013.
- RINAUDO, M. Chitin and chitosan: properties and applications. **Progress in Polymer Science**, v.31, p. 603-632, 2006.
- RINAUDO, M.; MILAS, M.; LÊ DUNG, P. Characterization of chitosan influence of ionic strenfth and degree of acetylation on chain expansion. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.15, p. 281-285, 1993.
- ROBLES, E.; SALABERRIA, A. M.; HERRERA, R.; FERNANDES, S. C. M.; & LABIDI, J. Self-bonded composite films based on cellulose nanofibers and chitin nanocrystals as antifungal materials. **Carbohydrate Polymers**, v.144, p.41-49, 2016.
- SALABERRIA, A. M.; FERNANDES, S. C. M.; DIAZ, R. H.; & LABIDI, J. Processing of α -chitin nanofibers by dynamic high pressure homogenization: Characterization and antifungal activity against *A. niger*. **Carbohydrate Polymers**, v.116, p.286-291, 2015.
- SHIMAZAKI, Y.; MIYAZAKI, Y.; TAKEZAWA, Y.; NOGI, M.; ABE, K.; IFUKU, S.; YANO, H. Excellent thermal conductivity of transparent cellulose nanofiber/epoxy resinnanocomposites. **Biomacromolecules**, v.8, p.2976-2978, 2007.
- SIGNINI, R.; CAMPANA FILHO, S.P. On the preparation and characterization of chitosan hydrochloride. **Polymer Bulletin**, v. 42, p.156-166, 1999.
- SINGLETON, A.C.N.; BAILLIE, C.A.; BEAUMONT, P.W.R.; PEIJS, T. On the mechanical properties, deformation and fracture of a natural fibre/recycled polymer composite. **Composites Part B**, v. 34, p. 519-526, 2003.
- TANASE, C. E.; & SPIRIDON, I. PLA/chitosan/keratin composites for biomedicalapplications. **Materials Science and Engineering C**, v.40, p.242-247, 2014..
- VENTURA, A.M.S. Os Compósitos e a sua aplicação na Reabilitação de Estruturas metálicas. **Ciência & Tecnologia dos Materiais**, V. 21, n.3/4, p.10-19, 2009.
- YAN, L. Plain concrete cylinders and beams externally strengthened with natural flax fabric reinforced epoxy composites, **Materials and Structures**, v.49, p.2083-2095, 2016.
- ZAHEDI, P.; REZAEIAN, I.; RANAEI-SIADAT, S. O.; JAFARI, S. H.; & SUPAPHOL, P. Areview on wound dressings with an emphasis on electrospun nanofibrouspolymeric bandages. **Polymers for Advanced Technologies**, v.21, p.77-95, 2010.
- ZENG, J.; HE, Y.; Li, S.; WANG, Y. Chitin Whiskers : an Overview. **Biomacromolecules**, v. 13, p.1-11, 2012.
- ZIVANOVIC, S.; CHI, S.; DRAUGHON, A.F. Antimicrobial activity of chitosan films enriched with essential oils. **Journal of Food Science**, v.70, n.1, p.45-51, 2005.