



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAPÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

ERVETON PINHEIRO PINTO

**Estudo da molhabilidade e flexibilidade de filmes de quitosana
contendo glicerol para aplicações biomédicas**

Macapá
2018

ERVETON PINHEIRO PINTO

**Estudo da molhabilidade e flexibilidade de filmes de
quitosana contendo glicerol para aplicações biomédicas**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amapá para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Robert Ronald Maguiña Zamora.

**Macapá
2018**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Biblioteca Central da Universidade Federal do Amapá

615

P659e Pinto, Erveton Pinheiro.

Estudo da molhabilidade e flexibilidade de filmes de quitosana contendo glicerol para aplicações biomédicas / Erveton Pinheiro Pinto; orientador, Robert Ronald Maguiña Zamora. – Macapá, 2018. 85 f.

Dissertação (Mestrado) – Fundação Universidade Federal do Amapá, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. Filme de quitosana. 2. Glicerol. 3. Molhabilidade. 4. Flexibilidade. I. Zamora, Robert Ronald Maguiña, orientador. II. Fundação Universidade Federal do Amapá. III. Título.

**Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
da Universidade Federal do Amapá**

BANCA EXAMINADORA

Aluno(a): Erveton Pinheiro Pinto.

Orientador(a): Prof. Dr. Robert Ronald Maguiña Zamora.



Prof. Dr. Robert Ronald Maguiña Zamora / Presidente

Professor Titular do Curso de Física da Universidade Federal do Amapá, UNIFAP.



Prof. Dr. Tiago Marcolino de Souza / Membro Titular

Professor Titular do Curso de Engenharia Química da Universidade do Estado do Amapá, UEAP.



Prof. Dr. Francisco Fábio Oliveira de Sousa / Membro Titular

Professor Titular do Curso de Farmácia da Universidade Federal do Amapá, UNIFAP.

Data: 29/01/2018

Dedico este trabalho a toda a minha família!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida oferecida a mim, assim como pelas condições físicas e psicológicas sem as quais eu não seria a pessoa que sou hoje.

Agradeço a toda minha família, em especial a minha esposa Danizele Ramos Miranda e minhas filhas Emily Sophya Miranda Pinheiro e Maria Helena Miranda Pinheiro pelo amor incondicional e compreensão durante os momentos em que estive ausente em suas vidas devido ao trabalho de dissertação.

Agradeço aos meus amigos pelos momentos de motivação e discussão referente ao trabalho de dissertação e/ou disciplinas realizadas durante o curso de mestrado.

Agradeço a todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amapá, principalmente aqueles com quem estive em contato direto ao longo desses dois anos, tanto em disciplinas quanto em conversas pelo corredor do bloco do programa.

Agradeço ao professor Dr. Francisco Fabio Oliveira de Sousa pelo apoio durante a construção do trabalho de dissertação, principalmente, por ter fornecido os equipamentos, reagentes e espaço físico do Laboratório de Controle de Qualidade, Bromatologia e Microbiologia da Universidade Federal do Amapá para a produção das amostras.

Agradeço aos professores Dr. Rodrigo Prioli e Dr. Marcelo Huguenin que abriram as portas do Laboratório Van De Graaff, localizado na Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, tornando possível alguns testes que ajudaram bastante na caracterização das amostras analisadas.

Agradeço ao meu orientador, o professor Dr. Robert Ronald Maguiña Zamora, por confiar em mim e sempre está disposto a me ouvir, fazendo dessa relação orientador-orientando uma convivência amigável de compromisso e respeito. Agradeço também os conselhos e compreensão que meu orientador me ofereceu durante esses dois anos.

Por fim, agradeço a Universidade Federal do Amapá e ao Curso de Mestrado em Ciências Farmacêuticas desta instituição a oportunidade de agregar meus conhecimentos em Física com a Ciência Farmacêutica, neste curso pude evoluir profissionalmente e intelectualmente de tal forma que, após esses dois anos, me sinto mais preparado para contribuir significativamente dentro da comunidade científica.

1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	A QUITOSANA.....	3
1.1.1	Curativos a base de quitosana.....	4
1.2	O GLICEROL.....	5
1.3	MOLHABILIDADE.....	6
1.4	NANOPOROSIDADE.....	7
1.5	PROPRIEDADES MECÂNICAS.....	8
1.6	TÉCNICAS UTILIZADAS.....	9
1.6.1	Microscopia Eletrônica de Varredura.....	9
1.6.2	Microscopia de Força Atômica.....	10
1.6.3	Nanoindentação.....	12
1.6.4	Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier.....	15
1.6.5	Difratometria de Raio X.....	16
2	OBJETIVOS.....	18
2.1	OBJETIVO GERAL.....	18
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	19
3.1	TIPO DE PESQUISA E LOCAL DE ESTUDO.....	19
3.2	MATERIAIS.....	19
3.3	PREPARAÇÃO DOS FILMES DE QUITOSANA.....	20
3.4	CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES.....	21
3.4.1	Avaliação qualitativa.....	21
3.4.2	Espessura.....	21
3.4.3	Teste de sorção e solubilidade.....	21
3.4.4	Medidas de ângulo de contato e velocidade de captação de água.....	22

3.4.5	Estudo da morfologia e análise topográfica.....	23
3.4.5.1	Algoritmo da Entropia Topográfica.....	26
3.4.5.2	Algoritmo do Percentual Poroso Superficial.....	28
3.4.6	Nanoindentação Instrumentada.....	30
3.4.7	Obtenção dos espectros por Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR).....	31
3.4.8	Obtenção dos difratogramas por Difratometria de Raio X (DRX).....	31
3.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	32
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
4.1	AVALIAÇÃO QUALITATIVA.....	33
4.2	ESPESSURA.....	33
4.3	SORÇÃO E SOLUBILIDADE.....	35
4.4	ÂNGULO DE CONTATO E VELOCIDADE DE CAPTAÇÃO DE ÁGUA.....	37
4.5	MORFOLOGIA E ANÁLISE TOPOGRÁFICA.....	42
4.5.1	Rugosidade RMS e Uniformidade Topográfica.....	45
4.5.2	Nonoporosidade.....	48
4.6	PROPRIEDADES MECÂNICAS.....	52
4.7	ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR).....	54
4.8	DIFRATOMETRIA DE RAIO X (DRX).....	59
5	CONCLUSÕES.....	61
	REFERÊNCIAS.....	65
	APÊNDICE.....	71

Figura 1 – Fórmula estrutural do anel glicopiranosídico (unidade de repetição monomérica da quitosana).....	4
Figura 2 – Estrutura química da molécula de glicerol.....	6
Figura 3 – Representação esquemática de alguns tipos de poros: fechados (a), abertos (b), abertos penetrantes (c), tipo garrafa (d) e tipo funil (e).....	8
Figura 4 – Esquema de funcionamento do MEV.....	10
Figura 5 – Esquema de funcionamento do AFM.....	11
Figura 6 – Curvas de carga-descarga para materiais com comportamentos: totalmente plástico (a), elasto-plástico (b) e totalmente elástico (c).....	12
Figura 7 – Ilustração da geometria da superfície da amostra nas situações de carga máxima e após a retirada do indentador.....	13
Figura 8 – Curva carga versus deslocamento para um carregamento elasto-plástico seguido por descarga elástica.....	14
Figura 9 – Princípio de funcionamento do DRX.....	17
Figura 10 – Método de evaporação do solvente (<i>casting</i>).....	20
Figura 11 – Ilustração do ângulo de contato (θ) e altura H da gota.....	22
Figura 12 – Goniômetro da empresa Ramé-Hart Instrument Co: visão geral do aparelho (a) e imagem do porta-amostras no momento em que a gota interage com a superfície (b).....	23
Figura 13 – MEV da empresa Hitachi.....	24
Figura 14 – AFM da empresa Park Systems.....	24
Figura 15 – Boxplot da matriz de alturas de uma imagem de AFM.....	26
Figura 16 – Imagem binária para o cálculo da Sucolaridade.....	38
Figura 17 – Nanoindentador da empresa Hysitron Incorporated.....	30
Figura 18 – Espectrofotômetro da empresa Shimadzu.....	31
Figura 19 – DRX da empresa Bruker.....	32

Figura 20 – Filmes de quitosana para as diferentes composições: CH (a), CHG1 (b), CHG2 (c) e CHG3 (d).....	33
Figura 21 – Teste de correlação e regressão linear entre as variáveis espessura e composição da amostra.....	34
Figura 22 – Evolução temporal da altura da gota de água sobre as amostras.....	37
Figura 23 – Efeito físico sobre as medidas de ângulo de contato: alto poder de sorção (a), baixo poder de sorção (b) e filme de quitosana após alguns segundos de contato com a gota de água (c).....	38
Figura 24 – Ilustração da interação água-filme.....	40
Figura 25 – Ilustração da interação água-filme/glicerol.....	41
Figura 26 – Teste de correlação e regressão linear entre as variáveis ângulo de contato e composição da amostra.....	42
Figura 27 – Imagens de MEV dos filmes obtidos: CH (a), CHG1 (b), CHG2 (c) e CHG3 (d).....	43
Figura 28 – Topografias dos filmes de quitosana: CH (a), CHG1 (b), CHG2 (c) e CHG3 (d).....	44
Figura 29 – Fotografia da amostra CH durante a aproximação da ponta do AFM.....	45
Figura 30 – Estado de molhabilidade de Wenzel (a) e Cassie-Baxter (b).....	47
Figura 31 – Zoom das imagens e perfil dos poros em: CH (a), CHG1 (b), CHG2 (c) e CHG3 (d).....	49
Figura 32 – Curvas de carga e descarga em função da profundidade de penetração para os filmes: CH (a), CHG1 (b), CHG2(c) e CHG3 (d).....	52
Figura 33 – Espectros de FTIR do glicerol e da quitosana em pó.....	54
Figura 34 – Ligações de hidrogênio entre as moléculas de quitosana.....	55
Figura 35 – Espectros de FTIR da quitosana e do filme de quitosana (CH)..	57
Figura 36 – Reação entre a carboxila do ácido acético e a amina da quitosana.....	57
Figura 37 – Reação da carboxila com o álcool.....	58
Figura 38 – Espectros de FTIR das amostras: CH, CHG1, CHG2 e CHG3...	59
Figura 39 – Difractogramas dos filmes de quitosana obtidos.....	60

Quadro 1 – Composições dos filmes de quitosana.....	21
Tabela 1 – Valores de espessura dos filmes secos (média $\pm$ DP, n = 6).....	34
Tabela 2 – Poder de absorção de água e solubilidade dos filmes (média $\pm$ DP, n = 5).....	35
Tabela 3 – Medidas de ângulo de contato (média $\pm$ DP, n = 100).....	40
Tabela 4 – Valores de RMS e Entropia Topográfica (média $\pm$ DP, n = 6).....	46
Tabela 5 – Diâmetro e distribuição dos poros (média $\pm$ DP, n = 100).....	50
Tabela 6 – Percentual Poroso Superficial para cada amostra (média $\pm$ DP, n = 6).....	51
Tabela 7 – Valores de rigidez (S), dureza (H), módulo elástico (E) e profundidade residual (h_f) (média $\pm$ DP, n = 12).....	53

SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

€	Pertence
∉	Não pertence
μl	Microlitro
μN	Micronewton
μN/nm	Micronewton por nanômetro
Å	Angstroms
AFM	<i>Atomic Force Microscope</i>
Cm	Centímetro
DP	Desvio Padrão
DRX	Difratometria de Raio X
FTIR	Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier
g/mol	Gramas por mol
GPa	Gigapascal
H	Horas
kHz	Quilohertz
kV	Quilovoltz
LabMat	Laboratório de Ciências dos Materiais
LAI	Laboratório de Análise Instrumental
LCBM	Laboratório de Controle de Qualidade, Bromatologia e Microbiologia
LPFar	Laboratório de Pesquisa em Fármacos
LVDG	Laboratório Van De Graaff
M	Metro
mA	Miliampère
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
ml	Mililitro
N	Mol por litro
N.m ⁻¹	Newton por metro
nm	Nanômetro
°C	Graus Celsius
p/p	Peso por peso
p/v	Peso por volume

PUC-RJ	Pontificia Universidade Católica do Rio de Janeiro
RMS	<i>Root Mean Square</i>
UNIFAP	Universidade Federal do Amapá
v/v	Volume por volume

Estudo da molhabilidade e flexibilidade de filmes de quitosana contendo glicerol para aplicações biomédicas

RESUMO

Introdução: O uso do filme de quitosana em aplicações biomédicas tem um grande potencial terapêutico, devido as suas boas propriedades que incluem biodegradabilidade e atividade antimicrobiana. **Objetivo:** Assim, o objetivo foi de avaliar os efeitos do glicerol, incorporado ao biomaterial, sobre a molhabilidade e a flexibilidade do filme de quitosana. **Metodologia:** Foram preparados por *casting*, filmes sem glicerol e filmes contendo 3,125%, 6,25% e 25% (p/p) de glicerol. Em seguida, foram realizadas medidas de espessura; medidas de ângulo de contato; medidas de propriedades mecânicas; caracterização morfológica por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Microscopia de Força Atômica (AFM); análises de Espectroscopia no Infravermelho e Difratometria de Raio X, além de testes de sorção e solubilidade em água. Todos os resultados comparados através de análise de variância (ANOVA), seguido por Teste de Tukey ($p < 0,05$). **Resultados e discussões:** Apenas a espessura do filme contendo 25% de glicerol apresentou diferença significativa em relação à amostra padrão. Todas as amostras apresentaram grande capacidade de sorção e baixa solubilidade em água. As medidas de ângulo de contato indicaram que a molhabilidade do filme aumentou com o aumento da concentração de glicerol. Os resultados da Nanoindentação indicaram que a flexibilidade do filme melhorou com a adição de plastificante. As imagens de MEV revelaram uma estrutura interna fibrosa em forma de placas, enquanto que as topografias por AFM denunciaram a superfície nanoporosa e irregular dos filmes de quitosana, sendo que a rugosidade diminuiu com o aumento da concentração de glicerol. Os espectros e os difratogramas dos filmes obtidos mostraram que a adição de glicerol não modificou significativamente a estrutura química do filme de quitosana. **Conclusões:** O filme de quitosana com 25% de glicerol foi o que apresentou melhores características para uma possível aplicação na área biomédica, sendo o mais molhável e flexível entre todas as amostras.

Palavras-Chave: filme de quitosana; glicerol; molhabilidade; flexibilidade.

Agradecimentos: UNIFAP, UEAP, PUC-RJ, PPGCF e CAPES.

Study of the wettability and flexibility of chitosan films containing glycerol for biomedical applications

Introduction: The use of chitosan film in biomedical applications has a large therapeutic potential, due to its good properties that include biodegradability and antimicrobial activity.

Objective: The objective was to evaluate the effects of the concentration of the glycerol plasticizer incorporated in the chitosan film on the wettability and flexibility of the biomaterial.

Methodology: Were prepared films without glycerol (standard sample) and films containing 3.125%, 6.25% and 25% (w/w) of glycerol using cast method. Then, thickness measurements; contact angle measurements; measurements of mechanical properties; morphological and topographic characterization with the assistance of an scanning electron microscopy (SEM) and Atomic Force Microscopy (AFM); x-ray diffraction and Infrared Spectroscopy analysis, besides tests of absorption and solubility in water were made. All results compared through One-way ANOVA ($p < 0.05$), followed by Tukey's Test.

Results and discussion: Only the thickness of the film with 25% of glycerol presented a significant difference in relation to the standard sample. All samples presented high sorption power and low solubility in water. The contact angle measurements indicated that the wettability of the film increased with the increase of the concentration of glycerol. The results of Nanoindentation indicated that the flexibility of the film improved with the addition of glycerol. MEV images revealed a fibrous internal structure in the form of plaques, and topographies of AFM showed that the chitosan film had a nanoporous and irregular surface, the roughness decreased with concentration of glycerol. Diffractograms and spectra of the films showed that the glycerol addition did not significantly modify the chemical structure of the chitosan film.

Conclusions: The chitosan film with 25% of glycerol presented the best characteristics for a possible application in biomedical area, showing to be the most wettable and flexible among all the samples.

Keywords: chitosan film, glycerol, wettability, flexibility.

Acknowledgements: UNIFAP, UEAP, PUC-RJ, PPGCF e CAPES.

O corpo humano é recoberto por aproximadamente dois metros quadrados de pele que, além de desempenhar o papel de barreira aos ataques externos, ainda é responsável pela regulação da temperatura corpórea e pela remoção de impurezas (DALLAN, 2005). Por isso, a cura de uma lesão cutânea (qualquer anomalia causada na pele) é sempre algo delicado, pois não é tão simples quanto parece, de fato inclui uma vasta gama de processos celulares, moleculares, fisiológicos e biológicos (KIM et al., 2008). O escalpelamento, por exemplo, é um trauma de tratamento extremamente complexo.

À vista disso, agentes patológicos introduzidos na ferida, no ato da lesão, causam respostas inflamatórias, atrasando a cura e, algumas vezes, levando à formação de granulomas ou abscessos (BOATENG et al., 2008). Por exemplo, existem bactérias patogênicas, como a *Staphylococcus Aureus* e a *Pseudomona Aeruginosa* que podem prejudicar o processo de cura (KUMAR, 2000).

Dessa forma, os curativos formam um importante segmento do mercado mundial de produtos médicos e farmacêuticos. No passado, a função primária de um curativo era a de permitir a evaporação dos exsudatos (fluido inflamatório extravascular) e prevenir a entrada de bactérias na ferida (DALEY, 1996).

Todavia, os curativos modernos, por outro lado, baseiam-se no conceito de criar um ambiente ótimo para a movimentação das células epiteliais, com o intuito de promover o fechamento da ferida. Tais condições ótimas incluem um ambiente úmido ao redor da lesão e uma circulação efetiva de oxigênio para ajudar na regeneração das células e tecidos. Outras características importantes e que devem ser consideradas são a aderência à ferida, a porosidade, a macroestrutura e as dimensões do curativo, suas propriedades mecânicas, a taxa de biodegradação e a ausência de antigenicidade (BOATENG et al., 2008).

Neste contexto, nos últimos anos, a busca por novos biomateriais cresceu consideravelmente, uma vez que polímeros naturais como os alginatos, o ácido hialurônico, a celulose, o colágeno, a quitosana e a gelatina, entre outros, se mostram com grande potencial para a regeneração da pele. Esses polímeros naturais podem ser usados como agentes gelificantes, excipientes para dar consistência a cremes, matrizes em adesivos, curativos tipo esponja, hidrogéis, membranas e adesivos em sistemas de liberação controlada de fármacos (SILVA et al., 2008).

Além disso, os biopolímeros, em sua maioria, ainda apresentam a vantagem de serem biodegradáveis e isso os torna mais atrativos do que os biomateriais tradicionais, os quais apresentam problemas de biocompatibilidade e biodegradabilidade quando implantados por períodos longos de tempo. Os polímeros naturais não apresentam problemas de biocompatibilidade, pois sendo componentes naturais de seres vivos apresentam semelhança química e biológica aos tecidos naturais (KIM et al., 2008).

Nesta conjuntura, a quitosana se destaca pelo seu amplo leque de aplicações, combinado com suas propriedades biológicas singulares, que incluem biocompatibilidade, biodegradabilidade, não-toxicidade, inércia fisiológica e atividade antimicrobiana (LARANJEIRA; DE FÁVERE, 2009). Darmadji e Izumimoto (1996), por exemplo, relatam que concentrações de quitosana maiores que 0,1% são suficientes para inibir o crescimento de *Escherichia Coli*.

A quitosana ainda possui a vantagem de formar filmes, o que possibilita o uso deste polímero como agente encapsulante para sistemas de liberação controlada, agente quelante em tratamento de água e agente antimicrobiano. Além disso, o uso do filme de quitosana como curativo tem um grande potencial terapêutico, nos Estados Unidos, por exemplo, já está sendo comercializado, faz alguns anos, o curativo Chitoflex, feito à base de quitosana, da empresa HemCon®.

Por outro lado, a quitosana apresenta certas limitações ao formar filmes devido à baixa molhabilidade e pouca flexibilidade dos filmes formados, o que dificulta a utilização destes como biomaterial (ROTTA, 2008). Molhabilidade é uma propriedade que indica o quanto um líquido pode se espalhar sobre uma superfície (JOHNSON; DETTERE, 1993; GENNES, 2003). E a flexibilidade está relacionada à resistência do material a deformações elásticas (CALLISTER; RETHWISCH, 2016). Ambas as propriedades influenciam a qualidade e a eficácia do uso do filme de quitosana em aplicações biomédicas. Zheng et al. (2009), por exemplo, relataram que o aumento da molhabilidade favorece a adesão, proliferação e diferenciação de células da linhagem PC12.

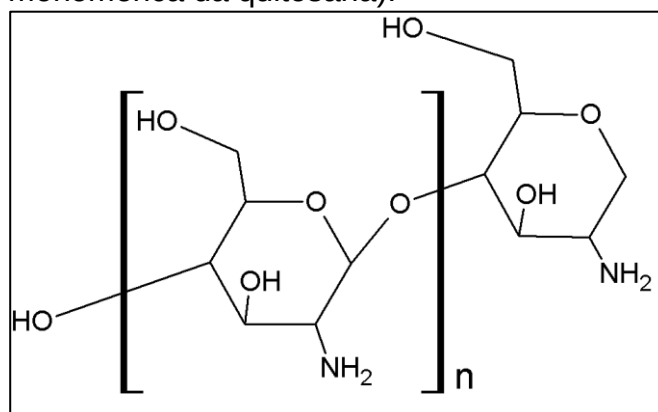
Neste contexto, utilizando o glicerol como agente plastificante na solução filmogênica, sendo a molécula de glicerol do tipo hidrofílica, ao mesmo tempo em que as propriedades mecânicas são melhoradas na presença do plastificante, existe a possibilidade da molhabilidade do filme também melhorar.

1.1 A QUITOSANA

A quitosana é um polissacarídeo catiônico derivado da quitina presente em cascas de camarão, caranguejo e insetos, é insolúvel em água e o segundo polímero natural mais abundante na natureza (LI et al., 2010). Esse polímero é obtido pela desacetilação da quitina, que é a substituição de grupos acetilas ($-\text{COCH}_3$) por grupos aminas livres ($-\text{NH}_2$), que por sua vez, podem ser protonados em meio ácido ($-\text{NH}_3^+$), fazendo com que a quitosana seja solúvel em soluções ácidas de ácidos como: acético, cítrico, ascórbico, láctico, málico, oxálico, succínico, adípico e propiônicos. O grau de desacetilação na quitina e na quitosana é de 5 a 15 % e de 70 a 95 %, respectivamente (SANTOS, 2006; ZHONG; SONG; LI, 2011).

Estruturalmente a quitosana é constituída pela repetição do anel glicopiranosídico (figura 1) e possui composição variável em função do grau médio de acetilação (WANG et al., 2005; CISSÉ et al., 2012).

Figura 1 – Fórmula estrutural do anel glicopiranosídico (unidade de repetição monomérica da quitosana).



Fonte: do autor.

Como mencionado anteriormente, todas as possíveis aplicações deste polímero são devido às propriedades de biodegradabilidade, biocompatibilidade, não-toxicidade, disponibilidade comercial (baixo custo), possibilidade de formar filmes antimicrobianos e insolubilidade em soluções aquosas neutras e alcalinas, a qual é influenciada pelo seu grau de desacetilação, estrutura molecular e força iônica do meio (BEVERLYA et al., 2008).

É importante destacar também, que filmes a base de quitosana apresentam propriedades de barreira moderada ao oxigênio, boas propriedades de barreira ao dióxido de carbono, porém, alta permeabilidade ao vapor de água e grande poder de sorção (SÁNCHE-GONZÁLES et al., 2010), o que limita a sua utilização.

Por outro lado, as moléculas de quitosana são compostas de porções hidrofílicas e hidrofóbicas, fazendo com que o polímero possa atuar estabilizando hidrocolóides (misturas lipídicas), promovendo a formação de emulsão e estabilidade interfacial (MARTINS; CERQUEIRA; VICENTE, 2012).

1.1.1 Curativos a base de quitosana

Devido as boas propriedades da quitosana, muitas aplicações para este biomaterial e seus derivados já foram propostas, inclusive o uso como curativo. Kumar (2000), por exemplo, verificou através de testes *in vitro* que membranas de quitosana podem inibir o

crescimento de *Escherichia coli* e *Helminthosporium*, devido a uma provável ligação do grupo amina protonado do biopolímero aos grupos aniônicos destes microorganismos.

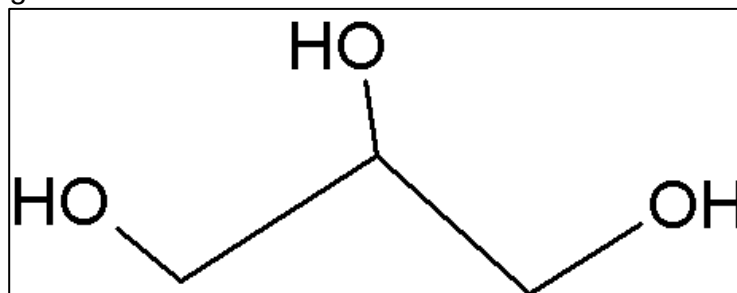
Além disso, foi observado que os oligossacarídeos da quitosana possuem um efeito estimulante sobre os macrófagos e, em testes *in vitro* e *in vivo*, foi confirmado que tanto a quitosana quanto a quitina atraem os neutrófilos, o que é importante para a cura de uma lesão cutânea (SHI et al., 2006). Outros estudos mostram que membranas de quitosana não são citotóxicas quando testadas com fibroblastos (SILVA et al., 2008) e queratinócitos (CHATELET et al., 2001). Por outro lado, estudos clínicos já provaram que feridas humanas tratadas com membranas de quitosana cicatrizam mais rápido em comparação aos tratamentos tradicionais (SANTOS et al., 2007).

1.2 O GLICEROL

Existem inúmeras aplicações na área biomédica para os filmes a base de polímeros naturais, como já mencionado anteriormente, entretanto, algumas características físicas são exigidas, de acordo com a finalidade da utilização, para que haja êxito. Neste contexto, a adição de plastificantes na solução que origina o filme polimérico tem sido uma alternativa na busca de reduzir a fragilidade, melhorar o escoamento e aumentar a flexibilidade, tenacidade, tração e resistência ao impacto (LIMA et al., 2007).

À vista disso, o uso do glicerol (1,2,3 propanotriol) em soluções filmogênicas, com o intuito de melhoramento dos filmes, é justificável. Tal agente plastificante, também conhecido como glicerina, é um álcool simples, que quando puro é incolor, viscoso e inodoro. Formado por 3 hidroxilas que são responsáveis pela solubilização em água e por sua natureza hidrofóbica (WANG et al., 2001; SILVA et al., 2009; RAHMAT et al., 2010), este é largamente empregado na indústria de cosméticos, alimentos, farmacêutica, papel e celulose. A Figura 2 mostra uma ilustração da molécula de glicerol.

Figura 2 – Estrutura química da molécula de glicerol.



Fonte: do autor.

Em filmes biodegradáveis, sabe-se que o glicerol atua reduzindo as pontes de hidrogênio, ampliando os espaços intermoleculares, aumentando a flexibilidade e a permeabilidade do filme (MCHUGH; KROCHTA, 1994).

Os pesquisadores McHugh e Krochta (1994), afirmam que o aumento do teor de glicerol promove o aumento da permeabilidade aos gases em filmes hidrofílicos, pois este aditivo liga-se as moléculas do biopolímero, aumentando a mobilidade e diminuindo a densidade entre suas moléculas, facilitando assim a passagem dos gases através do material.

Assim, no trabalho apresentado aqui, estudou-se a influência do glicerol sobre a molhabilidade e a flexibilidade dos filmes de quitosana, variando a concentração do plastificante no intervalo de 3,125% a 25% em relação ao conteúdo polimérico da solução filmogênica.

1.3 MOLHABILIDADE

A molhabilidade de uma superfície refere-se à manifestação macroscópica da interação entre líquidos e sólidos, diz-se que a molhabilidade depende das forças coesivas (dentro do líquido) e das forças adesivas entre líquido e sólido. Neste contexto, o ângulo de contato entre uma gota de água e a superfície de um sólido é o resultado da competição entre essas duas forças (KEHWALD, 2009).

De fato, do ponto de vista macroscópico, a molhabilidade de uma superfície é caracterizada pelo ângulo de contato gota-superfície, que é uma medida do quanto a água

pode espalhar-se sobre a superfície. Assim, em relação a água, uma superfície pode ser classificada como hidrofílica ou hidrofóbica. Para ângulos de contato menores que 90° a amostra é considerada hidrofílica e para maiores que 90° hidrofóbica (BURKARTER, 2006).

Sendo assim, a partir das informações obtidas na análise do ângulo de contato é possível prever o comportamento do biomaterial quando em contato fisiológico com meios aquosos, como por exemplo, uma ferida altamente úmida. Para o tratamento de uma ferida altamente úmida é interessante que a superfície do curativo tenha uma certa hidrofiliabilidade, o que facilitaria a absorção e a aderência do curativo no decorrer do tratamento (ZHENG et al., 2009).

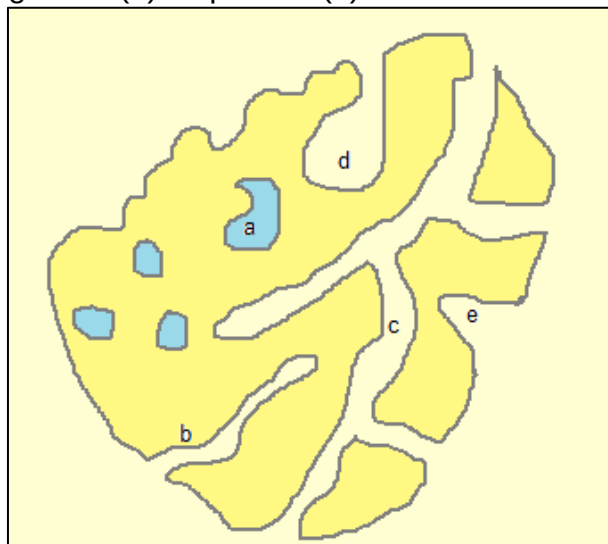
1.4 NANOPOROSIDADE

Um material nanoporoso é um material constituído por uma estrutura na fase sólida que possui no seu interior cavidades, canais ou interstícios na escala nanométrica (na ordem de 10^{-9} m). As propriedades deste tipo de material são efeitos tanto da natureza da parte sólida quanto da distribuição de tamanhos, forma e tipo de poros que possui (WARA, 1996).

Os poros têm sido classificados de acordo com três aspectos: disponibilidade ao ambiente externo, diâmetro e geometria (WARA, 1996). Pela sua conexão com a superfície externa, um poro pode ser classificado como fechado ou aberto. Os poros fechados se encontram isolados totalmente de seus vizinhos e determinam propriedades macroscópicas como resistência mecânica e condutividade térmica. Os poros abertos possuem canais contínuos que os comunicam com a superfície externa do material, gerando uma estrutura reticulada. A classificação de acordo com o diâmetro dos poros tem sido feita pela IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*), que os denomina como microporos (diâmetro < 2 nm), mesoporos (diâmetro na faixa de 2-50 nm) e macroporos (diâmetro > 50 nm) (GUOZHONG, 2004; FULVIO, 2009). A classificação geométrica dos poros os divide, geralmente, em poros cilíndricos, tipo funil, tipo fenda, com formato de garrafa e cavidades

ou ocos (HERNÁNDEZ, 2003). Algumas dessas classificações podem ser visualizadas na ilustração da figura 3.

Figura 3 – Representação esquemática de alguns tipos de poros: fechados (a), abertos (b), abertos penetrantes (c), tipo garrafa (d) e tipo funil (e).



Fonte: https://www.maxwell.vrac.puc-rio.br/19423/19423_3.PDF.

1.5 PROPRIEDADES MECÂNICAS

As propriedades mecânicas dos materiais são respostas às influências mecânicas externas, definindo relações entre forças externas aplicadas ao material e a capacidade mecânica de resposta desse material às tais forças. Esta resposta se apresenta através de deformações elásticas e plásticas. A deformação elástica ocorre quando o material se deforma de maneira reversível, isto é, após a retirada da carga aplicada o material volta a sua forma original. Já a deformação plástica ocorre quando o material ultrapassa o limite elástico ocasionando deformações irreversíveis e permanentes, ou seja, após a retirada da carga o material não consegue voltar a sua forma original (HALLIDAY; RESNICK, 2016).

Em escala atômica a deformação elástica é manifestada como pequenas alterações na posição dos átomos e distorções nas ligações interatômicas. Como consequência o Módulo de Elasticidade (ou Módulo de Young) é uma medida da resistência à separação dos átomos adjacentes no volume deformado. Em contrapartida, o processo de deformação

plástica, em escala atômica, vai depender do grau de ordenamento do material. No caso de matérias poliméricas amorfas a deformação plástica ocorre através da quebra das ligações atômicas e movimento das cadeias poliméricas. A propriedade mecânica associada à deformação plástica de um material é a Dureza, definida como a resistência do material à deformação plástica quando submetido a ação de uma força externa (CALLISTER; RETHWISCH, 2016).

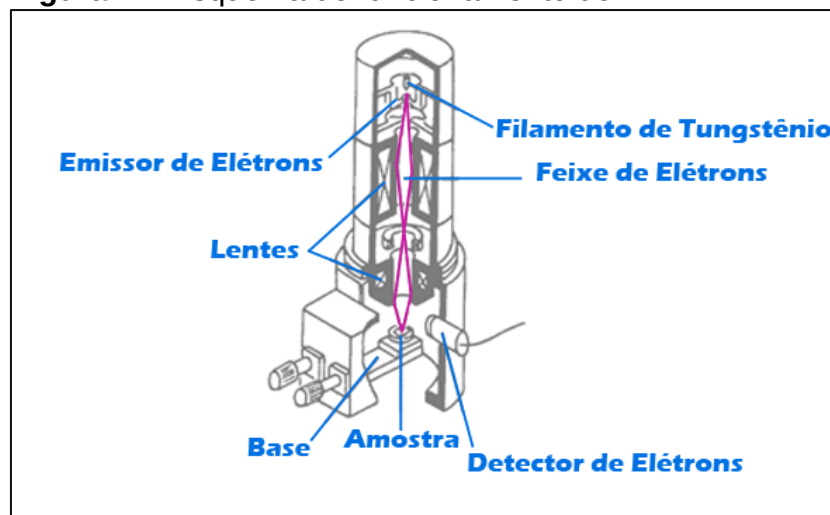
1.6 TÉCNICAS UTILIZADAS

1.6.1 Microscopia Eletrônica de Varredura

O Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) permite uma melhor visualização e tratamento das características morfológicas, em escala pequena, de estruturas mais sensíveis, como por exemplo, superfícies biológicas (COSTA JÚNIOR, 2008). Neste contexto, este equipamento foi utilizado para verificar o aspecto superficial dos filmes obtidos.

O princípio de funcionamento do MEV (figura 4) consiste na emissão de um feixe de elétrons por um filamento de tungstênio (eletrodo negativo), mediante a aplicação de uma diferença de potencial que pode variar de 0,5 a 30 kV. A variação de voltagem implica na aceleração dos elétrons e, conseqüentemente, no aquecimento do filamento. O eletrodo positivo (lado oposto ao filamento do microscópio) atrai fortemente os elétrons acelerados, movimentando-os em sua direção. A correção do percurso do feixe é realizada por lentes condensadoras que alinham o mesmo em direção à abertura da objetiva. A objetiva, por sua vez, ajusta o foco do feixe de elétrons antes deste atingir a amostra (GOLDSTEIN et al., 2003).

Figura 4 – Esquema de funcionamento do MEV.



Fonte: <http://www.degeo.ufop.br/laboratorios/microlab/mev.htm>

Durante a varredura, os sinais gerados pela interação do feixe de elétrons com a amostra (raios X, elétrons retroespalhados e elétrons secundários) são captados e fornecem as informações necessárias para a construção da imagem. Goldstein et al. (2003) diz que o MEV funciona semelhante a um Microscópio Óptico, exceto pelo fato de utilizar elétrons ao invés de luz para produzir imagens e lentes magnéticas ao invés de lentes de vidro para focalizar o feixe.

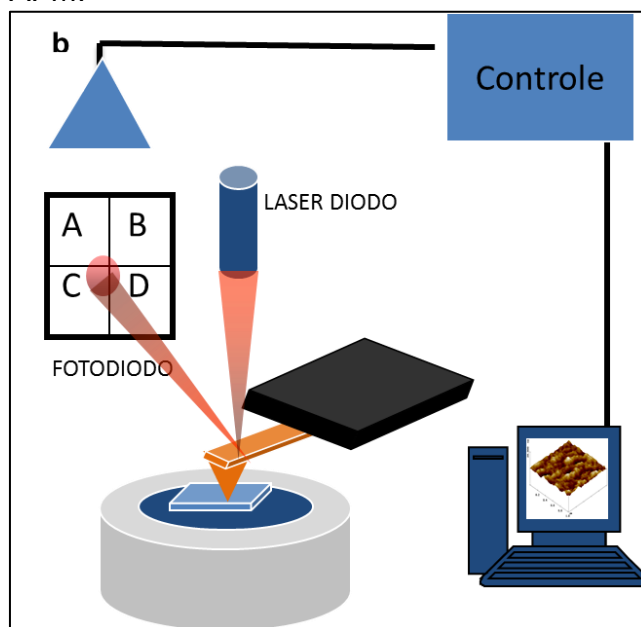
1.6.2 Microscopia de Força Atômica

A morfologia e a topografia dos filmes foram avaliadas através de um Microscópio de Força Atômica (AFM), tais características influenciam de forma significativa propriedades como: molhabilidade, aderência, velocidade de captação de água, rigidez, entre outras. O AFM é um tipo de microscópio de varredura por sonda, que registra as diferenças de alturas sobre a superfície da amostra através da interação atômica entre a ponta da sonda e a amostra analisada (ZANETTE, 2010).

Deveras, quando a ponta do AFM se aproxima da amostra, a uma distância da ordem de alguns angstroms (10^{-10} m), os primeiros átomos da ponta interagem com os átomos que compõe a superfície da amostra. Durante a varredura, a haste que sustenta a ponta, chamada de *cantilever*, sofre deflexões por causa da interação atômica, desviando o laser que incide sobre ela (figura 5). O laser é detectado por um fotodiodo que envia essas

informações de desvio da haste para o controle de realimentação que ajusta a posição da amostra (e/ou da ponteira) e para o computador onde é construída a topografia digitalizada da superfície da amostra (BINNIG; QUATE, 1986).

Figura 5 – Esquema de funcionamento do AFM.



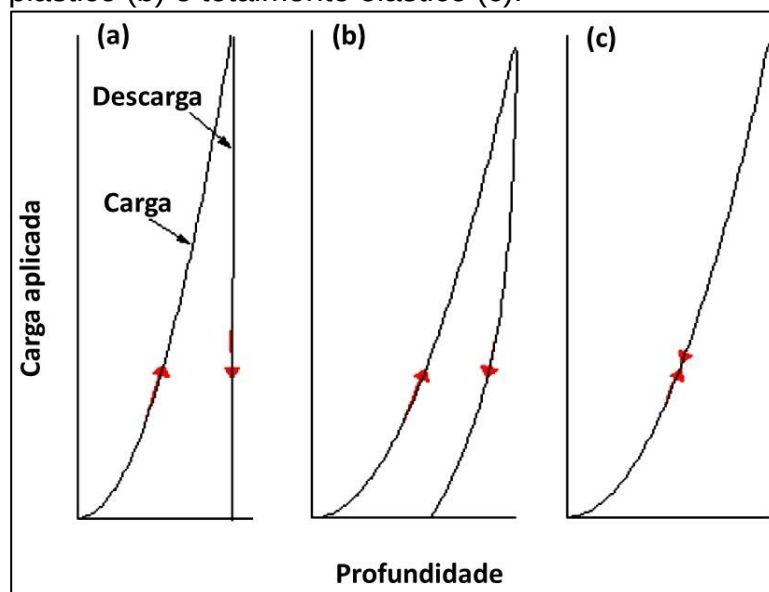
Fonte: do autor.

À vista disso, enfatiza-se que as técnicas de processamento de imagens aparecem como boas ferramentas de investigação para as imagens de microscopia, principalmente na análise da morfologia de estruturas (STERGIOPOULOS, 1999). Entretanto, até pouco tempo atrás, esse estudo encontrava-se limitado à análise de imagens fornecida pelos *softwares* que acompanhavam os equipamentos (SILVA, 2002). E isso, para a área de materiais, significa que muitas informações sobre a estrutura, topologia e morfologia dos sistemas investigados, e que estão contidas nas imagens de microscopia, passavam despercebidas e/ou eram pouco exploradas. Assim, neste trabalho foram utilizados programas mais robustos como o Gwyddion e o WSxM, que são softwares livres e amplamente utilizados na análise de imagens por AFM, além de dois programas em linguagem R produzidos pelo grupo de Ciências dos Materiais da Universidade Federal do Amapá.

1.6.3 Nanoindentação

O principal objetivo do teste de Nanoindentação é a determinação da Dureza H e do Módulo de Elasticidade E de filmes finos ou de camadas superficiais de sólidos, tais grandezas podem ser obtidas a partir da curva de carga-descarga fornecida pelo Nanoindentador, a qual é geralmente produzida em três etapas. Inicialmente a carga é aplicada com uma taxa pré-determinada até atingir um valor máximo. Feito isto, a força é mantida constante por um determinado intervalo de tempo, permitindo assim a acomodação do material. Em uma última etapa, a carga é controladamente retirada e o indentador removido da amostra. Durante todo o processo a profundidade de penetração da ponta é medida em função da carga aplicada. Exemplos típicos de curvas de profundidade versus carga são mostrados na Figura 6.

Figura 6 – Curvas de carga-descarga para materiais com comportamentos: totalmente plástico (a), elasto-plástico (b) e totalmente elástico (c).



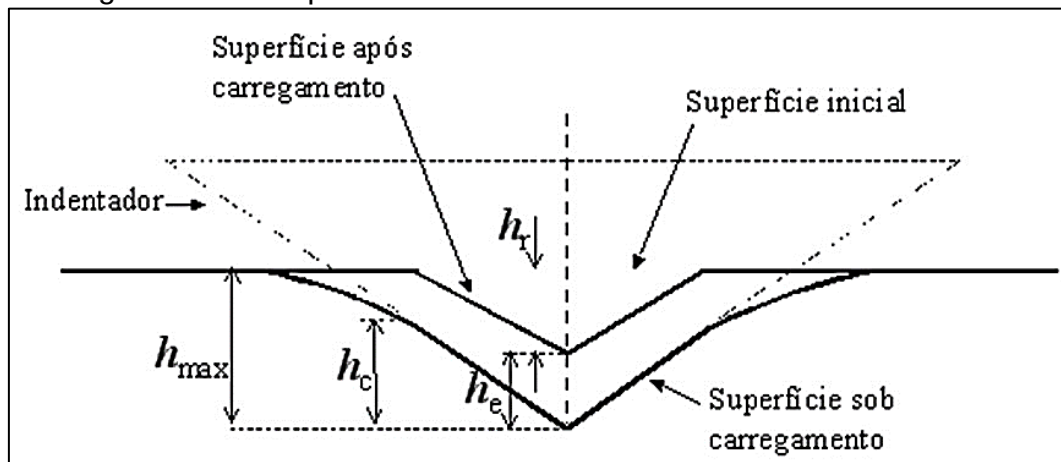
Fonte: do autor.

Quando a carga é removida do indentador, o material tende a retornar à sua forma original (Figura 6c), porém, muitas vezes ele é impedido devido a deformações plásticas sofridas durante o processo de carga (Figura 6a). Todavia, devido à relaxação das tensões elásticas no material, pode ocorrer um certo grau de recuperação (Figura 6b). A partir da

análise desta recuperação elástica, após a retirada da carga, é possível estimar o Módulo de Elasticidade da amostra.

De fato, uma vez conhecida a profundidade de contato h_c (também chamada de profundidade plástica) definida na Figura 7 e a geometria do indentador, pode-se determinar a área projetada A da indentação, definida como a área de indentação no instante que a carga (P) chega ao seu valor máximo.

Figura 7 – Ilustração da geometria da superfície da amostra nas situações de carga máxima e após a retirada do indentador.



Fonte: <http://www2.sorocaba.unesp.br/gpm/indentacao.htm>. (h_c , h_{max} e h_r são as profundidades de contato, da superfície original na situação de carga máxima e da impressão residual, respectivamente, e h_e é o deslocamento elástico durante a descarga).

Para um indentador ideal do tipo Berkovich a área projetada de contato se relaciona com a profundidade de contato através da equação 1.

$$A(h_c) = 24,5 \cdot h_c^2 \quad (1)$$

Desta forma, pode-se calcular a Dureza H do material através da equação 2. Entretanto, é preciso enfatizar que devido a imperfeições e ao desgaste do indentador, quando utilizado em amostras duras, a relação entre a profundidade de contato e a área projetada é melhor determinada através de análises de indentações feitas periodicamente em um material (normalmente quartzo) com H e E conhecidos.

$$H = \frac{P_{max}}{A(h_c)} \quad (2)$$

Por outro lado, para o cálculo da profundidade de contato usa-se o modelo descrito por Oliver e Pharr (1992) indicado na equação 3.

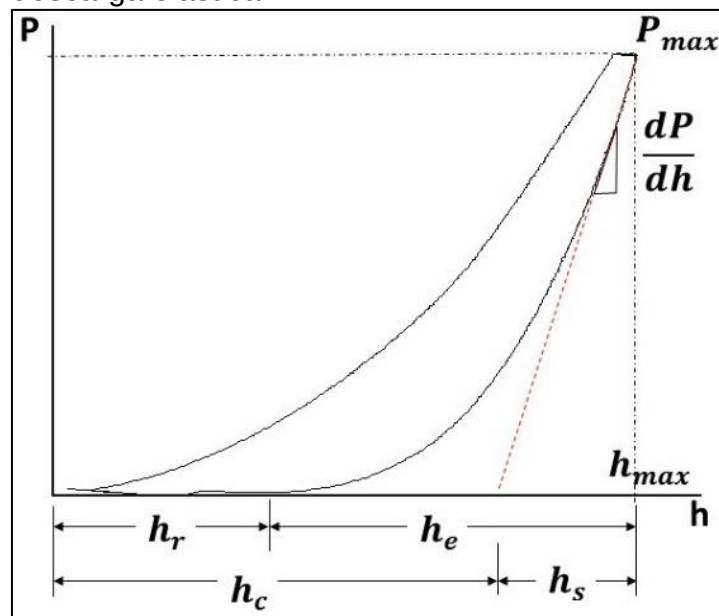
$$h_c = h_{max} - 0,75 \cdot \frac{P_{max}}{S} \quad (3)$$

onde a grandeza S, denominada Rigidez do material, é obtida a partir da inclinação da porção inicial da curva de descarga (Figura 8) através da equação 4.

$$S = \frac{dP}{dh} \quad (4)$$

Uma vez determinado o valor de h_c e substituindo-o na equação 1, é possível encontrar o valor numérico da Dureza do material através da equação 2.

Figura 8 – Curva carga versus deslocamento para um carregamento elasto-plástico seguido por descarga elástica.



Fonte: do autor.

Ainda segundo Oliver e Pharr (1992), levando-se em consideração o efeito de indentadores não perfeitamente rígidos, deve-se introduzir o chamado módulo elástico reduzido E_r , o qual depende das propriedades elásticas do indentador e da amostra a ser analisada, sendo definido pela equação 5.

$$\frac{1}{E_r} = \frac{1 - \nu_s^2}{E_s} + \frac{1 - \nu_i^2}{E_i} \quad (5)$$

Onde:

ν_s e E_s = Razão de Poisson e o Módulo de Elasticidade da superfície do material, respectivamente;

ν_i e E_i = Razão de Poisson e Módulo de Elasticidade do indentador, respectivamente.

A razão de Poisson é definida como a razão entre as deformações específicas transversal e longitudinal (CALLISTER; RETHWISCH, 2016). Assim, segundo García et al. (2013) para um indentador de diamante tem-se: $E_i = 1141$ GPa e $\nu_i = 0,07$. E para amostras poliméricas pode-se usar $\nu_s = 0,35$.

Por outro lado, segundo Oliver e Pharr (1992), o valor de E_r pode ser obtido a partir dos dados contidos na curva de carga-descarga de acordo com a equação 6.

$$E_r = \frac{S\sqrt{\pi}}{2\sqrt{A(h_c)}} \quad (6)$$

1.6.4 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier

A Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) é considerada uma das mais importantes técnicas experimentais para caracterização de polímeros, em termos de identificação e/ou determinação de características estruturais do material, principalmente no que se refere a grupos funcionais e de ligações químicas presentes na amostra (PAVIA et al., 2010).

Neste contexto, a técnica de FTIR fornece evidências da presença de grupos funcionais na estrutura de substâncias, tais evidências podem ser usadas para identificar um composto ou investigar sua composição química. Para realizar as medidas, a radiação no infravermelho passa através da amostra e é comparada com aquela transmitida na ausência de amostra.

O Espectrofotômetro registra o resultado na forma de bandas de absorção, uma vez que cada ligação química possui sua frequência de absorção específica, tais bandas são apresentadas através do gráfico intensidade versus frequência (ou número de onda) e podem ser convertidas em bandas de transmissão utilizando-se um *software* específico para tratamento de dados de espectroscopia. Com o espectro pronto, basta comparar o intervalo de frequência de cada banda com uma tabela de frequências específicas dos grupos funcionais, no intuito de identificar a composição química da amostra (PAVIA et al., 2010).

1.6.5 Difratometria de raio X

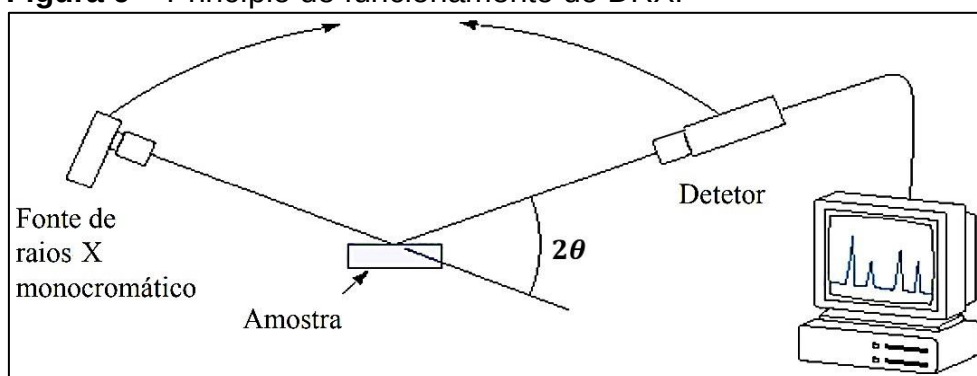
Estruturas cristalinas são determinadas pela análise do comportamento de ondas eletromagnéticas difratadas, porém, o espaçamento interatômico na maioria dos cristais é da ordem de poucos angstroms (10^{-10} m), sendo assim, em um experimento, para alcançar a máxima quantidade de informação, deve-se utilizar uma radiação com comprimento de onda desta mesma ordem de magnitude, por isso utiliza-se os raios X para analisar a cristalinidade dos materiais (TEIXEIRA, 2014). Neste sentido, a técnica de Difratometria de raio X foi utilizada para identificar, nos filmes obtidos, a fase cristalina da quitosana, uma vez que este polímero natural é considerado semicristalino (URAGAMI; TOKURA, 2006).

A cristalinidade está relacionada com a organização atômica do material, quanto mais organizada for a distribuição atômica da amostra mais cristalina ela será, o que experimentalmente pode ser verificado através dos picos de intensidade do difratograma gerado pelo Difrátômetro de Raio X (DRX). Por outro lado, a importância de se estudar a cristalinidade está no fato de que algumas propriedades de materiais estão diretamente relacionadas com a mesma, como por exemplo, a elasticidade e a dureza do material (MIRANDA et al., 2014).

O princípio de funcionamento do DRX (figura 9) é basicamente a emissão de raios X sobre a amostra (pó ou sólido), que sofrem difração entre os planos atômicos que

constituem o material e, em seguida, esses raios difratados sofrem interferência construtiva (se superpõem) ou destrutiva (se aniquilam). O resultado dessa interferência é detectado pelo aparelho e enviado ao computador, onde os difratogramas são produzidos. Quando há interferência construtiva tem-se um pico de intensidade e quando há interferência destrutiva não aparece nenhum pico. Quanto mais intenso forem os picos no difratograma mais cristalino é o material (MIRANDA et al., 2014; TEIXEIRA, 2014).

Figura 9 – Princípio de funcionamento do DRX.



Fonte: do autor.

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a influência do plastificante glicerol, incorporado à filmes de quitosana, sobre a molhabilidade e a flexibilidade.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Produzir filmes a base de quitosana e carregados com glicerol;
- b) Caracterizar morfologicamente os filmes obtidos através de Microscopia Eletrônica de varredura e Microscopia de Força Atômica;
- c) Determinar o ângulo de contato da superfície dos filmes com o intuito de avaliar a molhabilidade destes;
- d) Determinar a Dureza e o Módulo de Elasticidade das amostras através de nanoindentações.

3.1 TIPO DE PESQUISA E LOCAL DE ESTUDO

De modo geral, o trabalho descrito nestas laudas, envolve análises qualitativas e quantitativas a partir de um raciocínio indutivo. Assim, após incorporar o glicerol na solução filmogênica, foi avaliada através de pesquisa tipo teórico-experimental a influência da concentração deste sobre a molhabilidade e a flexibilidade do filme de quitosana.

Neste contexto, o estudo foi desenvolvido em cinco locais: a preparação das amostras e os testes de sorção e solubilidade em água foram realizados no Laboratório de Controle de Qualidade, Bromatologia e Microbiologia (LCBM) da Universidade Federal do Amapá (UNIFAP); as imagens por Microscopia de Força Atômica (AFM), medidas de ângulo de contato e os testes de nanoindentação instrumentada foram realizados no Laboratório Van De Graaff (LVDG) da Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro (PUC-RJ); as medidas de rugosidade, entropia, espessura, diâmetro de poros e Percentual Poroso Superficial foram realizadas no Laboratório de Ciências dos Materiais (LabMat) da UNIFAP; as imagens por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e os espectros por Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) foram obtidos no Laboratório de Pesquisa em Fármacos (LPFar) da UNIFAP; e os difratogramas por Difractometria de Raio X (DRX) foram obtidos no Laboratório de Análise Instrumental (LAI) da Universidade do Estado do Amapá (UEAP).

3.2 MATERIAIS

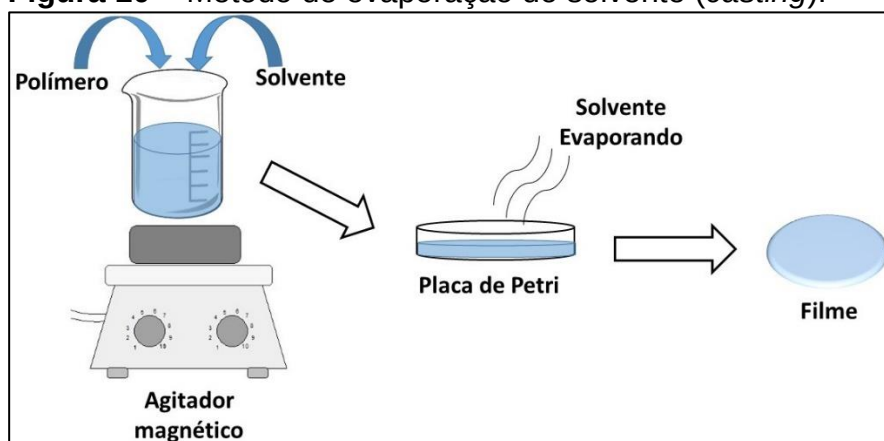
Para a obtenção dos filmes de quitosana foram utilizados os seguintes reagentes: Quitosana – baixo peso molecular (Sigma-Aldrich®, Brasil), com grau de desacetilação de 95% e massa molecular de 190.000 g/mol, Glicerol (Alphatec Química Fina®, Brasil), com massa molecular de 92,1 g/mol, e Ácido Acético Glacial (Cromaline Química Fina Ltda®,

Brasil). Todos os outros reagentes utilizados foram de grau analítico e utilizados como recebidos.

3.3 PREPARAÇÃO DOS FILMES DE QUITOSANA

Os filmes de quitosana foram obtidos através do método de evaporação do solvente (*casting*) (Figura 10). Foram preparadas soluções de quitosana na concentração 2% (p/v), a partir da dissolução do polímero em solução aquosa de ácido acético a 3% (v/v), mantidas sob agitação magnética à temperatura ambiente (25 ± 2 °C) por 1 hora. Em seguida, foram transferidas alíquotas de 40 ml desta solução para placas de petri com 9 cm de diâmetro, mantendo-as a temperatura ambiente durante 5 dias, até a completa secagem e evaporação do solvente. Posteriormente, para destacar os filmes obtidos, foram utilizados espátula e solução de hidróxido de sódio a 2N, tal solução foi utilizada no intuito de neutralizar o ácido remanescente na superfície dos filmes. Em seguida, as amostras foram lavadas com água destilada e novamente mantidas a temperatura ambiente por mais 5 dias para secagem final, desta vez cobertas com papel absorvente. Todas as concentrações foram escolhidas a partir de testes preliminares realizados no LCBM da UNIFAP.

Figura 10 – Método de evaporação do solvente (*casting*).



Fonte: do autor.

Para os filmes contendo glicerol foi utilizada a mesma metodologia, adicionando o plastificante juntamente com o polímero na solução aquosa de ácido acético para posterior

agitação. Neste contexto, as diferentes composições obtidas para o filme de quitosana estão expostas no quadro 1 (todas as amostras foram feitas em triplicata).

Quadro 1 – Composições dos filmes de quitosana.

Amostra	Quitosana (p/p %)	Glicerol (p/p %)
CH	100	0
CHG1	96,875	3,125
CHG2	93,75	6,25
CHG3	75	25

3.4 CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES

3.4.1 Avaliação qualitativa

A avaliação qualitativa foi feita através de observações visuais levando-se em consideração a cor e a homogeneidade dos filmes obtidos. Tal avaliação foi importante para verificar a qualidade dos filmes e, conseqüentemente, perceber se seria viável dar continuidade aos testes com tais amostras ou se haveria a necessidade de aperfeiçoar a composição.

3.4.2 Espessura

A espessura dos filmes foi obtida com o auxílio de um paquímetro digital (ZAAS Precision, Brasil) através de seis medições em posições aleatórias ao longo da extensão do filme.

3.4.3 Teste de sorção e solubilidade

Para determinar a capacidade de sorção e a solubilidade em água dos filmes, cinco quadrados (1 cm² de área) foram cortados de cada filme produzido e mantidos em estufa a 40 °C durante 48 h, com o intuito de retirar a água remanescente do processo de preparação. Depois de pesados, os pedaços foram distribuídos em frascos contendo 15 ml de água destilada e mantidos nestas condições durante 4 dias. Após este período, os pedaços foram recolhidos, sendo retirado o excesso de água com papel absorvente, e novamente pesados para se determinar a capacidade de sorção de água de cada amostra de filme, conforme a equação 7.

$$Sorção (\%) = \left(\frac{m_{úmida} - m_i}{m_i} \right) \cdot 100 \quad (7)$$

Onde:

$m_{úmida}$ = massa do filme úmido (em gramas);

m_i = massa inicial do filme seco após a primeira pesagem (em gramas).

Logo após a segunda pesagem, os pedaços foram colocados novamente em estufa a 70 °C até atingir peso constante. Após este período, foram novamente pesados para se determinar a quantidade de material que ficou na solução e assim obter a solubilidade através da equação 8.

$$Solubilidade (\%) = \left(\frac{m_i - m_f}{m_i} \right) \cdot 100 \quad (8)$$

Onde:

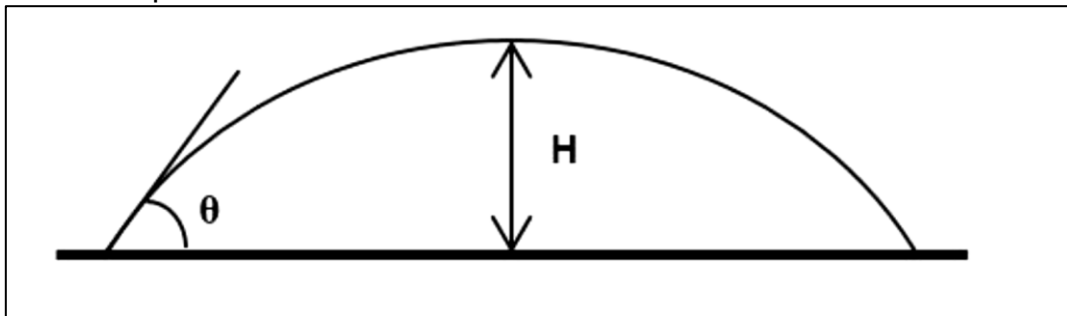
m_f = massa final do filme após a última pesagem (em gramas);

m_i = massa inicial do filme seco após a primeira pesagem (em gramas).

3.4.4 Medidas de ângulo de contato e velocidade de captação de água

Para medir o ângulo de contato (figura 11) entre uma gota de água deionizada e a superfície dos filmes, assim como avaliar a velocidade de captação de água das amostras, foi utilizado um Goniômetro modelo 590 F3 Series (Ramé-Hart Instrument Co). O estudo foi desenvolvido sob condições ambiente com umidade relativa do ar de aproximadamente 45% e temperatura em torno de 23 ± 2 °C.

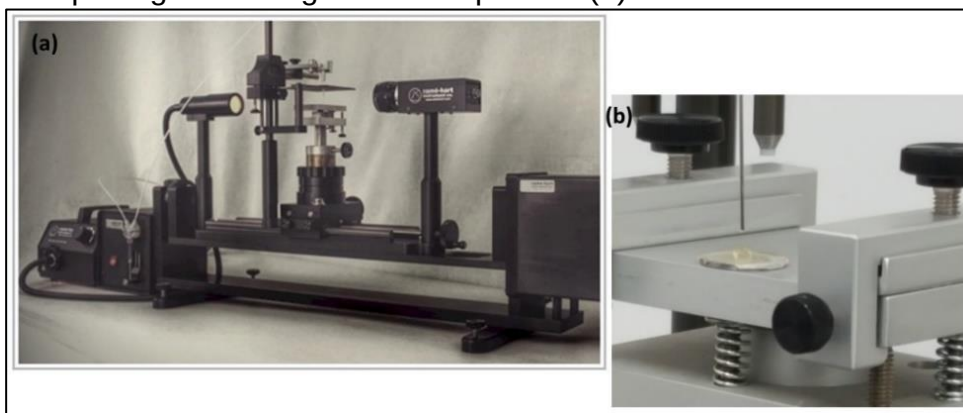
Figura 11 – Ilustração do ângulo de contato (θ) e altura H da gota de água sobre a superfície do filme.



Fonte: do autor.

Neste contexto, com a ajuda de fita dupla face, foi colocado no porta-amstras um pedaço do filme em forma de quadrado com 2 cm² de área. Logo em seguida, uma gota de 8 µl de água deionizada foi depositada na superfície da amostra através de uma microseringa embutida no próprio equipamento. As medidas de ângulo de contato foram realizadas logo após o contato da gota com a superfície através de 100 fotos registradas pela câmera do aparelho (num intervalo de 0,0001 segundo por foto). Ao mesmo tempo que as fotos eram obtidas, o *software* do equipamento realizava as medidas de ângulo de contato (média lateral) e altura da gota. Em um momento posterior, para avaliar a velocidade de captação de água, programou-se o aparelho para realizar medidas em intervalos de 10 segundos. A figura 12 mostra uma imagem do Goniômetro utilizado no estudo, assim como uma imagem da gota em contato com a amostra.

Figura 12 – Goniômetro da empresa Ramé-Hart Instrument Co: visão geral do aparelho (a) e imagem do porta-amstras no momento em que a gota interage com a superfície (b).



Fonte: (a) <http://www.ramehart.com/590.htm> e (b) do autor.

3.4.5 Estudo da morfologia e análise topográfica

O aspecto morfológico dos filmes obtidos foi observado através de um Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) modelo Tabletop Microscope TM3030 plus (Hitachi) em modo *Standard*. A figura 13 mostra uma imagem do equipamento utilizado.

Figura 13 – MEV da empresa Hitachi.

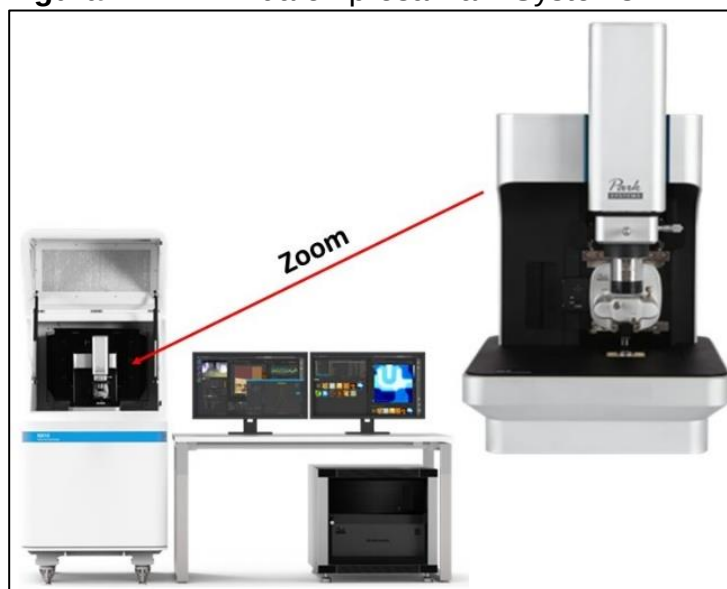


Fonte: do autor.

Para cada sequência de imagens foi fixado ao porta-amostras do aparelho, com a ajuda de fita dupla face, um pedaço do filme em forma de quadrado com 1 cm² de área. Assim, foram produzidas imagens com as seguintes ampliações: 50x, 180x, 400x e 600x.

Por outro lado, para a análise topográfica foi utilizado um Microscópio de Força Atômica (AFM) modelo Park NX-10 (Park Systems) em modo *Tapping*, o qual pode ser visualizado na figura 14.

Figura 14 – AFM da empresa Park Systems.



Fonte: <http://www.parkafm.com/index.php/products/small-sample-afm/park-nx10/overview>.

A ponta usada na varredura era de silício monocristalino e de formato cônico com ângulo de abertura de 10° e raio do ápice de aproximadamente 6 nm. O *cantilever* utilizado

era retangular e de silício monocristalino, com constante elástica aproximadamente igual a $5,1 \text{ N.m}^{-1}$ e frequência de ressonância em torno de 150 kHz. O estudo foi realizado em condições ambiente com umidade relativa do ar de aproximadamente 45% e temperatura em torno de $23 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

Neste contexto, para cada sequência de imagens (6 imagens em cada filme, em regiões aleatórias de área $2,5 \text{ }\mu\text{m}^2$), foi fixado ao porta-amostras do aparelho, com a ajuda de fita dupla face, um pedaço do filme em forma de quadrado com 1 cm^2 de área. A varredura foi programada para o modo *Tapping* com amplitude de 30,39 nm e *setpoint* oscilando ao redor de 21,05 nm, com tempo de varredura por linha igual a 2 segundos, o que corresponde a 256 pixels por linha num total de 256 linhas, fornecendo assim um conjunto de dados com 65536 pixels (cada pixel representa um valor de altura registrado).

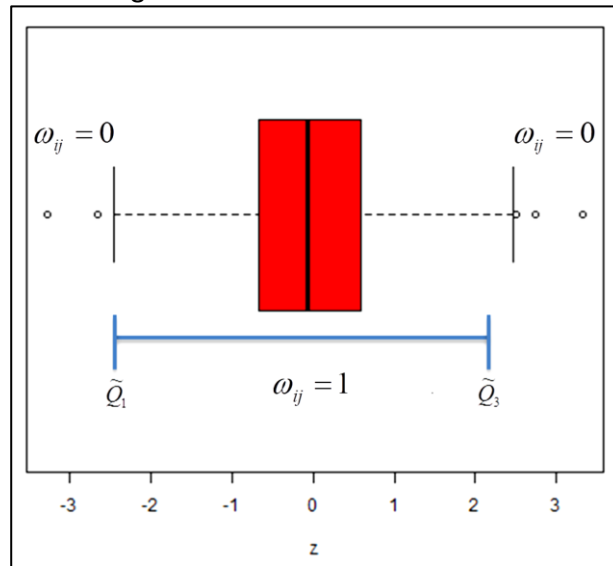
Após a produção das imagens topográficas pelo AFM, estas foram levadas ao *software* livre Gwyddion, onde verificou-se a presença de nanoporos sobre a superfície dos filmes e 100 medidas do diâmetro de tais nanoporos foram realizadas a partir de 10 perfis obtidos em regiões aleatórias da imagem, tal como na metodologia descrita por Assis e Silva (2003). Em seguida, as imagens de AFM foram tratadas através do *software* livre WSxM e cálculos estatísticos foram feitos sobre a distribuição de alturas de cada superfície analisada.

As matrizes de alturas foram levadas à dois programas em linguagem R para o cálculo da Rugosidade RMS (desvio padrão das alturas), da Entropia Topográfica e do Percentual Poroso Superficial. O primeiro programa foi criado por Pires (2014) e, posteriormente, utilizado por Matos et al. (2017). Tal algoritmo fornece os valores de rugosidade RMS e Entropia Topográfica. O segundo algoritmo foi criado exclusivamente para o trabalho descrito nestas laudas e fornece valores para o Percentual Poroso Superficial.

3.4.5.1 Algoritmo da Entropia Topográfica

Pires (2014) introduziu a ideia de entropia topográfica utilizando como base a Entropia de Shannon (SALINAS, 2005), tal entropia topográfica fornece uma ideia de como a rugosidade superficial está distribuída sobre a amostra. Neste contexto, ao extrair a matriz de alturas da imagem de AFM é possível calcular, a partir do método do histograma, a mediana das alturas e seus respectivos quartis. Em seguida, divide-se as alturas em dois grupos: o grupo de alturas que contribuem para a uniformidade topográfica e o grupo que não contribui. À vista disso, com base no primeiro quartil Q_1 e no terceiro quartil Q_3 , estima-se as quantidades $\overline{Q}_1 = Q_1 - 1,5|Q_3 - Q_1|$ e $\overline{Q}_3 = Q_3 + 1,5|Q_3 - Q_1|$ que representam as extremidades do *boxplot* conforme mostrado na figura 15.

Figura 15 – *Boxplot* da matriz de alturas de uma imagem de AFM.



Fonte: Pires (2014).

Assume-se que a contribuição para a uniformidade provem do conjunto de pixels que satisfazem $h_{ij} \in [\overline{Q}_1, \overline{Q}_3]$, por outro lado os pixels tais que $h_{ij} \notin [\overline{Q}_1, \overline{Q}_3]$ possuem contribuição nula para a uniformidade. Assim, denota-se η como a quantidade de pixels que não contribuem para a uniformidade da rugosidade. Quanto menor η , mais uniforme é a distribuição de rugosidade sobre toda a superfície e quando $\eta = 0$ tem-se uma superfície uniforme. A partir dessas considerações, conclui-se que:

$$W_{ij} = \begin{cases} 1, & \text{se } h_{ij} \in [\overline{Q_1}, \overline{Q_3}] \\ 0, & \text{se } h_{ij} \notin [\overline{Q_1}, \overline{Q_3}] \end{cases} \quad (9)$$

Dessa forma, a contribuição de cada pixel para a uniformidade da rugosidade superficial é estimada através da equação 10.

$$p_{ij} = \frac{w_{ij}}{\sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N w_{ij}} \quad (10)$$

onde p_{ij} é a probabilidade de encontrar entre os dados uma altura w_{ij} que contribua para a uniformidade da rugosidade superficial.

Ainda segundo Pires (2014), após definir p_{ij} basta utilizar a entropia de Shannon (equação 11) para estimar a Entropia Topográfica.

$$H = - \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N p_{ij} \log p_{ij} \quad (11)$$

O valor normalizado e centralizado da entropia de Shannon, o qual foi definido como entropia da matriz de alturas $H_{mat.alt.}$, é dado pela equação 12.

$$H_{matr.alt.} = \frac{H - H_{min}}{H_{max} - H_{min}} \quad (12)$$

Para qualquer valor H de entropia sempre se tem $H_{min} \leq H \leq H_{max}$, por isso Pires (2014) define estatisticamente a entropia topográfica como na equação 12. Para calcular H_{min} e H_{max} deve-se explicitar a dependência de η na equação 11, para isso utiliza-se a equação 13.

$$\sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N w_{ij} = N^2 - \eta \quad (13)$$

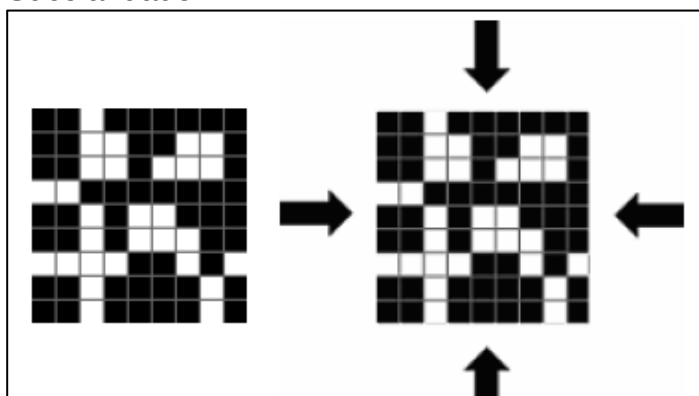
onde N é o número de pixels em uma imagem N×N pixels. Assim, pode-se perceber que a entropia máxima e a entropia mínima dependem unicamente da quantidade de elementos da matriz de alturas.

3.4.5.2 Algoritmo do Percentual Poroso Superficial

O Percentual Poroso Superficial proporciona uma análise quantitativa a respeito da disponibilidade de poros ao ambiente externo, uma vez que este identifica os pontos de acesso a água sobre a superfície das amostras. Tal percentual se baseia na Sucularidade Fractal (σ) descrita por Mandelbrot (1983) e utilizada por Melo e Conci (2008) no estudo da percolação de água no solo.

Deveras, Melo e Conci (2008) mostraram que através de uma imagem binária e quadrada de lado n pixels (figura 16), na qual existem pontos acessíveis (caixas pretas) e pontos inacessíveis (caixas brancas) à água, é possível calcular a sucularidade em quatro passos:

Figura 16 – Imagem binária para o cálculo da Sucularidade.



Fonte: Melo e Conci (2008).

1º Passo – A partir do topo da imagem binária (figura 16), considerando toda borda superior, se o pixel for acessível significa que a água pode passar e inundar a área, se o pixel for inacessível, este é considerado um obstáculo para a água e toda área da imagem é inundada a partir de sua vizinhança.

2º Passo – O passo seguinte é dividir as áreas de inundação em caixas de tamanhos iguais $T(n)$, onde n é a quantidade de divisões possíveis de uma imagem em caixas, algo similar ao método *box-counting* (MANDELBROT, 1983; SALCEDO, 2016). Em seguida, o percentual de ocupação P_o é calculado para cada caixa.

3º Passo – Para cada caixa de tamanho k , multiplica-se $P_o(T(k))$, onde k varia de 1 a n , pela pressão $PR(T(k), p_c)$, onde p_c é a posição (x, y) do centroide de pressão aplicada na caixa calculada.

4º Passo – Para encontrar um valor adimensional para a Succolaridade, divide-se o valor obtido no passo 3, por PR , mas agora considerando que a imagem foi totalmente inundada pelo fluido (como se a imagem de entrada fosse totalmente preta). O cálculo é apresentado na equação 14.

$$\sigma(T(k), dir) = \frac{\sum_{k=1}^n P_o(T(k)) \cdot PR(T(k), p_c)}{\sum_{k=1}^n PR(T(k), p_c)} \quad (14)$$

onde dir é a direção de entrada da água.

Por outro lado, para o Percentual Poroso Superficial (S) precisa-se apenas da quantidade de pixels acessíveis à água existente na superfície da imagem, o que possibilita fazer a pressão PR constante para todas as caixas. Assim, escolhendo caixas com 1 pixel de lado e fazendo a pressão PR como uma constante na equação 14, a expressão resultante será exatamente o percentual de ocupação P_o da água referente a toda superfície varrida pelo AFM, que multiplicado por 100 (como na equação 15) fornece o Percentual Poroso Superficial da amostra.

$$S(\%) = \frac{\sum_{i=1}^N n_i}{N \cdot N} \cdot 100 \quad (15)$$

Onde:

n_i = número de pixels acessíveis à água por linha varrida;

N = número de pixels por linha varrida, o AFM varre quadrados de área $N \times N$ pixels.

À vista disso, o algoritmo escrito em linguagem R, com base na matriz de alturas extraída da imagem de AFM, primeiro encontra a média das alturas e a define como um valor de corte, chamando as alturas acima ou iguais a média de 1 e as alturas abaixo da média de zero. Dessa forma, tem-se uma imagem binária de pontos 1 e 0, com pixels

acessíveis à água chamados de zero e pixels inacessíveis pela água chamados de 1. Após obter a matriz binária é possível contar a quantidade n_i de números de pixels acessíveis a água por linha varrida, o que possibilita o uso da equação 15 para o cálculo do Percentual Poroso Superficial.

A proposta descrita acima, surgiu devido a necessidade de descrever a disponibilidade de poros ao ambiente externo, uma vez que tal característica possivelmente influencia o caráter hidrofílico e, sobretudo, a sorção inerente das amostras.

3.4.6 Nanoindentação instrumentada

Os testes de Nanoindentação Instrumentada foram realizados utilizando-se um Nanoindentador modelo TI 700 Ubi-1 (Hysitron Incorporated), com penetrador tipo Berkovich (uma pirâmide de três lados com cada lado formando um ângulo de aproximadamente $65,3^\circ$ com o plano normal à base da pirâmide) feito de diamante com Módulo de Elasticidade igual a 1141 GPa, razão de Poisson igual a 0,07 e raio do ápice entre 50-100 nm. A figura 17 mostra uma imagem do aparelho Nanoindentador utilizado.

Figura 17 – Nanoindentador da empresa Hysitron Incorporated.



Fonte: <https://www.hysitron.com/resources-support/education-training/nanoindenter>.

O aparelho foi programado para o modo de nanoindentação quase-estática, tendo como limite de carga o intervalo de 100-1000 μN . Durante cada indentação foram registradas 1024 medidas de profundidade com uma precisão de 0,011836 segundos por medida, totalizando um intervalo de 12,120064 segundos por indentação.

Neste contexto, para cada teste foi fixado ao porta-amostras, com a ajuda de fita dupla face, um pedaço do filme na forma de um quadrado (1 cm² de área), e em seguida foram realizadas 12 indentações em cada amostra.

3.4.7 Obtenção dos espectros por Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros da quitosana em pó, do glicerol e dos filmes foram obtidos em um Espectrofotômetro FTIR-ATR Shimadzu modelo IRAffinity-1, operando no intervalo de 400-4000 cm⁻¹, com resolução de 4 cm⁻¹ e 12 varreduras acumuladas. A figura 18 mostra uma imagem do Espectrofotômetro utilizado.

Figura 18 – Espectrofotômetro da empresa Shimadzu.



Fonte: do autor.

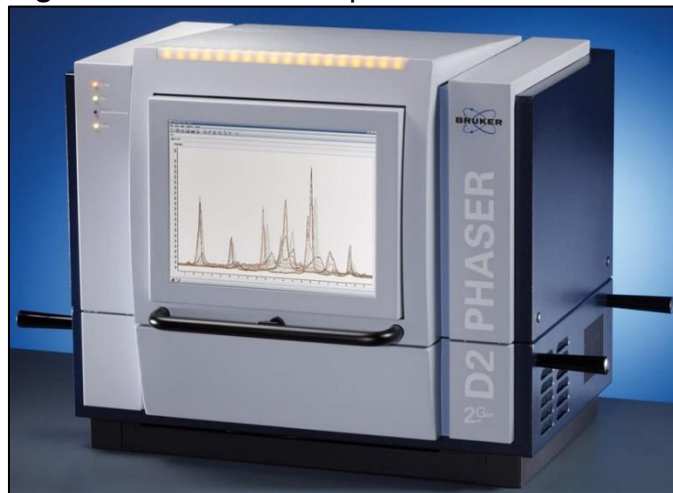
A amostra de quitosana em pó foi misturada com brometo de potássio (substância transparente ao infravermelho) e impressada para assumir a forma de pastilha. Para o espectro do glicerol, uma gota do plastificante foi depositada entre duas placas de cloreto de sódio (material transparente ao infravermelho) e o conjunto, posteriormente, fixado ao porta-amostras do espectrofotômetro. Por outro lado, para a obtenção dos espectros dos filmes de quitosana, estes foram diretamente fixados ao porta-amostras com a ajuda de fita dupla face posicionada fora da região de alcance da radiação.

3.4.8 Obtenção dos difratogramas por Difractometria de Raio X (DRX)

Os difratogramas (gráficos de intensidade versus ângulo de difração) foram obtidos através de um Difractômetro de Raio X modelo D2 Phaser (Bruker) (figura 19) operando em

modo *Continuous PSD Fast*, com radiação $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda = 1,5406 \text{ \AA}$) gerada por corrente elétrica de 10 mA e voltagem de 30 kV. A velocidade de varredura utilizada foi de 3° por minuto em uma faixa de varredura de $5\text{-}50^\circ$. Para cada varredura foi colocado no porta-amostras do aparelho um pedaço do filme na forma de um quadrado (3 cm^2 de área).

Figura 19 – DRX da empresa Bruker.



Fonte: <http://www.d2phaser.com/ja/>.

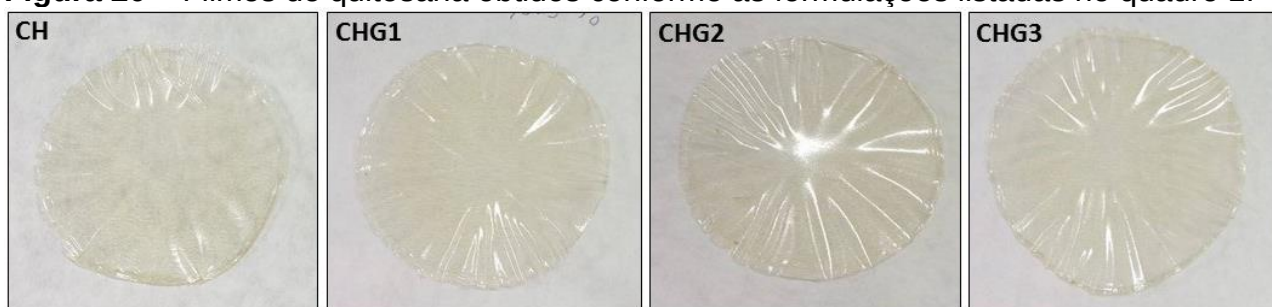
3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos foram expressos através de médias e desvio padrão (DP), organizados, de acordo com a pertinência, em tabelas, gráficos e figuras. As diferenças significativas entre os resultados foram submetidas à análise de variância (ANOVA) ($p < 0,05$), seguido por Teste de Tukey (MARTINS; DOMINGUES, 2011) (através do *software* Statistica da Statsoft South America-Brasil®).

4.1 AVALIAÇÃO QUALITATIVA

A avaliação qualitativa foi feita através da apreciação visual dos filmes obtidos, levando-se em consideração a cor e a homogeneidade dos mesmos. Sendo assim, observou-se que todos os filmes apresentaram um aspecto transparente e homogêneo, como pode ser verificada na figura 20.

Figura 20 – Filmes de quitosana obtidos conforme as formulações listadas no quadro 1.



Fonte: do autor.

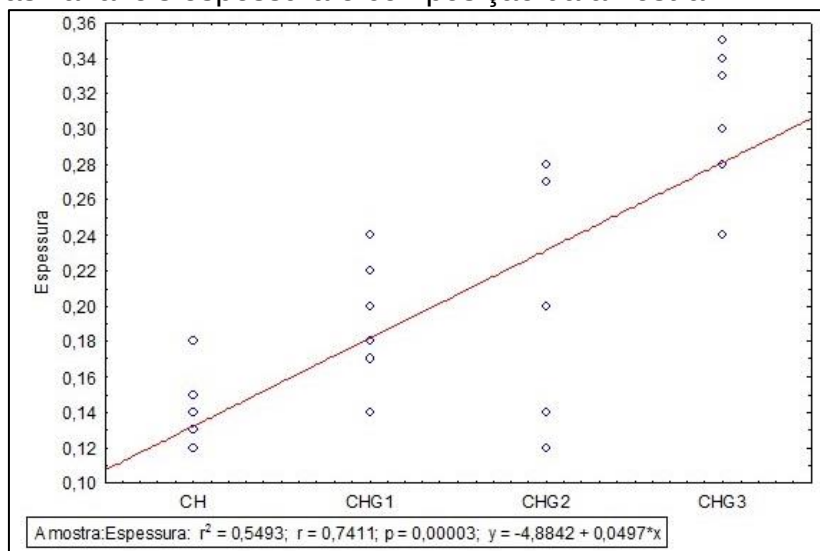
O filme CHG2 apresentou coloração levemente mais escura quando comparado às outras amostras, provavelmente um efeito da temperatura durante a agitação magnética da solução filmogênica, uma vez que tal amostra exigiu maior tempo de agitação, o que pode ter causado alguma variação na temperatura do sistema. Por outro lado, todos os filmes apresentaram dobras após a secagem final, possivelmente devido a contração do material originada pela baixa concentração de soluto e pela quantidade de água evaporada, a qual ficou retida na matriz polimérica após o processo de preparação.

4.2 ESPESSURA

Com relação a espessura dos filmes, o crescimento desta ocorre proporcionalmente com o aumento da concentração de glicerol, fato confirmado através de um teste de

correlação, o qual mostrou que as variáveis composição da amostra e espessura possuem média correlação linear positiva ($r = 0,74$), como mostra o gráfico da figura 21.

Figura 21 – Teste de correlação e regressão linear entre as variáveis espessura e composição da amostra.



Fonte: do autor.

Este comportamento confirma a incorporação do glicerol à estrutura do filme de quitosana, uma vez que este plastificante se posiciona entre as cadeias poliméricas do biomaterial, enfraquecendo as ligações de hidrogênio e aumentando o volume livre do sistema. Por outro lado, apenas a espessura do filme CHG3 apresentou diferença significativa em relação a espessura da amostra padrão (CH), alcançando um aumento que corresponde a aproximadamente 121% da espessura do filme CH, como pode ser observado na tabela 1.

Tabela 1 – Valores de espessura dos filmes secos (média $\pm$ DP, $n = 6$).

Amostra	Espessura (mm)
CH	$0,14 \pm 0,02^a$
CHG1	$0,19 \pm 0,04^a$
CHG2	$0,18 \pm 0,07^a$
CHG3	$0,31 \pm 0,04^b$

Mesma letra na mesma linha indica que não há diferença significativa entre as médias (ANOVA e Teste de Tukey, $p < 0,05$).

Segundo Silva (2015), para aplicações biomédicas, é interessante obter um filme com a menor espessura possível, entretanto, a influência deste parâmetro sobre as propriedades funcionais de filmes finos ainda é pouco explorada. Por outro lado, segundo Pires e Moraes (2012), substitutos de pele são geralmente mais finos do que a derme humana, cuja espessura varia de 0,5 mm a 2 mm, dependendo da idade, gênero e área do corpo. A partir deste aspecto, é possível dizer que os filmes preparados neste trabalho possuem potencial para serem utilizados, por exemplo, como curativos cutâneos.

4.3 SORÇÃO E SOLUBILIDADE

Os testes de sorção e solubilidade foram realizados utilizando como líquido padrão a água destilada, uma vez que a aplicação dos filmes obtidos na forma de biomaterial envolve o contato com meios aquosos e/ou fluidos biológicos. Assim, o estudo relativo a capacidade de sorção e solubilidade em água mostra como essas propriedades podem ser influenciadas pela adição de glicerol ao filme. A tabela 2 apresenta os valores de sorção e solubilidade obtidos para cada amostra.

Tabela 2 – Capacidade de sorção de água e solubilidade dos filmes de quitosana obtidos (média $\pm$ DP, n = 5).

Amostra	Sorção (%)	Solubilidade (%)
CH	126,2 $\pm$ 10,5 ^a	1,1 $\pm$ 0,3 ^a
CHG1	138,6 $\pm$ 9,4 ^{a,b}	3,2 $\pm$ 0,7 ^b
CHG2	140,8 $\pm$ 6,4 ^{a,b}	4,8 $\pm$ 0,7 ^c
CHG3	144,7 $\pm$ 8,2 ^b	3,5 $\pm$ 0,8 ^b

Mesma letra na mesma linha indica que não há diferença significativa entre as médias (ANOVA e Teste de Tukey, p<0,05).

Todas as amostras apresentaram grande capacidade de sorção de água, conseguindo reter uma quantidade de aproximadamente 1,5 vezes a sua própria massa. Esse comportamento está de acordo com os valores de sorção para filmes de quitosana encontrados na literatura. Assis e Silva (2003), por exemplo, relataram valores próximos a 90%, enquanto que Cordeiro (2010) obteve valores em torno de 150%. Deve-se ressaltar também que a quitosana pertence ao grupo dos polímeros caracterizados como hidrogéis, que possuem como característica marcante, a capacidade de absorver desde dezenas até

centenas de vezes sua massa seca em água, estando suas cadeias unidas por interações moleculares e/ou forças secundárias incluindo as forças iônicas, ligações de hidrogênio ou forças hidrofóbicas (KURITA, 2001).

Por outro lado, apenas a capacidade de sorção do filme CHG3 apresentou diferença significativa em relação a amostra padrão (CH), isto ocorreu, provavelmente, devido ao aumento do número de hidroxilas presentes no sistema, fato que pode proporcionar maior capacidade de sorção de água em contato prolongado, supondo-se que, uma vez que a água penetre a estrutura do filme, as ramificações do mesmo atuam de modo a manter a maior quantidade possível de moléculas de água aprisionadas na matriz polimérica.

Outra característica observada nos filmes de quitosana, e que deve ser destacada, é a rápida dilatação volumétrica que ocorre nestes quando em contato com a água, o que torna os filmes mais aderentes e flexíveis em ambiente úmido. Tal dilatação, possivelmente ocorre devido o enfraquecimento das ligações intermoleculares ocasionado pelas moléculas de água, que se posicionam entre as cadeias poliméricas do biomaterial. Quando a água começa a evaporar ocorre o efeito contrário, sem a presença das moléculas de água a interação entre as cadeias poliméricas aumenta, fazendo com que os filmes sofram certa contração e fiquem mais rígidos. Tal efeito provavelmente ajudaria, por exemplo, na cicatrização de uma ferida tratada com esse biomaterial na forma de curativo, uma vez que o mesmo iria absorver os fluidos da lesão e evaporá-los para o ambiente, ao mesmo tempo que ajudaria na contração do ferimento.

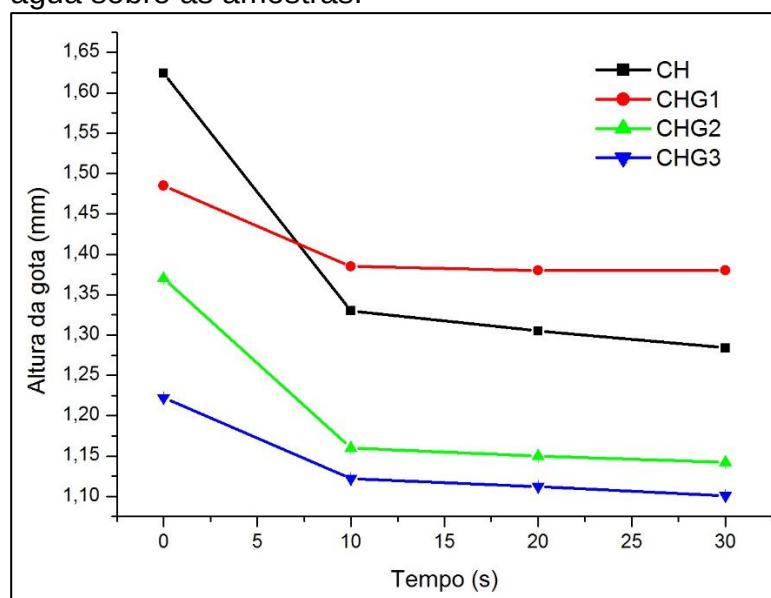
Com relação a solubilidade em água, apesar de todos os filmes apresentarem baixo percentual, foi possível observar que a adição de glicerol ao biomaterial incrementou esta propriedade. De fato, os filmes CHG1 e CHG3 apresentaram um aumento na solubilidade de aproximadamente 200% em relação ao filme CH (amostra padrão), enquanto que o filme CHG2 apresentou um acréscimo de 336%. Com a presença de uma molécula polar como o glicerol na composição do biomaterial, era justo que a interação deste com a água

aumentasse. Garcia, Pinotti e Zaritzkya (2006), por exemplo, relataram que a adição de glicerol em filmes de quitosana/amido aumentou em cerca de 56% o valor de solubilidade dos filmes.

4.4 ÂNGULO DE CONTATO E VELOCIDADE DE CAPTAÇÃO DE ÁGUA

Existe certa dificuldade em medir o ângulo de contato de filmes de quitosana no exato momento em que a gota toca a superfície do filme, isto se deve a rápida absorção de água que esses filmes sofrem (FERNANDES, 2009). Assim, para verificar a velocidade de captação de água das amostras, foi realizado um estudo da evolução temporal da gota através de medições da altura desta, em intervalos de 10 segundos (figura 22). Este comportamento está relacionado com a porosidade e a densidade da superfície.

Figura 22 – Evolução temporal da altura da gota de água sobre as amostras.



Fonte: do autor.

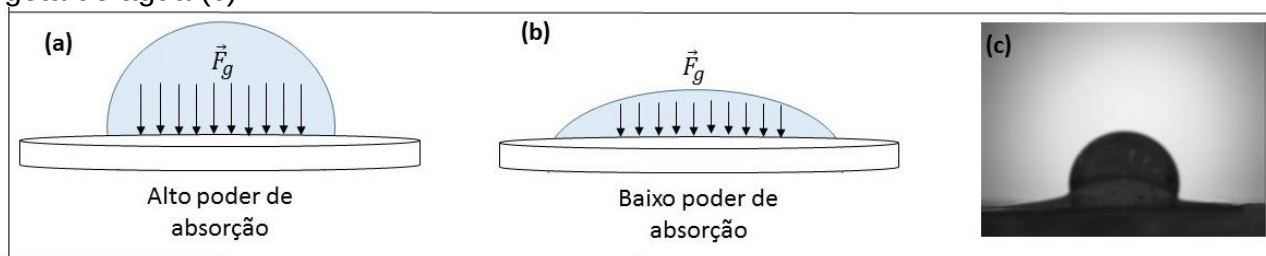
É possível perceber que o decaimento da altura da gota possui um comportamento aproximadamente exponencial nos primeiros 30 segundos de contato gota-superfície, alcançando uma certa estabilidade após 10 segundos, momento em que os poros estariam parcialmente preenchidos, por isso ocorre uma certa acomodação no processo de absorção. Além disso, é aceitável presumir que todos os filmes apresentam alta velocidade

de captação de água, uma vez que a variação da altura da gota nos primeiros 10 segundos é bem evidente em todas as curvas.

O filme CH (amostra padrão), ao que tudo indica, apresenta a maior velocidade de captação de água, uma vez que o decaimento da altura da gota sobre este, nos primeiros 10 segundos, é mais acentuado do que nas outras amostras, indicando que o filme CH possui maior porosidade em relação aos outros.

Por outro lado, ainda analisando o comportamento das curvas da figura 22, é possível perceber que a adição de glicerol ao filme diminuiu a velocidade de captação de água, o que intensifica o espalhamento do líquido sobre a superfície através de um efeito físico, o qual está ilustrado na figura 23. Provavelmente, a adição de glicerol aos filmes de quitosana fez com que estes se tornassem mais densos, e consequentemente menos porosos do que a amostra padrão (filme CH).

Figura 23 – Efeito físico sobre as medidas de ângulo de contato: alto poder de sorção (a), baixo poder de sorção (b) e filme de quitosana após alguns segundos de contato com a gota de água (c).



Fonte: do autor.

A figura 23(a) mostra uma superfície com alto poder de absorção interagindo com uma gota de água e sofrendo a ação da força gravitacional ($\vec{F}_g$), a qual intensifica a velocidade de captação de água, uma vez que a gota sendo pressionada sobre a superfície sofre o efeito de uma tensão vertical, que tende a causar o espalhamento lateral da gota, entretanto, para uma superfície com alto poder de absorção, a tensão vertical acaba acelerando a penetração das moléculas de água na matriz polimérica, fato que diminui o caráter hidrofílico da superfície, uma vez que a hidrofilicidade caracteriza o espalhamento

superficial da gota, o que é minimizado pela rápida penetração das moléculas de água na estrutura interna do filme. A figura 23(c), obtida da interação do filme de quitosana com a água deionizada, comprova o que foi comentado anteriormente e mostra a influência do intumescimento do polímero na medição do ângulo de contato.

Por outro lado, uma amostra com baixo poder de absorção, como na figura 23(b), ao sofrer a ação da mesma tensão vertical deforma-se, e como não há uma tendência grande de penetração das moléculas de água na estrutura do sólido, a gota acaba tendo maior espalhamento lateral sobre a superfície, o que intensifica o caráter hidrofílico da amostra. De fato, esse efeito gravitacional não é determinante para caracterizar a molhabilidade de superfícies, uma vez que esta propriedade não depende apenas de características físicas e, além disso, esse efeito pode ser minimizado pela diminuição do volume da gota, mesmo assim, este deve ser levado em consideração ao se trabalhar com amostras altamente absorventes.

Neste contexto, para minimizar a dificuldade de medição do ângulo de contato foi utilizada como líquido padrão a água deionizada, uma vez que eliminado os íons dispersos no líquido, a interação líquido-sólido tende a diminuir e a medida do ângulo de contato torna-se mais precisa.

Rotta (2008), por exemplo, utilizou água deionizada para estudar a molhabilidade de filmes de quitosana e obteve um ângulo de contato em torno de 92° , observando que o filme de quitosana não apresenta boa interação com líquidos polares. Já Hsu et al. (2004), Hamilton et al. (2006) e Tsai e Wang (2008) encontraram valores próximos a 80° . Por outro lado, Shi et al. (2008) e Zheng et al. (2009), utilizando como líquido padrão a água destilada, relataram valores próximos a 70° . Estes resultados mostram que, em geral, o filme de quitosana apresenta baixa hidrofiliabilidade, o que justifica a tentativa de melhorar esta propriedade incorporando ao filme uma molécula hidrofílica como o glicerol. A tabela 3

apresenta os valores de ângulo de contato para as diferentes composições do filme de quitosana.

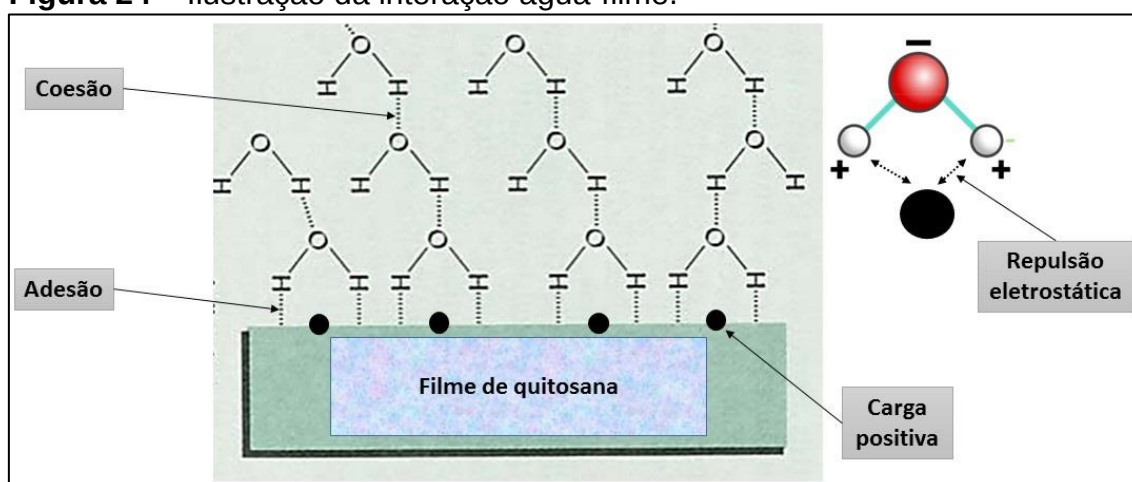
Tabela 3 – Medidas de ângulo de contato (média $\pm$ DP, n = 100).

Amostra	CH	CHG1	CHG2	CHG3
Ângulo de contato (°)	95,8 $\pm$ 0,1 ^a	92,4 $\pm$ 0,6 ^b	88,6 $\pm$ 0,1 ^c	71,4 $\pm$ 0,5 ^d

Mesma letra na mesma linha indica que não há diferença significativa entre as médias (ANOVA e Teste de Tukey, $p < 0,05$).

A partir dos valores de ângulo de contato é possível perceber que o filme CH (amostra padrão) apresentou baixa interação com a água, revelando certo caráter hidrofóbico, isto se deve provavelmente aos grupos amina protonados (NH_3^+) disposto na estrutura geral da quitosana, os quais surgem quando o polímero é diluído em meio ácido, formando assim um polímero catiônico (AZEVEDO et al., 2007). Essas cargas positivas dispersas na estrutura do filme, possivelmente estão se repelindo por repulsão eletrostática e, conseqüentemente, migrando para superfície da amostra, e isto faz com que o filme de quitosana tenha uma afinidade maior por moléculas aniônicas (MATHUR; NARANG, 1990), o que enfraquece a adesão do filme com a água, pois mesmo havendo atração entre as cargas positivas da superfície do filme com o polo negativo da molécula de água, também ocorre repulsão eletrostática com o polo positivo, como mostra a figura 24, onde é apresentada uma ilustração da possível interação da água com o filme.

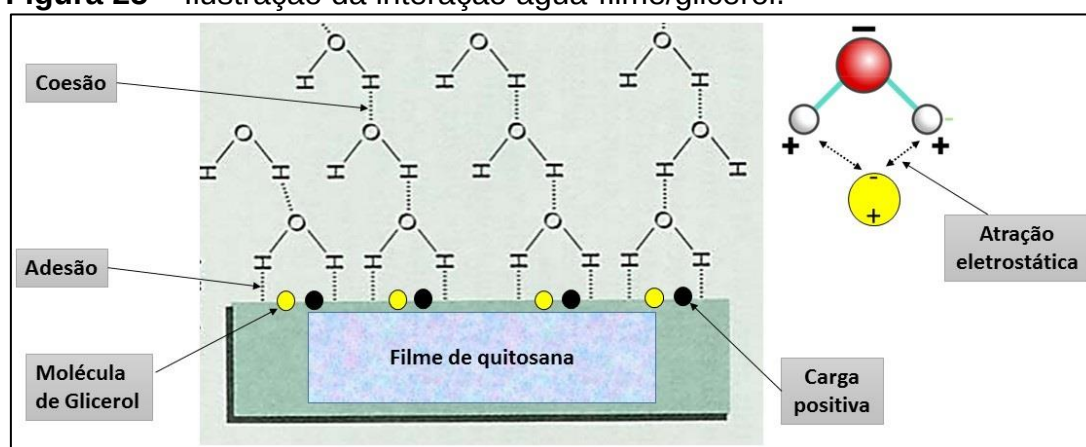
Figura 24 – Ilustração da interação água-filme.



Fonte: do autor.

Por outro lado, está evidente que a adição de glicerol influenciou a hidrofiliicidade dos filmes, uma vez que a sua adição crescente reduziu os valores de ângulo de contato obtidos. O fato da hidrofiliicidade do filme melhorar com o aumento da concentração de glicerol, provavelmente se deve à alta afinidade entre as moléculas de glicerol e de água, pois ambas são polares. De fato, ao saturar a amostra com glicerol, essas novas moléculas irão se alojar entre as cadeias poliméricas, inclusive se estabelecendo entre as moléculas mais externas do filme, aumentando a adesão água-filme, como ilustrado na figura 25.

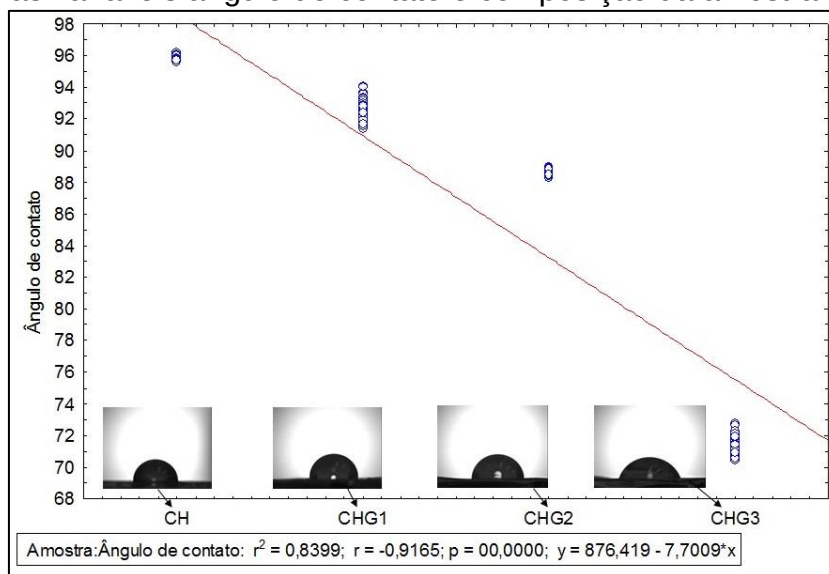
Figura 25 – Ilustração da interação água-filme/glicerol.



Fonte: do autor.

Com a adição de glicerol surge uma força eletrostática contrária a repulsão representada na figura 24, o que proporciona um incremento na adesão entre a água e a superfície do filme, consequentemente, isto leva a uma diminuição no valor do ângulo de contato e um aumento no caráter hidrofílico das amostras. Para confirmar a correlação entre concentração de glicerol e ângulo de contato foi realizado um teste de correlação seguido de uma regressão linear, onde verificou-se que as variáveis possuem alta correlação linear negativa ($r = -0,92$) e a variável amostra descreve aproximadamente 84% da variação do ângulo de contato, como pode ser observado na figura 26.

Figura 26 – Teste de correlação e regressão linear entre as variáveis ângulo de contato e composição da amostra.

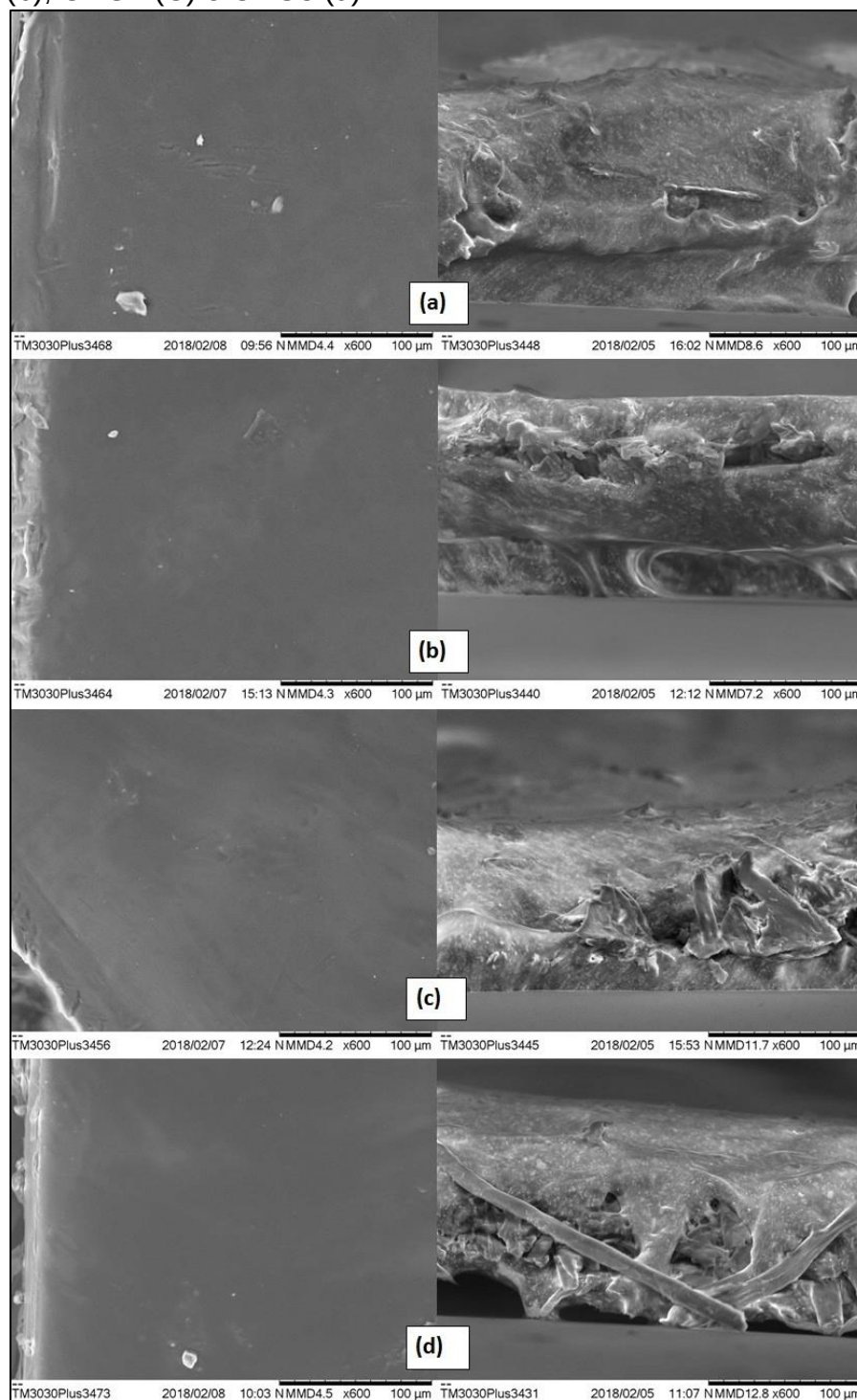


Fonte: do autor.

4.5 MORFOLOGIA E ANÁLISE TOPOGRÁFICA

As imagens por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) (figura 27) mostraram que todos os filmes obtidos são bastante estáveis e com poucas falhas aparentes. Neste contexto, o filme CHG3, em comparação aos outros, foi o que apresentou menos irregularidades em sua superfície, mostrando-se como o mais homogêneo. Apesar disso, é preciso enfatizar que os principais defeitos observados, provavelmente, surgiram devido a impurezas adquiridas durante o processo de secagem e/ou durante o armazenamento das amostras. Além disso, o escoamento da solução filmogênica sobre a placa de petri, quando não realizado com precisão, também pode conduzir a uma secagem irregular, gerando bolhas na superfície dos filmes.

Figura 27 – Imagens de MEV dos filmes obtidos: CH (a), CHG1 (b), CHG2 (c) e CHG3 (d).

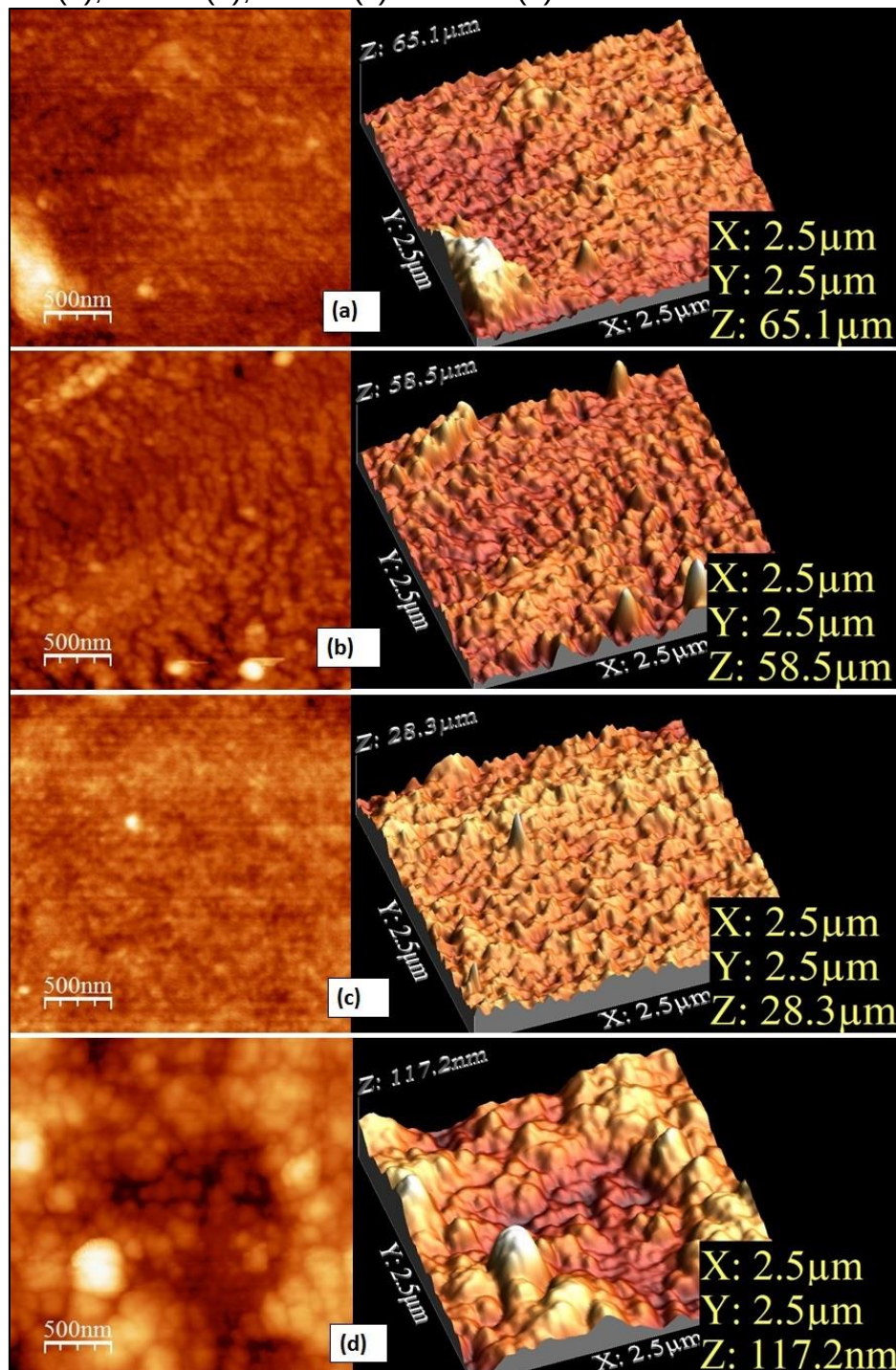


Fonte: do autor.

As imagens da secção transversal de cada amostra (lado direito da figura 27) revelaram uma estrutura interna de aspecto fibroso, em forma de placas, para todos os filmes de quitosana obtidos.

Em contrapartida, com o uso da técnica de Microscopia de Força Atômica (AFM), constatou-se que mesmo as regiões mais homogêneas dos filmes obtidos, não são tão regulares quanto aparentam. De fato, em escala nanométrica, uma característica comum foi observada em todos os filmes: uma topografia irregular e nanoporosa. A figura 28 apresenta imagens de AFM obtidas para cada composição do filme de quitosana.

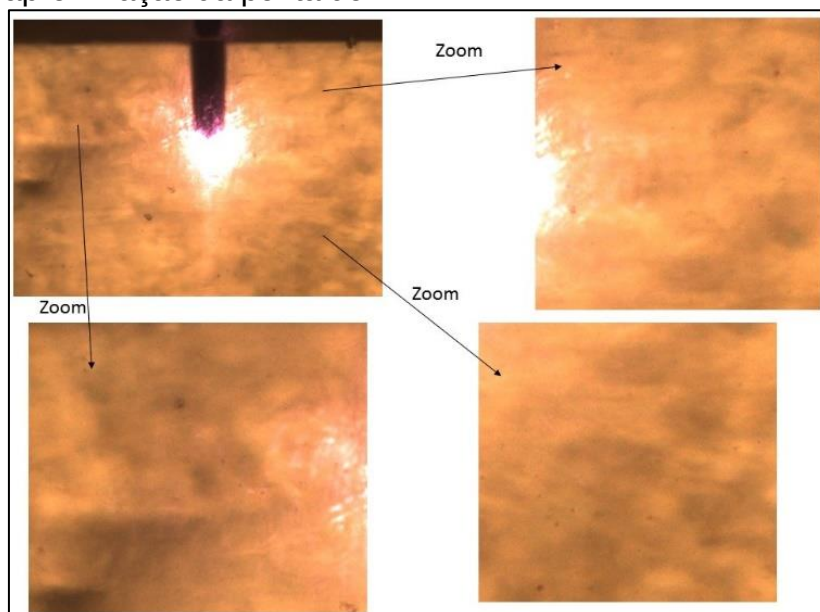
Figura 28 – Topografias dos filmes de quitosana obtidas por AFM: CH (a), CHG1 (b), CHG2 (c) e CHG3 (d).



Fonte: do autor.

A morfologia exibida através das imagens de AFM foi confirmada utilizando-se o Microscópio Óptico acoplado ao próprio aparelho, este possibilitou efetuar uma fotografia do filme CH no instante em que a ponta do AFM se aproximava da amostra, tal fotografia pode ser observada na figura 29. Essa verificação é importante para confirmar que os efeitos topográficos nas imagens de AFM realmente são dos filmes, e não artefatos de imagem proporcionados por imprecisões do aparelho ou algum outro erro durante a varredura.

Figura 29 – Fotografia da amostra CH durante a aproximação da ponta do AFM.



Fonte: do autor.

É possível perceber que a figura 28(a) apresenta o mesmo aspecto morfológico das imagens expostas na figura 29, o que garante a eficácia do estudo morfológico e topográfico através das imagens de AFM.

4.5.1 Rugosidade RMS e Uniformidade Topográfica

A partir das imagens topográficas obtidas por AFM, foi possível calcular, para cada amostra, os valores de rugosidade RMS e de Entropia Topográfica, os quais estão expostos na tabela 4.

Tabela 4 – Valores de RMS e Entropia Topográfica (média $\pm$ DP, n = 6).

Amostra	RMS (nm)	Entropia Topográfica
CH	4808 $\pm$ 4345 ^a	0,979 $\pm$ 0,021 ^{a,b}
CHG1	2893 $\pm$ 2425 ^a	0,959 $\pm$ 0,006 ^a
CHG2	1809 $\pm$ 1475 ^a	0,969 $\pm$ 0,019 ^{a,b}
CHG3	23 $\pm$ 10 ^a	0,992 $\pm$ 0,008 ^b

Mesma letra na mesma linha indica que não há diferença significativa entre as médias (ANOVA e Teste de Tukey, $p < 0,05$).

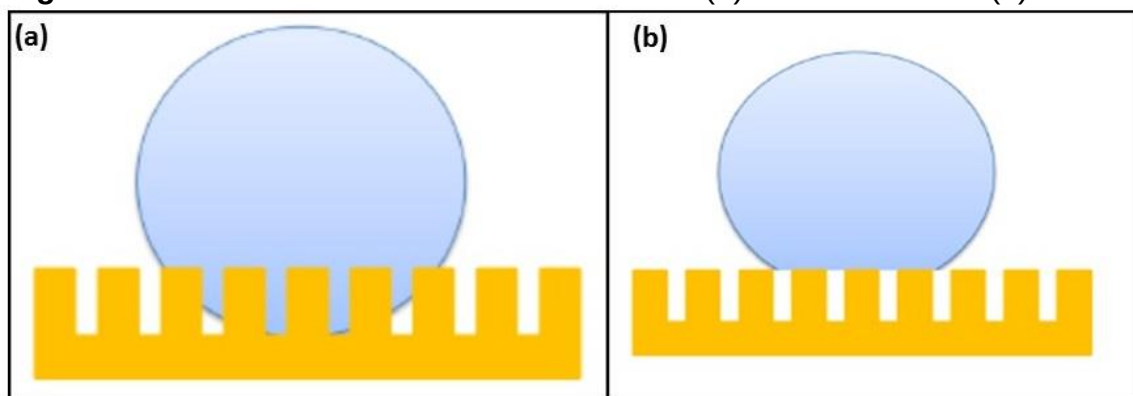
Todos os filmes apresentaram aleatoriedade para o valor de RMS (desvio padrão muito alto), entretanto, esse comportamento já era esperado, uma vez que a rugosidade sofre grandes variações por transformações de escala (temporal, dimensional, entre outras), e é exatamente por esta aleatoriedade que a caracterização superficial de um filme exige outros parâmetros complementares a rugosidade (SALCEDO, 2016).

Por outro lado, mesmo o teste estatístico indicando que não há diferença significativa em relação a rugosidade dos filmes (um efeito do alto valor de DP), é possível perceber que a rugosidade do filme de quitosana diminui com o aumento da concentração de glicerol.

A figura 28(d), por exemplo, mostra que filmes de quitosana com 25% de glicerol apresentam em sua superfície regiões de aglomerados moleculares (núcleos parcialmente circulares) distribuídos ao longo do filme, os quais produzem uma morfologia com estruturas hierárquicas bem definidas, minimizando assim o desvio padrão das alturas, o que explica o baixo valor de RMS dessa amostra. Esse efeito pode ter influenciado consideravelmente a molhabilidade do filme.

Neste contexto, deve-se ressaltar ainda que observações como estas vão de encontro com os modelos de Wenzel e de Cassie-Baxter (KUBIAK et al., 2011; COSTA, 2016). No modelo de Wenzel a gota de água penetra nos vales formados pela rugosidade do material, já no modelo de Cassie-Baxter a gota se assenta sobre os picos, não penetrando nos vales. A figura 30 mostra uma ilustração dos modelos.

Figura 30 – Estado de molhabilidade de Wenzel (a) e Cassie-Baxter (b).



Fonte: adaptado de Costa (2016).

Segundo o modelo de Wenzel, variações da rugosidade de uma superfície podem potencializar suas características quanto a molhabilidade (BURKARTER, 2010). De fato, a diminuição da rugosidade implica em um decréscimo da área superficial total, o que causa um aumento na energia de superfície (energia por unidade de área).

Além disso, a formação de aglomerados sobre a superfície produziu um maior espaçamento entre os vales, proporcionando canais de acesso para o escoamento do líquido. Esses efeitos morfológicos, juntamente com a presença das moléculas de glicerol (moléculas hidrofílicas) e o possível aumento na energia de superfície, melhoraram consideravelmente o caráter hidrofílico do filme de quitosana.

Com relação à uniformidade topográfica, constatou-se que a rugosidade, apesar da sua aleatoriedade, apresenta para todas as amostras uma distribuição uniforme dentro das regiões varridas pelo AFM, uma vez que os valores de entropia ficaram muito próximos de 1. Deveras, considerando a aplicação do filme como curativo, uma superfície uniforme ajudaria para não formação de bolhas de ar sob o biomaterial quando em contato com o ferimento (MATOS et al., 2017). Esse efeito ainda intensifica o caráter hidrofílico da amostra, pois evita a formação de bolsões de ar entre as cavidades superficiais, melhorando assim a transição entre o regime de Cassie-Baxter e o regime de Wenzel (OLIVEIRA, 2010).

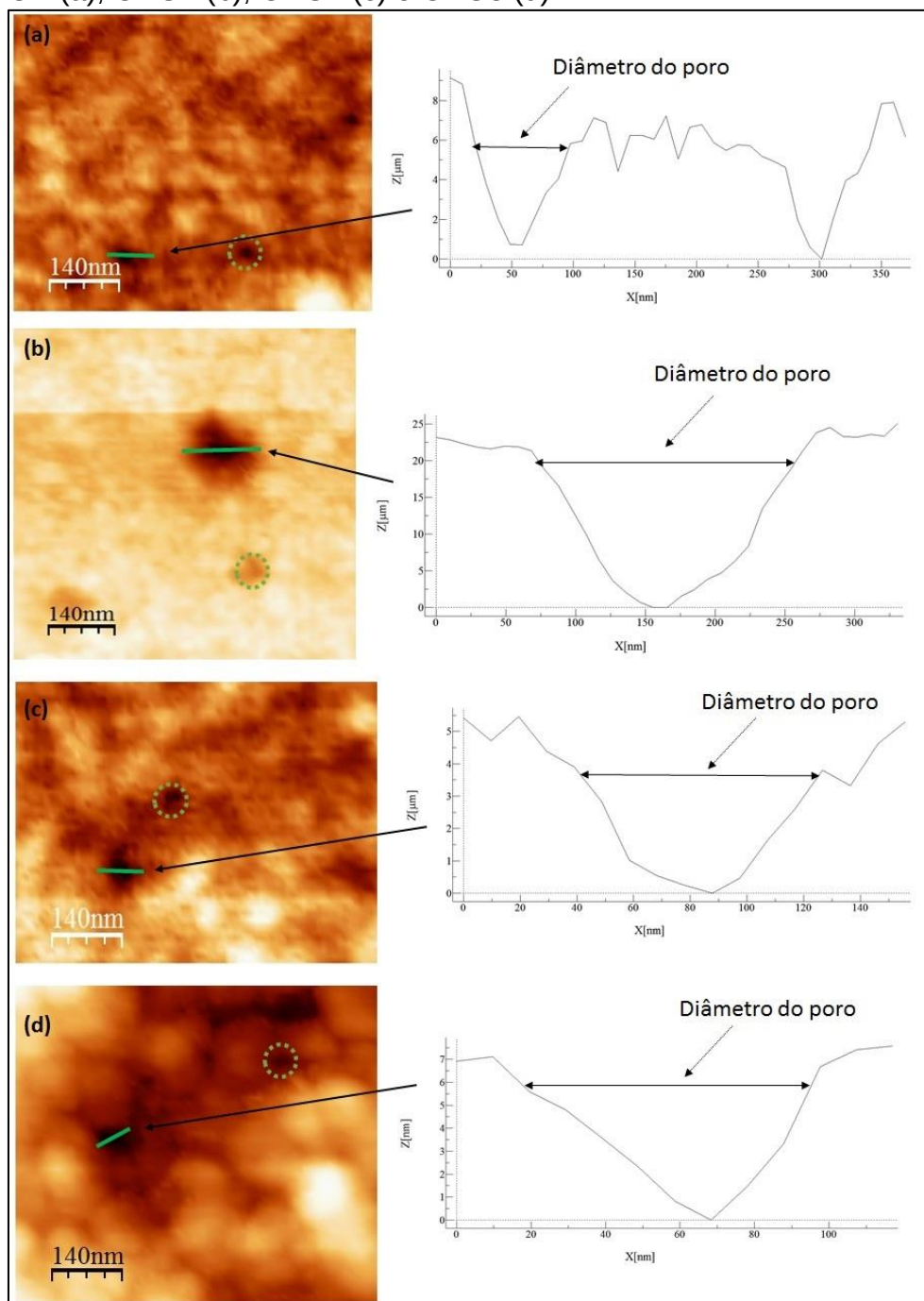
Neste sentido, pode-se dizer que os filmes de quitosana apresentaram maior tendência pelo regime de Wenzel, entretanto, sofrem grande influência da nanoporosidade indicada pela alta velocidade de captação de água (figura 22).

Além disso, analisando a tabela 4, o fato de não haver maiores discrepâncias na uniformidade superficial dos filmes, uma vez que o acréscimo de glicerol não proporcionou diferenças significativas com relação a uniformidade das amostras, indica que a estrutura química do material não sofreu mudanças significativas. Morais (2008), por exemplo, percebeu através de difratogramas de Raio X feitos em biofilmes, que a estrutura química do material influencia a homogeneidade superficial da amostra.

4.5.2 Nanoporosidade

As imagens de AFM revelaram a existência de nanoporos tipo funil na superfície dos filmes de quitosana, como pode ser verificado na figura 31. A presença de porosidade na superfície dos filmes explica a alta capacidade de sorção e velocidade de captação de água destes, assim como a dificuldade para alcançar medidas mais precisas de ângulo de contato.

Figura 31 – Zoom das imagens de AFM e perfil dos nanoporos em: CH (a), CHG1 (b), CHG2 (c) e CHG3 (d).



Fonte: do autor.

A partir do estudo dos perfis retirados das imagens de AFM, como os que aparecem na figura 31 ao lado das respectivas topografias, foram realizadas 100 medidas de diâmetro dos poros para cada amostra, obtendo-se em seguida valores médios (Tabela 5), no intuito de quantificar o grau de porosidade superficial dos filmes, tal método já foi utilizado por Assis e Silva (2003).

Tabela 5 – Diâmetro e distribuição dos poros (média $\pm$ DP, n = 100).

Amostra	Diâmetro dos poros (nm)	Distribuição dos poros (%)
CH	55 $\pm$ 17 ^a	56 – macroporos 44 – mesoporos
CHG1	109 $\pm$ 50 ^b	90 – macroporos 10 – mesoporos
CHG2	85 $\pm$ 30 ^c	88 – macroporos 12 – mesoporos
CHG3	108 $\pm$ 40 ^b	88 – macroporos 12 – mesoporos

Mesma letra na mesma linha indica que não há diferença significativa entre as médias (ANOVA e Teste de Tukey, $p < 0,05$).

A amostra padrão (CH) apresentou o menor diâmetro médio de poro (55 nm), possuindo uma tendência maior pela presença de macroporos (Diâmetro > 50 nm) com 56% de medidas destes e 44% de mesoporos. Com a adição de glicerol ao filme ocorreu um aumento tanto no diâmetro médio dos poros quanto na presença de macroporos. CHG1, por exemplo, apresentou um diâmetro médio de poro igual a 109 nm, com a presença de 90% de macroporos e apenas 10% de mesoporos. Nenhuma das amostras apresentou a existência de microporos na estrutura superficial do filme.

O teste estatístico mostrou que todas as composições apresentam diferença significativa em relação ao diâmetro médio de poros da amostra padrão, entretanto, essa medida não é suficiente para caracterizar o filme de quitosana, uma vez que sua superfície se mostrou bastante irregular.

Sendo assim, é necessário verificar o percentual de poros existentes na superfície, pois o filme pode possuir o maior diâmetro de poro e uma tendência maior por macroporos, o que permite acreditar que essa amostra possui maior velocidade de captação de água e absorção, entretanto, a mesma amostra pode não apresentar um percentual de poros significativo na sua superfície, minimizando a ação porosa do filme em períodos curtos de tempo, uma vez que a quantidade de pontos de acesso para a água seria menor. Nesta conjuntura, os resultados alcançados para o Percentual Poroso Superficial estão expostos na tabela 6.

Tabela 6 – Percentual Poroso Superficial para cada amostra (média $\pm$ DP, n = 6).

Amostra	CH	CHG1	CHG2	CHG3
Percentual Poroso (%)	50,6 $\pm$ 5,7 ^a	50,8 $\pm$ 3,6 ^a	53,4 $\pm$ 3,5 ^a	49,6 $\pm$ 3,6 ^a

Mesma letra na mesma linha indica que não há diferença significativa entre as médias (ANOVA e Teste de Tukey, $p < 0,05$).

O filme CHG2 apresentou o maior percentual poroso com 53,4% dos pixels de sua imagem como sendo pontos de acesso para a água, enquanto que o filme CHG3 apresentou apenas 49,6%, o que permite dizer que CHG3 é a amostra com menor disponibilidade de poros ao ambiente externo.

Por outro lado, é possível perceber que o acréscimo de glicerol ao filme não foi determinante para causar diferenças significativas na presença de poros sobre a superfície das amostras, entretanto, a molhabilidade possivelmente foi afetada por esse percentual, uma vez que o menor ângulo de contato foi obtido no filme CHG3 (71,4°), que apesar de apresentar um alto valor para o diâmetro médio de poros (108 nm) e possuir 88% de macroporos, o seu baixo percentual poroso equilibrou a penetração de água na matriz polimérica, ajudando a minimizar o efeito gravitacional descrito na figura 23, o que ocasionou um melhor espalhamento superficial da gota de água.

De fato, ao comparar os três filmes que possuem glicerol em sua composição, pode-se observar que CHG2 possui diâmetro médio de poros menor que CHG3, porém possui um percentual poroso maior, o que provavelmente compensou o diâmetro dos poros e deixou CHG2 com uma velocidade de captação de água aparentemente maior, como mostra o gráfico da figura 22.

Já CHG1, além de possuir o maior valor de diâmetro médio de poros (109 nm) também apresentou um percentual poroso de 50,8%, o que acabou intensificando tanto a sua velocidade de captação de água quanto a sua capacidade de sorção, que foi a maior em comparação com as outras composições, o que justifica o baixo carácter hidrofílico desse filme, uma vez que o efeito gravitacional, combinado com a alta velocidade de

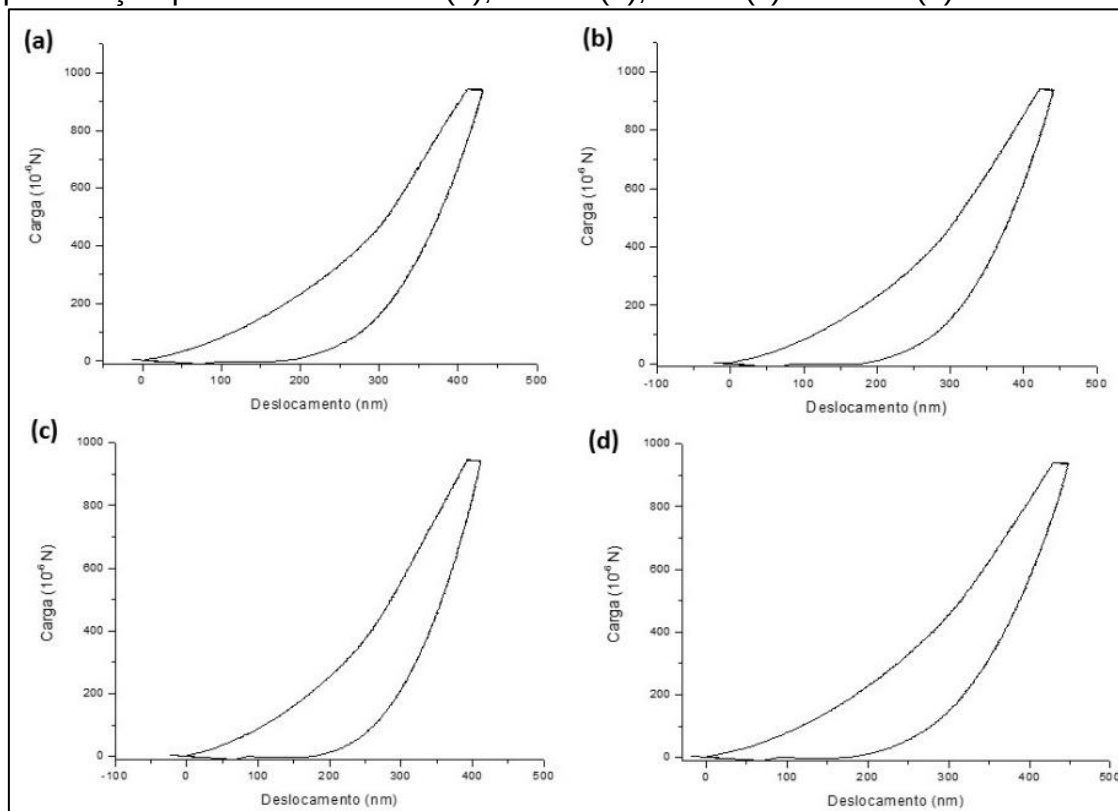
captação de água e capacidade de sorção, fazem com que a água penetre na matriz polimérica antes que ocorra um espalhamento significativo da gota sobre a superfície.

Com relação a amostra padrão, não se pode afirmar que os efeitos gravitacional e poroso influenciaram de forma significativa a molhabilidade desta, uma vez que a presença de cargas elétricas positivas na superfície do filme (devido a protonação das aminas da quitosana) provavelmente são as principais responsáveis pela tendência hidrofóbica da amostra CH, uma vez que estas repelem o polo positivo da molécula de água, dificultando a adesão.

4.6 PROPRIEDADES MECÂNICAS

Utilizando um nanoindentador, no intuito de avaliar quantitativamente a Dureza e o Módulo de Elasticidade das amostras, foram obtidas curvas de carga e descarga, como as da figura 32. A partir de tais curvas foram adquiridos os resultados expostos na tabela 7.

Figura 32 – Curvas de carga e descarga em função da profundidade de penetração para os filmes: CH (a), CHG1 (b), CHG2(c) e CHG3 (d).



Fonte: do autor. (10^{-6} N = 1μ m).

Tabela 7 – Valores de rigidez (S), dureza (H), módulo elástico (E) e profundidade residual (h_f) (média $\pm$ DP, n=12).

Amostra	S ($\mu\text{N/nm}$)	H (GPa)	E (GPa)	h_f (nm)
CH	$6,537 \pm 2,036^a$	$0,267 \pm 0,015^a$	$3,884 \pm 0,113^a$	$120,29 \pm 53,61^a$
CHG1	$6,125 \pm 1,863^a$	$0,251 \pm 0,025^a$	$3,551 \pm 0,230^b$	$120,50 \pm 54,24^a$
CHG2	$6,731 \pm 2,032^a$	$0,306 \pm 0,060^b$	$4,277 \pm 0,467^c$	$108,52 \pm 49,76^a$
CHG3	$5,896 \pm 1,838^a$	$0,248 \pm 0,014^a$	$3,384 \pm 0,119^b$	$111,96 \pm 47,77^a$

Mesma letra na mesma linha indica que não há diferença significativa entre as médias (ANOVA e Teste de Tukey, $p < 0,05$).

Os valores de rigidez e profundidade residual não apresentaram diferença significativa entre as amostras. Entretanto, o fato do material apresentar profundidade residual, após o ensaio mecânico, indica que estes filmes possuem um comportamento elasto-plástico, ou seja, uma parte da deformação é elástica e a outra é plástica. Em materiais que apresentam esse comportamento pode ocorrer o fenômeno conhecido como encruamento, isto é, existe a possibilidade de haver endurecimento ou amolecimento do material acompanhando a evolução da deformação plástica (SOUZA NETO et al., 2008; CALLISTER; RETHWISCH, 2016).

Assim sendo, possivelmente foi o encruamento do material que proporcionou um resultado adverso para o filme CHG2, uma vez que a adição de plastificante deveria aumentar a flexibilidade do material diminuindo o Módulo de Elasticidade. Entretanto, a amostra CHG2 apresentou $H=0,306$ GPa e $E=4,277$ GPa enquanto que a amostra padrão (CH) apresentou $H=0,267$ GPa e $E=3,884$ GPa, mostrando um aumento de aproximadamente 14,6% para Dureza e 10% para o Módulo de Elasticidade. De fato, a rigidez do filme CHG2 é bem semelhante ao resultado obtido para o filme CH, porém, a profundidade residual diminuiu cerca de 9,8% em relação a amostra padrão, tal resposta reafirma a possível existência de encruamento nesse filme, uma vez que os resultados obtidos através do ensaio de indentação são efeitos da tensão vertical sobre os filmes proporcionada pelo indentador.

Por outro lado, os filmes CHG1 e CHG3 apresentaram valores de Dureza estatisticamente iguais ao do filme CH, mostrando que a adição de glicerol não modificou

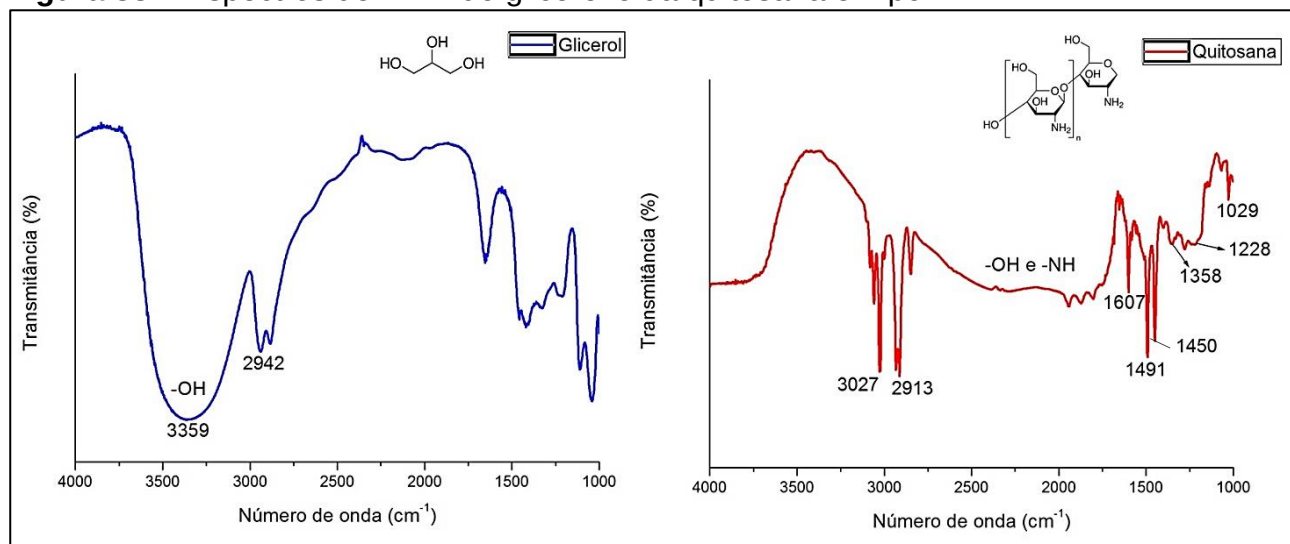
a resistência do biomaterial a defeitos causados por estresse mecânico externo, entretanto, com respeito ao Módulo de Elasticidade, ambos os filmes acusaram diferença significativa em relação a amostra padrão, com uma diminuição de aproximadamente 8,6% para CHG1 e de aproximadamente 12,9% para CHG3.

De fato, o glicerol quando incorporado ao filme tende a diminuir a resistência deste a deformações, pois tal plastificante se posiciona entre as cadeias poliméricas, tornando-as mais distantes entre si, o que resulta em uma redução nas forças intermoleculares do biomaterial (DALLAN, 2005; HORN, 2012). Esse enfraquecimento das forças intermoleculares facilita a ocorrência de distorções nas ligações entre as cadeias poliméricas em situações de estresse mecânico, o que proporciona ao biomaterial um aumento das suas propriedades elásticas. Assim, é justo dizer que o filme CHG3 é o mais flexível dentre todas as amostras, uma vez que apresentou o menor valor de Módulo de Elasticidade ($E=3,384$ GPa).

4.7 ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

Foram obtidos os espectros de FTIR da quitosana em pó e do glicerol para avaliar a estrutura química de ambos, antes de misturá-los. Tais espectros estão expostos na figura 33.

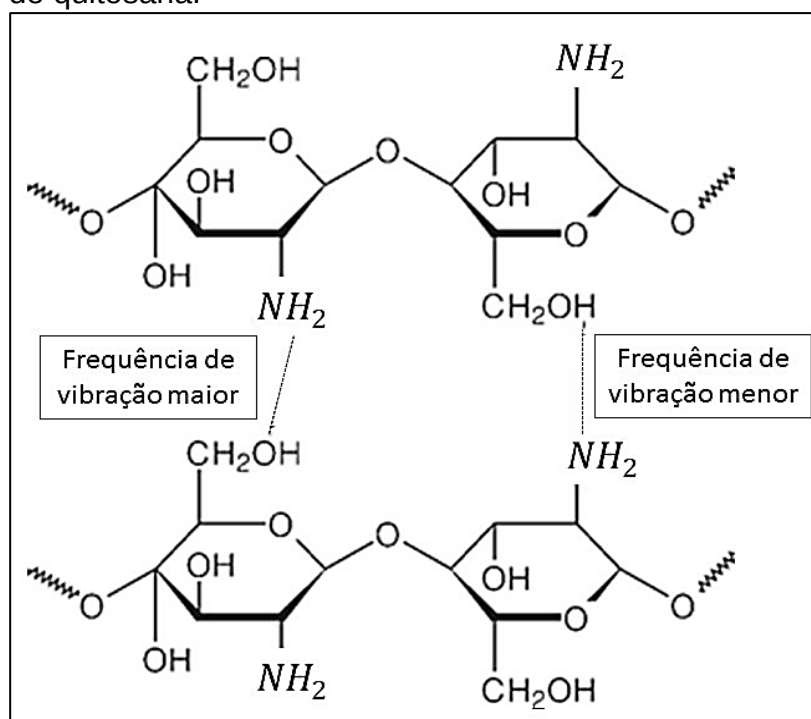
Figura 33 – Espectros de FTIR do glicerol e da quitosana em pó.



O espectro do glicerol, apresentou a banda característica dos álcoois em 3359 cm^{-1} , correspondente aos grupos hidroxilas presentes nas ligações de hidrogênio entre as moléculas do plastificante (vibração do estiramento -OH), além da banda em 2942 cm^{-1} que surge a partir do estiramento da ligação -CH₂.

Com relação ao espectro da quitosana, as bandas $3650\text{-}3600\text{ cm}^{-1}$ e $3400\text{-}3200\text{ cm}^{-1}$, que correspondem as hidroxilas e/ou aminas livres e aquelas associadas às ligações de hidrogênio (PAVIA et al., 2010), respectivamente, possivelmente sofreram um deslocamento para frequências mais baixas, um efeito das ligações de hidrogênio secundárias realizadas pelos grupos aminas livres (-NH₂) da molécula de quitosana, como ilustrado na figura 34.

Figura 34 – Ligações de hidrogênio entre as moléculas de quitosana.



Fonte: adaptado de Allinger (1991).

De fato, o nitrogênio é menos eletronegativo do que o oxigênio, por isso a amina forma ligações de hidrogênio mais fracas, o que explica a baixa solubilidade da quitosana em água, além disso, ligações mais fracas possuem constante de força menor e vibram em frequências mais baixas (NUSSENZVEIG, 2003; HOLLAUER, 2007). À vista disso, para

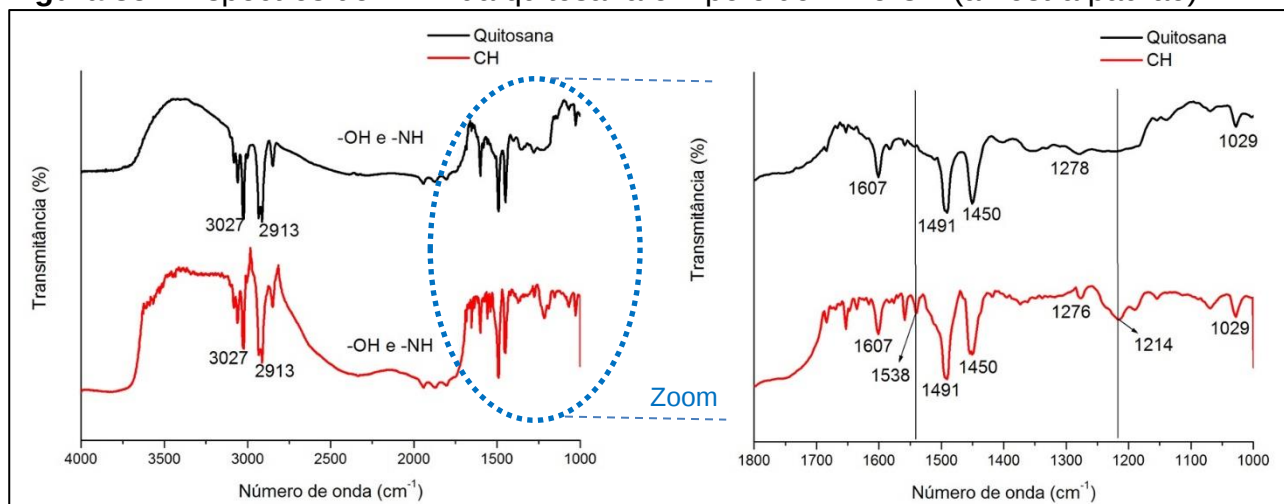
que tal vibração apareça no espectro de infravermelho, a molécula precisaria sofrer uma variação no seu momento dipolar devido a esta vibração. Vibrações moleculares que não impliquem em variação do momento de dipolo não dão origem a bandas de absorção no espectro de infravermelho (PAVIA et al., 2010). Sendo assim, possivelmente a ligação de hidrogênio secundária, ocasionada pelo nitrogênio das aminas, amenizou os efeitos da vibração intermolecular sobre o momento dipolar da molécula de quitosana, por isso o deslocamento das bandas $3650\text{-}3600\text{ cm}^{-1}$ e $3400\text{-}3200\text{ cm}^{-1}$ para frequências mais baixas.

Neste contexto, os picos em 3017 cm^{-1} e 2913 cm^{-1} possivelmente correspondem a deformação axial O-H e N-H de hidroxilas e aminas livres, as quais não conseguiram formar ligações de hidrogênio. Já a banda larga localizada no intervalo $2830\text{-}1669\text{ cm}^{-1}$ deve ser uma sobreposição dos estiramentos -OH e -NH de hidroxilas e aminas associadas às ligações de hidrogênio existentes entre as cadeias poliméricas da quitosana.

Ainda com relação ao espectro da quitosana (figura 33), é possível perceber a presença de um pico em 1607 cm^{-1} , que segundo Horn (2012), corresponde as aminas protonadas da quitosana (-NH_3^+), confirmando assim a presença de cargas positivas na estrutura do biopolímero. Além disso, o pico em 1491 cm^{-1} corresponde a vibração de deformação angular do grupo -NH de aminas ou amidas secundárias (PAVIA et al., 2010). Já os picos em 1450 cm^{-1} e 1358 cm^{-1} surgem a partir da deformação angular e fora do plano da ligação -CH_2 , e os picos em 1228 cm^{-1} e 1029 cm^{-1} correspondem a deformação axial O-H e a deformação axial C-O, respectivamente.

De acordo com Muradian (1980) e Pavia et al. (2010), a vibração de deformação do grupo -NH de aminas ou amidas secundárias é muito difícil de ser utilizada para interpretação de estruturas, pois tendo uma absorção fraca, a mesma se torna de difícil detecção. Assim, a região em torno do pico 1491 cm^{-1} foi a escolhida para comparar as diferentes amostras analisadas. Neste contexto, a figura 35 compara os espectros da quitosana em pó e do filme de quitosana sem glicerol (CH).

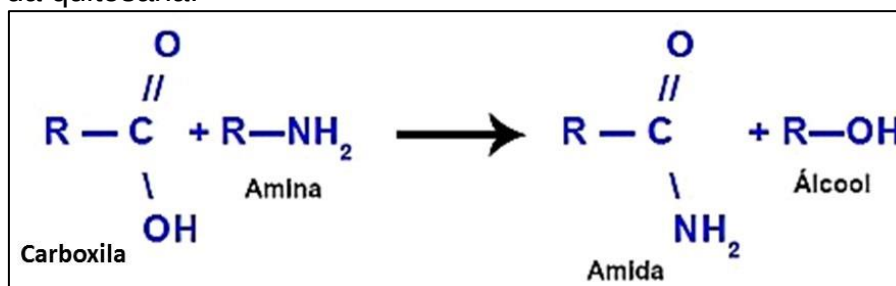
Figura 35 – Espectros de FTIR da quitosana em pó e do filme CH (amostra padrão).



Os espectros da quitosana em pó e do filme CH não demonstraram grandes diferenças, principalmente na região entre 4000 cm^{-1} e 1800 cm^{-1} . No entanto, ampliando a região entre 1800 cm^{-1} e 1000 cm^{-1} , alguns picos ficam mais notórios e pode-se destacar, para o filme de quitosana, dois em particular: o pico em 1538 cm^{-1} e o pico em 1214 cm^{-1} .

O pico em 1538 cm^{-1} , assim como o pico em 1491 cm^{-1} , corresponde a deformação angular da ligação N-H de aminas ou amidas secundárias, tais amidas possivelmente surgem da reação do solvente (ácido acético) com o pó do polímero, como mostra a figura 36. Além disso, o pico em 1491 cm^{-1} do filme CH sofreu um certo acréscimo de intensidade em relação ao da amostra de quitosana em pó, o que reafirma a presença de amidas após a diluição do polímero em meio ácido.

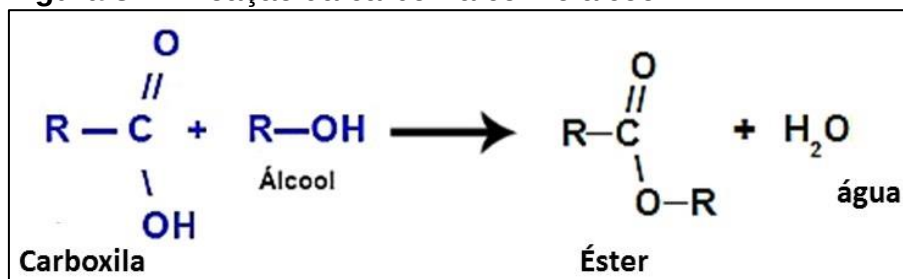
Figura 36 – Reação entre a carboxila do ácido acético e a amina da quitosana.



Fonte: adaptado de Allinger *et al.* (1991).

Por outro lado, o pico em 1214 cm⁻¹, que quase não aparece no espectro da quitosana em pó, torna-se mais acentuado no espectro do filme CH, tal pico é típico de ligação C-O de ésteres saturados, que podem ter origem na reação secundária da carboxila do ácido acético com o álcool liberado da reação da amida. A figura 37 mostra um esquema dessa possível reação.

Figura 37 – Reação da carboxila com o álcool.



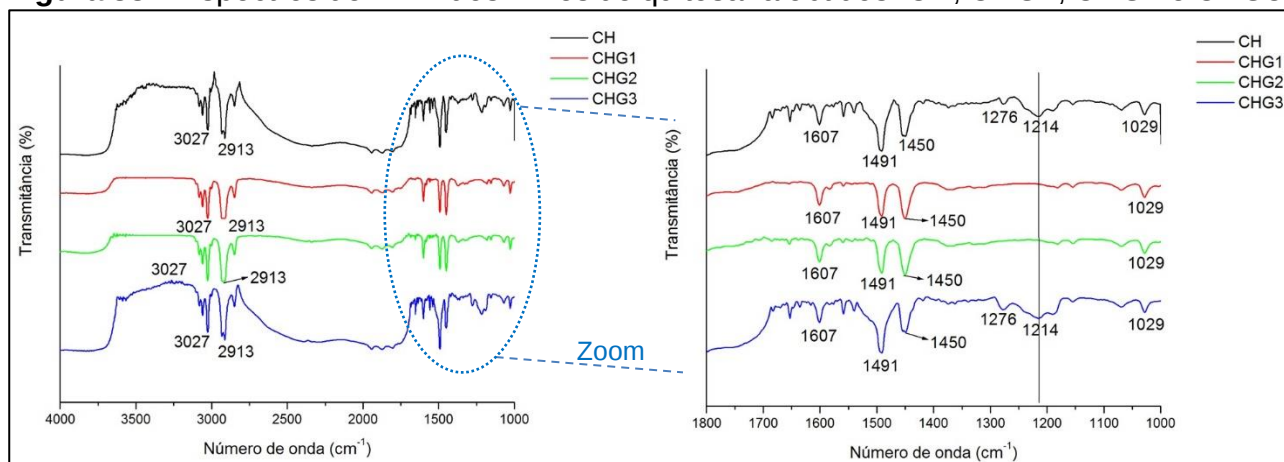
Fonte: adaptado de Allinger *et al.* (1991).

Para comparar as diferentes composições do filme de quitosana, após a adição de glicerol, foram obtidos os espectros expostos na figura 38. De modo geral, tais espectros não apresentaram grandes diferenças. Entretanto, os espectros dos filmes CHG1 e CHG2 não demonstraram a presença do pico 1214 cm⁻¹, o que não era esperado, uma vez que o glicerol é um álcool, assim a produção de ésteres deveria ser maior. Provavelmente, a concentração de glicerol para estes filmes não foi suficiente para intensificar a presença de ésteres e a reação secundária ocasionada após a formação das amidas deve ter sido amenizada durante a agitação magnética da solução filmogênica.

Além disso, todos os espectros mostram que as bandas correspondentes ao glicerol foram distribuídas dentro do espectro de quitosana. Um dos motivos pode ser a baixa concentração deste plastificante na solução filmogênica e/ou a discrepância entre os pesos moleculares do plastificante e do biopolímero, uma vez que o glicerol possui aproximadamente 92,1 g/mol e a quitosana 190.000 g/mol (sigma-Aldrich®, Brasil). Associado a isso, pode-se pensar ainda que a maior parte dos grupamentos presentes no

agente plastificante, a exceção das hidroxilas, não apresentariam grande reatividade com os grupamentos funcionais da quitosana.

Figura 38 – Espectros de FTIR dos filmes de quitosana obtidos: CH, CHG1, CHG2 e CHG3.



4.8 DIFRATOMETRIA DE RAIOS X (DRX)

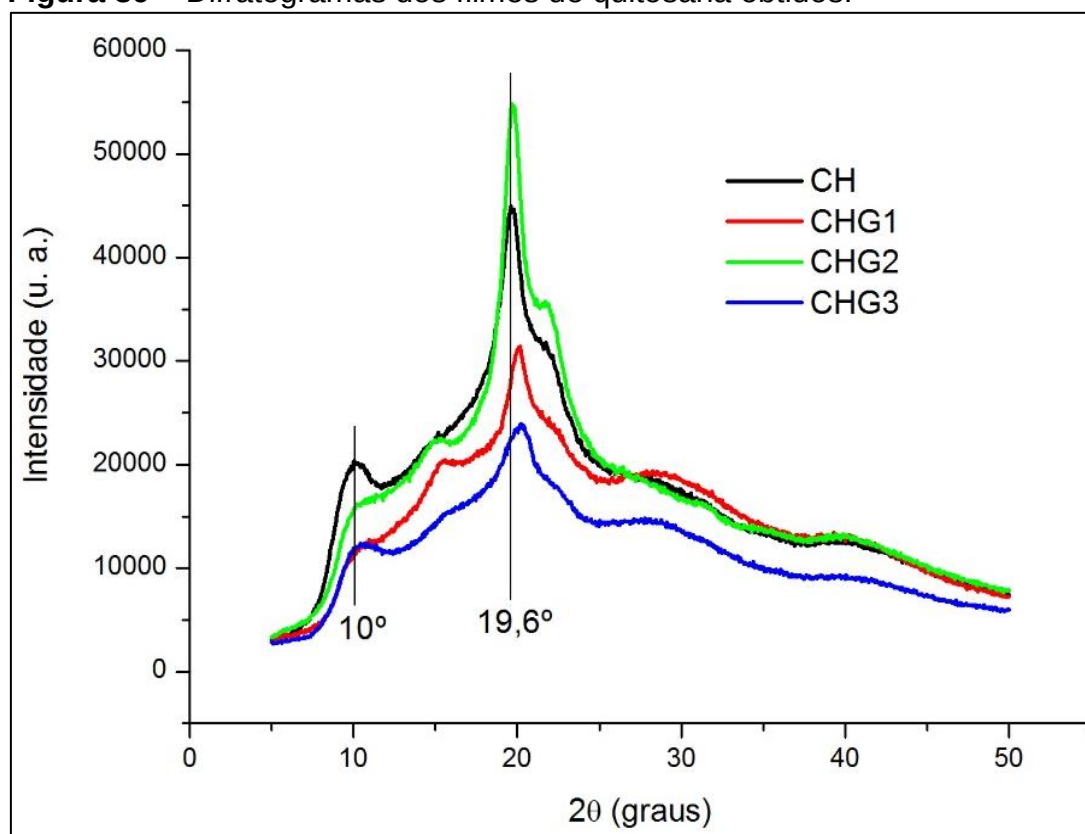
Os difratogramas dos filmes obtidos (figura 39) não revelaram grandes diferenças quanto a fase cristalina da quitosana, uma vez que todos apresentaram picos de difração próximos a $2\theta = 20^\circ$, além de um halo de difração em $2\theta = 10^\circ$ também referente a quitosana. Segundo Uragami e Tokura (2006), as fortes interações intra e intermoleculares proporcionadas pelas ligações de hidrogênio entre os grupos amina, álcool e amida presentes na estrutura química da quitosana, fazem com que esse biomaterial apresente certa cristalinidade.

Neste sentido, o filme CHG2 foi o que apresentou maior grau de cristalinidade, uma vez que seu pico de difração foi o mais acentuado, indicando que as ligações intermoleculares no mesmo são mais intensas, o que explica o seu alto valor de Dureza e Módulo de Elasticidade. Além disso, quanto maior o grau de cristalinidade de um polímero maior é a sua densidade (CALLISTER; RETHWISCH, 2016), por isso a coloração levemente mais escura do filme CHG2 em relação aos outros. De fato, esta amostra exigiu maior tempo de agitação durante a preparação da solução filmogênica, o que pode ter

proporcionado certa variação de temperatura, a qual possivelmente alterou as propriedades do biomaterial.

Por outro lado, é possível perceber uma diminuição considerável da cristalinidade do material na amostra CHG3, o que justifica o fato desta se apresentar como o filme mais flexível, uma vez que seu Módulo de Elasticidade foi o menor entre todas as amostras analisadas.

Figura 39 – Difrátogramas dos filmes de quitosana obtidos.



O filme de quitosana, ao contrário do que se esperava, não apresentou caráter hidrofílico notório, uma vez que a amostra padrão (filme CH) acusou um ângulo de contato de 95,8°. De fato, a quitosana fornece um biomaterial com grande capacidade de sorção e estrutura nanoporosa, por isso era aceitável esperar que a hidrofilicidade dos filmes fosse evidente, porém, os resultados alcançados mostraram que a molhabilidade dos filmes foi claramente afetada pela estrutura superficial das amostras e pela possível presença de cargas na superfície das mesmas.

À vista disso, pode-se dizer que a adição de glicerol ao filme proporcionou duas modificações importantes: amenizou os efeitos contrários a adesão água-superfície e alterou a topografia das amostras.

Deveras, o glicerol sendo uma molécula polar, quando adicionado ao filme, tende a aumentar a interação gota-superfície, uma vez que o plastificante possivelmente diminui a repulsão eletrostática causada pela presença de cargas positivas na superfície das amostras. Cargas elétricas que provavelmente migraram para superfície após a protonação das aminas presentes no biopolímero (a presença das aminas protonadas na estrutura da quitosana foi confirmada através do espectro de FTIR).

Com relação a morfologia, as imagens de MEV não revelaram grandes diferenças entre os filmes obtidos, porém, mostraram que estes possuem uma estrutura interna de aspecto fibroso, em forma de placas. Por outro lado, em escala nanométrica, as imagens de AFM denunciaram a estrutura superficial nanoporosa dos filmes de quitosana. Assim, através das topografias foi possível perceber que a incorporação do glicerol ao biomaterial diminuiu a rugosidade RMS (proporcionando a criação de aglomerados moleculares bem definidos e um possível aumento na energia de superfície), entretanto, não afetou de forma

significativa a disponibilidade de poros ao ambiente externo (apesar de aumentar o tamanho médio de poros) e manteve a uniformidade topográfica dos filmes (o que ajuda, por exemplo, quando aplicado à área biomédica, para uma melhor adesão do filme com a pele, evitando a formação de bolsões de ar na interface e, conseqüentemente, aumentando a área de contato).

É preciso enfatizar também, que a disponibilidade de poros ao ambiente externo foi avaliada através de um programa em linguagem R criado exclusivamente para esta pesquisa, tal programa se mostrou extremamente útil ao proporcionar um resultado quantitativo do Percentual Poroso Superficial.

Com relação as propriedades mecânicas, apesar da dificuldade na indentação demonstrada pela amostra CHG2, devido ao encruamento do material elasto-plástico e do alto grau de cristalinidade apresentado pela mesma, foi interessante obter um biomaterial mais flexível, após a adição de plastificante, fato que aconteceu com as amostras CHG1 e CHG3, sem perder a resistência e a Dureza da amostra padrão, ou seja, sem fazer o filme frágil a estresses mecânicos externos.

No que se refere as características químicas, o acréscimo de glicerol aumentou a solubilidade dos filmes em água, o que já era esperado, uma vez que o glicerol é uma molécula hidrofílica. Em contrapartida, os espectros de FTIR mostraram que as bandas correspondentes ao glicerol foram distribuídas dentro do espectro de quitosana, não causando grandes modificações na estrutura química do biomaterial, entretanto, tais espectros confirmaram a presença de aminas protonadas na estrutura química da quitosana, fato que justifica a hipótese de que foram cargas elétricas positivas na superfície dos filmes que diminuíram a interação destes com a água, tornando-os menos hidrofílicos.

Nos difratogramas de Raio X também não foram observadas grandes diferenças entre as amostras, porém, estes revelaram o filme CHG2 como sendo o de maior grau de cristalinidade, o que justifica seu alto valor de Dureza e baixa flexibilidade, além de sua

coloração levemente mais escura, uma vez que a densidade é diretamente proporcional à cristalinidade. Por outro lado, o filme CHG3 foi o que apresentou menor grau de cristalinidade, o que já era esperado após os testes mecânicos, onde o mesmo apresentou maior flexibilidade em relação às outras amostras. Além disso, a ausência de grandes mudanças na estrutura química do filme garante que as propriedades terapêuticas e toxicológicas da quitosana não foram afetadas pela presença do plastificante, o que é algo extremamente interessante para futuras aplicações na área biomédica.

Neste contexto, o filme CHG3 foi o que apresentou melhores resultados na análise. Este se mostrou ser o mais hidrofílico (com baixo Percentual Poroso Superficial, porém, com grande capacidade de sorção a longo prazo) e o mais flexível, tendo uma diminuição na cristalinidade ocasionada pela presença do glicerol (além de resistente tanto quanto a amostra padrão). Apresentou também um espectro de FTIR bem semelhante ao da amostra padrão, garantindo que as propriedades farmacêuticas da quitosana foram preservadas após a adição de glicerol ao filme. Assim, tais características fazem dessa amostra a mais promissora em uma possível aplicação para fins biomédicos.

Com relação às pesquisas futuras, a temperatura e a umidade relativa do ar, durante a preparação dos filmes, deverão ser melhor controlados para evitar efeitos externos sobre as propriedades do biomaterial, uma vez que filmes finos são extremamente sensíveis a variáveis termodinâmicas. Será interessante também avaliar os efeitos da temperatura sobre as propriedades do filme, alterando esta variável durante a agitação magnética da solução filmogênica e durante a secagem na placa de petri.

Além disso, apesar do filme de quitosana contendo glicerol ter apresentado boas características, o mesmo ainda precisa de muitas melhorias, como por exemplo, em seu caráter hidrofílico e solubilidade em água (para que seja utilizado como veículo de liberação controlada de fármacos, por exemplo).

Para melhorar o carácter hidrofílico e a solubilidade em água seria necessária uma concentração muito grande de glicerol, o que possivelmente levaria a uma perda das propriedades farmacêuticas da quitosana. Entretanto, uma alternativa mais viável seria criar uma blenda, juntando a quitosana à outro polímero natural, como a gelatina por exemplo. Tal mistura agregaria ótimas propriedades farmacológicas, além de possivelmente proporcionar um biomaterial mais equilibrado em relação a hidrofilicidade e a solubilidade em água, uma vez que a gelatina é altamente solúvel em água e possui alto grau de hidrofilicidade.

Ademais, este novo filme, obtido da blenda quitosana-gelatina, poderia ser utilizado como curativo ativo para feridas mais graves como em casos de escarpelamento ou feridas diabéticas, onde o tratamento deve ser intensivo, pois agregando e equilibrando as propriedades de ambos os polímeros em um só biomaterial, seria possível utilizá-lo como veículo de liberação controlada para algum ativo, uma vez que a gelatina reticulada já vem sendo utilizada para este fim. Neste sentido, em vez de utilizar um agente reticulante, quem iria fortalecer a estrutura do filme seria a própria quitosana, o que talvez fornecesse um filme mais maleável do que o filme de quitosana, porém, mais resistente do que o filme de gelatina.

- ALLINGER, N. L.; CAVA; M. P.; JONGH, D. C; JOHNSON, C.R.; LEBEL, N. A.; STEVENS, C.L. **Química Orgânica**. 2. ed. Barcelona: Reverté 1991. ISBN: 8291-7015-4.
- ASSIS, O. B. G.; SILVA, V. L. Caracterização estrutural e da capacidade de absorção de água em filmes finos de quitosana processados em diversas concentrações. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 13, n. 4, p. 223-228, 2003.
- AZEVEDO, 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. 23, p. 27-34, 2007.
- BEVERLYA, R. L.; JANES, M. E.; PRINYAWIWATKUL, W.; NO, H. K. Edible chitosan films on ready-to-eat roast beef for the control of *Listeria monocytogenes*. **Food Microbiology**, v. 25, n. 3, p. 534-537, 2008.
- BINNIG, G.; QUATE C. F. Atomic force microscope. **Physical Review Letters**, v. 56, n. 9, p. 930-933, 1986.
- BOATENG, J. S; MATTHEWS, K. H.; STEVENS, H. N. Wound healing dressings and drug delivery system: a review. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 97, n. 8, p. 2892-2923, 2008.
- BURKARTER, E. **Construção de imagens por padrões hidrofóbico/hidrofílico**. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, 2006.
- CALLISTER, W. D.; RETHWISCH, D.G. **Ciência e Engenharia de Matérias: uma introdução**. 9. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2016.
- CHATELET, C.; DAMOUR, O.; DOMARD, A. Influence of the degree of acetylation on some biological properties of chitosan films. **Biomaterials**, v. 22, p. 261-268, 2001.
- CISSÉ, M.; MONTET, D.; TAPIA, M. S.; LOISEAU, G.; DUCAMPCOLLIN, M. N. Influence of temperature and relative humidity on the immobilized lactoperoxidase system in a functional chitosan film. **Food hydrocolloids**, v. 28, n. 2, p. 361-366, 2012.
- CORDEIRO, C. M. S. **Desenvolvimento de filmes bioativos a partir do quitosano**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Alimentar) – Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, 2010.

COSTA, J. R. **A influência da temperatura na estrutura e molhabilidade de filmes finos**. Dissertação (mestrado em física) – Universidade do Estado de Santa Catarina, Joinville 2016.

DALEY, C. **Cuidando de Feridas**. São Paulo: Atheneu, 1996.

DALLAN, P. R. M. **Síntese e caracterização de membranas de quitosana para aplicação na regeneração de pele**. 2005. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2005.

DARMADJI, P.; IZUMIMOTO, M. Effect of chitosan in meat preservation. **Meat Science**, v. 38, n. 2, p. 243-254, 1994.

FERNANDES, L. L. **Produção e caracterização de membranas de quitosana e quitosana com sulfato de condroitina para aplicações biomédicas**. 2009. 63 f. Monografia (Departamento de Engenharia Metalúrgica e de Materiais) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

FULVIO, P. F. **Synthesis and characterization of ordered mesoporous inorganic nanocomposite materials**. Ohio, p. 210. 2009. Doctoral Thesis.

GARCIA, M. A.; PINOTTI, A.; ZARITZKYA, N. E. Physicochemical, water vapor barrier and mechanical properties of corn starch and chitosan composite films. **Starch/Stärke**, v. 58, p. 453-463, 2006.

GARCÍA, M. E.; DOMÍNGUES, C. G.; PÉREZ, J. J. C.; REBOLLO, R. R. F.; ADAME, J. A.; VÁZQUEZ, I. A.; MENDEZ, J. V. M.; RUIZ, L. A. M. Physical and structural characterisation of zein and chitosan edible films using nanotechnology tools. **International journal of biological macromolecules**, v. 61, p. 106-203, 2013.

GENNES, P.; BROCHARD-WYARD, F.; QUÉRÉ, D.: **Capillarity and Wetting Phenomena: Drops, Bubbles, Pearls, Waves**. New York, Springer-Verlag, 2003.

GUOZHONG, C. **Nanostructures and Nanomaterials: Synthesis, Properties and Applications**. Singapore: Imperial College Press, p. 433. ISBN 1-86094-415-9.

HALLIDAY, D.; RESNICK, R. **Fundamentos de Física: Mecânica**. 10. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2016.

HAMILTON, V.; YAN, Y.; RIGNEY, D.A. Characterization of chitosan films and affects on fibroblast cell attachment and proliferation. **Journal of materials Science: Materials in medicine**, v. 17, p: 1373-1381, 2006.

HERNÁNDEZ, M. A. Evaluación de Mesoporos y Caracterización de Arcillas del Estado de Puebla, México. **Revista Internacional de Contaminación Ambiental**, México, v. 4, n. 19, p. 183-190, 2003.

HOLLAUER, E. **Química Quântica**. Rio de Janeiro: LTC, 2007.

HORN, M. M. **Blendas e filmes de quitosana/amido de milho: estudo da influência da adição de polióis, oxidação do amido e razão amilose/amilopectina nas suas propriedades**. 2012. 147 f. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012.

HSU, S. H.; WHU, S. W. TSAI, C. Chitosan as scaffold materials: effects of molecular weight and degree of deacetylation. **Journal of Polymer Research**, v.11, p. 141-147, 2004.

JOHNSON, R. E.; DETTRE, R. H.: **Wettability: Wetting of Low-Energy Surfaces**. New York, Marcel Dekker, Inc, 1993.

KEHWALD, A. M. **Estudo da influência da energia livre superficial na molhabilidade e adesão de revestimentos à base de fluorsilanos**. 2009. 90 f. Dissertação (Mestrado) – Ciências Engenharia de materiais, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.

KIM, I-Y.; SEO, S-J.; MOON, H-S. Chitosan and its derivatives for tissue engineering applications. **Biotechnology advances**, v. 4, p. 1-21, 2008.

KUBIAK, K. J.; WILSON, M. C. T.; MATHIA, T. G.; CARVAL, P. Wettability versus roughness of engineering surfaces. **Wear**, v. 271, p. 523-528, 2011.

KUMAR, R. A review of chitin and chitosan applications. **Reactive and Functional Polymers**, v. 96, p. 1-27, 2000.

KURITA, K. Controlled functionalization of the polysaccharide chitin. **Progress in Polymer Science**, v. 26, p. 1921-1971, 2001.

LARANJEIRA, M. C. M.; DE FÁVERE, V. T. Quitosana: biopolímero funcional com potencial industrial biomédico. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 672-678, 2009.

LI, Y; GUO, X; LIN, P; FAN, C; SONG, Y. Preparation and functional properties of blends films of gliandins and chitosan. **Carbohydrate polymers**, v. 81, n. 2, p. 484-490, 2010.

LIMA, A. M. F.; ANDREANI, L.; SOLDI, V. Influência da adição de plastificante e do processo de reticulação na morfologia, absorção de água e propriedades mecânicas de filmes de alginato de sódio. **Química Nova**, v. 30, n. 4, p. 832-837, 2007.

MANDELBROT, B. **The fractal geometry of nature**. New York: W. H. Freeman and company, 1983. 468 p.

MARIAS, D. **Avaliação da tensão superficial do PVB E da PA-6**. Dissertação (mestrado em engenharia de materiais) – Universidade de São Paulo, SP, 2008.

MARTINS, G. A; DOMINGUES, O. **Estatística Geral e Aplicada**. São Paulo: Atlas S. A., 2011. 662 p.

MARTINS, J. T.; CERQUEIRA, M. A.; VICENTE, A. A. Influence of α -tocopherol on physicochemical properties of chitosan-based films. **Food hydrocolloids**, v. 27, n. 1, p. 220-227, 2012.

MATHUR, N. K.; NARANG, C.K. Chitin and Chitosan, Versatile Polysaccharides from Marine Animals. **Journal of Chemical Education**, Madison, v. 67, n. 11, p.938–942, 1990.

MATOS, R. S.; LOPES, G. C. L.; FERREIRA, N. S.; PINTO, E. P.; CARVALHO, J.C.T.; FIGUEIREDO, S. S.; OLIVEIRA, A.F.; ZAMORA, R. M. Superficial characterization of kefir biofilms associated with açai and cupuaçu extracts. **Arabian journal for Science and engineering**, v. 42, p.1-9, 2017.

MCHUGH, T. H; KROCHTA, J. M. Sorbitol- vs glycerol – plasticized whey protein edible films: integrated oxygen permeability and tensile property evaluation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 42, n. 4, p. 841-845, 1994.

MELO, R.; CONCI, A. Succolarity: defining a method to calculate this fractal measure. **International conference on systems, signals and image processing**, Rio de Janeiro, Brazil, p. 291-294, 2008.

MURADIAN, J. **Espectroscopia no infravermelho**. São Paulo: Universidade de São Paulo, Instituto de Química, 1980.

NUSSENZVEIG, H.M. **Curso de Física Básica: fluídos, oscilações, ondas e calor**. Rio de Janeiro: BLUCHER, 2003.

OLIVEIRA, L. R. **Modelagem bidimensional de hidrofobicidade e superhidrofobicidade em superfícies de pilares**. Dissertação (mestrado em física) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2010.

OLIVER, O.C.; PHARR, G.M. New improved technique for determining hardness and elastic modulus using load end displacement sensing indentation experiments. **Journal of Materials Research**, v.7, N. 6, P. 1564-1583, 1992.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R. **Introdução à Espectroscopia**. Tradução da 4ª ed. norte-americana. São Paulo: Cengage Learning, 2010.

PIRES, A. L. R., MORAES, A. M. Avaliação do efeito do pH e da temperatura de secagem nas características de curativos de quitosana e alginato contendo fosfato hidrogenado de zircônio, sódio e prata. **7º Congresso Latino Americano de Biomateriais e Órgãos Artificiais**, Natal, RN, p. 6-8, 2012.

PIRES, M. **Um novo método para calcular a entropia de topografias**. 2014. 27 f. Trabalho de conclusão de curso – Licenciatura em Física, Universidade Federal do Amapá, Macapá, 2014.

RAHMAT, N.; ABDULLAH, A. Z.; MOHAMED, A. R. Recent progress on innovative and potential technologies for glycerol transformation into fuel additives: A critical review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.14, p. 987-1000, 2010.

ROTTA, J. **Propriedades físico-químicas de soluções formadoras e de filmes de quitosana e hidroxipropilmetilcelulose**. 2008. 128 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.

SALCEDO, M. **Caracterização fractal da nanotextura superficial da folha de copaifera sp. Por microscopia de força atômica (AFM)**. 2016. 151 f. Dissertação (Mestrado) – Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Amapá, Macapá, 2016.

SALINAS, S.R.A. **Introdução a Física estatística**. 2 ed. São Paulo: Editora das Universidade de São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 2005. ISBN: 85-314-0386-3.

SANTOS, C. A. N. S. **Propriedades de filmes de quitosana: influência do grau de acetilação e da massa molecular do biopolímero**. 2006. 126 f. Dissertação (mestrado em química e qualidade de alimentos) – Universidade de Aveiro, Aveiro, 2006.

SANTOS, T. C.; MARQUES, A. P.; SILVA, S. S. In vitro evolution of the behaviour of human polymorphonuclear neutrophils in direct contact with chitosan-based membranes. **Journal of biotechnology**, v. 132, p. 218-226, 2007.

SHI, C.; ZHU, Y.; RAN, X. Therapeutic potential of chitosan and its derivatives in regenerative medicine. **Journal of surgical research**, v. 133, p. 185-192, 2006.

SHI, G.; CHEN, Y.; WAN, C.; YU, X.; FENG, T.; DING, Y. Study on the preparation of chitosan–alginate complex membrane and the effects on adhesion and activation of endothelial cells. **Applied Surface Science**, v. 255, p. 422-425, 2008.

SILVA, C. A. S. **Preparação e caracterização de filmes poliméricos a base de kefirana para aplicação como suporte para cultivo celular**. 2015. 83 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, 2015.

SILVA, G. P. DA; MACK, M.; CONTIERO, J. Glycerol: A promising and abundant carbon source for industrial microbiology. **Biotechnology Advances**, v. 27, p. 30-39, 2009.

SILVA, M. A. P. **Análise de superfície de filmes finos de polianilina depositados em diferentes substratos por microscopia de força atômica**. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, São Carlos, SP, 2002.

SILVA, S. S.; LUNA, S. M.; GOMES, M. E. Plasma surface modification of chitosan membranes: characterization and preliminary cell response studies. **Macromolecular Bioscience**, v. 8, p. 568-576, 2008.

SOUZA NETO, E.A.; PERIC, D.; OWEN, D.R J. **Computacional methods for plasticity: theory and applications**. Wiley, p. 814, 2008, ISBN: 978-0-470-69452-7.

STERGIOPOULOS, S., **Advanced Signal Processing Handbook**. CRC Press. 1999.

TSAI, H. S.; WANG, Y. Z. Properties of hydrophilic chitosan network membranes by introducing binary crosslink agentes. **Polymer Bulletin**, v. 60, p. 103-113, 2008.

URAGAMI, T.; TOKURA, S. **Material Science of Chitn and Chitosan**. Japan: Kodansha, 2006.

WANG, S. F. et al. Biopolymer chitosan/montmorillonite nanocomposites: preparation and characterization. **Polymer degradation and stability**, v. 90, n. 1, p. 123-131, 2005.

WANG, Z-X.; ZHUGE, J.; FANG, H.; PRIOR, B.A. Glycerol production by microbial fermentation: A review. **Biotechnology Advances**, v. 19, p. 201–223, 2001.

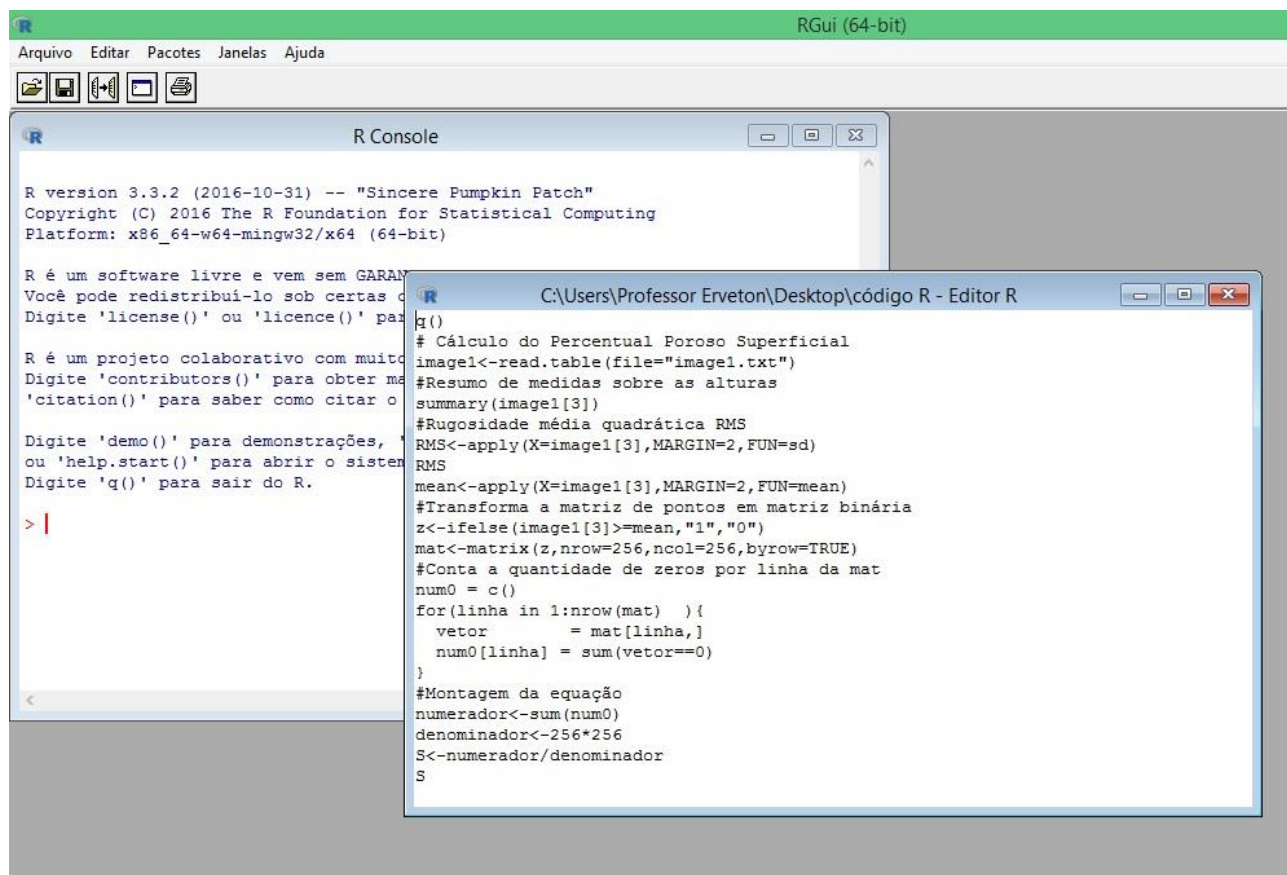
WARA, N. M. **Processing of Macroporous Ceramics Through Ceramic-Polymer Dispersion Methods**. 1996. p. 215. Thesis (Doctor of Philosophy) – University of Minnesota, Minnesota,1996.

ZANETTE, S. I. **Introdução à Microscopia de Força Atômica**. São Paulo: Livraria da Física, 2010. (Coleção Tópicos em Física, 08).

ZHENG, Z.; WEI, Y.; WANG, G.; AO, A. W. Q.; GONG, Y.; ZHANG, X. Surface properties of chitosan films modified with polycations and their effects on the behavior of PC12 cells. **Journal of Bioactive and Compatible Polymers**, v. 24, p. 63-82, 2009.

ZHONG, Y.; SONG, X.; LI, Y. Antimicrobial, physical and mechanical properties of kudzu starch-chitosan composite films as a function of acid solvent types. **Carbohydrate Polymers**, v. 84, n. 1, p. 335-342, 2011.

Apêndice 1 – Imagen do código do programa em Linguagem R produzido para o cálculo do Percenual Poroso Superficial



```

R version 3.3.2 (2016-10-31) -- "Sincere Pumpkin Patch"
Copyright (C) 2016 The R Foundation for Statistical Computing
Platform: x86_64-w64-mingw32/x64 (64-bit)

R é um software livre e vem sem GARANTIA.
Você pode redistribuí-lo sob certas condições.
Digite 'license()' ou 'licence()' para ver a licença.

R é um projeto colaborativo com muitos contribuidores.
Digite 'contributors()' para obter mais informações.
Digite 'citation()' para saber como citar o R.

Digite 'demo()' para demonstrações,
ou 'help.start()' para abrir o sistema de ajuda.
Digite 'q()' para sair do R.

> |

# Cálculo do Percentual Poroso Superficial
imagem1<-read.table(file="imagem1.txt")
#Resumo de medidas sobre as alturas
summary(imagem1[3])
#Rugosidade média quadrática RMS
RMS<-apply(X=imagem1[3],MARGIN=2,FUN=sd)
RMS
mean<-apply(X=imagem1[3],MARGIN=2,FUN=mean)
#Transforma a matriz de pontos em matriz binária
z<-ifelse (imagem1[3]>=mean,"1","0")
mat<-matrix(z,nrow=256,ncol=256,byrow=TRUE)
#Conta a quantidade de zeros por linha da mat
num0 = c()
for(linha in 1:nrow(mat) ){
  vetor      = mat[linha,]
  num0[linha] = sum(vetor==0)
}
#Montagem da equação
numerador<-sum(num0)
denominador<-256*256
S<-numerador/denominador
S
  
```

Fonte: do autor.