



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
Campus de São José do Rio Preto

Anna Carolina Rodrigues Santos Alves

**Síntese, Caracterização e Atividade Antimicrobiana de Filmes  
Biopoliméricos de Derivados de Quitosana**

São José do Rio Preto

2019

Anna Carolina Rodrigues Santos Alves

**Síntese, Caracterização e Atividade Antimicrobiana de Filmes  
Biopoliméricos de Derivados de Quitosana**

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Química, junto ao Programa de Pós-Graduação em Química, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Vera Ap. de O. Tiera

São José do Rio Preto

2019

A474s

Alves, Anna Carolina Rodrigues Santos

Síntese, caracterização e atividade antimicrobiana de filmes biopoliméricos de derivados de quitosana / Anna Carolina Rodrigues Santos Alves. -- São José do Rio Preto, 2019

111 f. : il., tabs., fotos

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto

Orientadora: Vera Aparecida de Oliveira Tiera

1. Quitosana. 2. Biomaterial. 3. Anfifílico. 4. Filmes. 5. Atividade antifúngica. I. Título.

Anna Carolina Rodrigues Santos Alves

**Síntese, Caracterização e Atividade Antimicrobiana de Filmes  
Biopoliméricos de Derivados de Quitosana.**

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Química, junto ao Programa de Pós-Graduação em Química, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Banca Examinadora:

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Vera Ap. de Oliveira Tiera  
UNESP – São José do Rio Preto  
Orientadora

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Maria Aparecida Mauro  
UNESP – São José do Rio Preto

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Iêda Aparecida Pastre Fertoni  
UNESP – São José do Rio Preto

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Carla Cristina Schmidt Cavalheiro  
IQSC- USP – São Carlos

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Fernanda Perpétua Casciotori  
UFScar – São Carlos

São José do Rio Preto

20 de setembro de 2019

*Dedico ao meu primo Marcelo, que inesperadamente foi morar ao lado de Deus durante a jornada desse trabalho, deixando uma saudade infinita em meu coração. Ele que sempre soube arrancar as minhas melhores gargalhadas, hoje tenho absoluta certeza, de que lá do céu ele sorri por essa conquista, a qual ele tanto me incentivou. Minha eterna saudade e amor!*

## AGRADECIMENTOS

A Deus pela minha vida, por ser minha fortaleza em todos os momentos da realização desse trabalho. Houve momentos tão difíceis em que tudo parecia estar errado, mas Ele cuidadosamente me amparava e mostrava o quão forte eu poderia ser e que eu jamais estaria sozinha diante de qualquer obstáculo.

À minha grande família, que não importa a distância, se faz presente em todos os momentos da minha vida. Em especial à minha mãe Cleide e meu pai Osmar, meus alicerces, as pessoas que mais amo e admiro. Obrigada por todos os sacrifícios que fizeram ao longo de toda vida para que eu e meus irmãos pudéssemos realizar nossos sonhos, obrigada por todo incentivo, pelo exemplo de conduta e honestidade que são base para mim, pelo apoio incondicional, pelo amor que me manteve firme na realização desse sonho mesmo diante de tantos obstáculos que juntos tivemos que enfrentar ao longo dessa jornada. Aos meus maiores presentes da vida, meus irmãos Vinicius e Vittor, que sempre me incentivaram, apoiaram e caminharam comigo. Sem vocês nada disso seria possível e nem faria sentido. Obrigada por serem meu porto seguro, eu amo vocês!

Ao meu marido e grande amor Fabio, pela paciência, cumplicidade e amor dedicados a mim que, principalmente nos momentos mais difíceis, me fortaleceram e impulsionaram à conclusão desse trabalho.

À minha orientadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Vera Tiera, por confiar a mim a realização deste trabalho, pela orientação, ensinamentos e pela parceria ao longo desses anos.

A todos que passaram pelo Laboratório de Biomateriais e Nanotecnologia (LBN) durante esses nove anos, desde a minha iniciação científica até a conclusão do doutorado, em especial a Me. Amanda Manchini, Me. Mirelle Takaki, Me. Vítor Freire, Me. André Martinez, Dr. Maicon Petrônio, Hemelen Amoroso, Dr<sup>a</sup>. Aline Lima, e Me. Grazieli Martins agradeço pela amizade, pela parceria, desabafos, e pelos desafios que enfrentamos juntos, muito obrigada!

Às minhas amigas desde a graduação, Dr<sup>a</sup>. Mariana Bastos, Dr<sup>a</sup>. Isabela Carreira, Bruna Borges e Carla Tukamoto, por estarem sempre comigo, me incentivarem, tornando essa jornada mais leve.

À Me. Laís Amado e Me. Mariana Garcia, pelo grande auxílio na realização dos experimentos de permeabilidade ao vapor de água e de propriedades óticas, obrigada por todos os ensinamentos compartilhados.

À Professora Dr<sup>a</sup>. Maria Aparecida Mauro, por ter permitido com que eu utilizasse os equipamentos do seu laboratório, para realização dos experimentos de atividades óticas e permeabilidade ao vapor de água.

À Professora Dr<sup>a</sup>. Célia Maria Landi Franco, por ter disponibilizado o Difratômetro de Raios X e à Flávia Villas Boas pela ajuda na operação do equipamento.

À Professora Dr<sup>a</sup>. Ana Carolina Conti e Silva, por disponibilizar o texturômetro e à técnica Alana pelo auxílio durante as análises.

Ao Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto (IBILCE-UNESP), por oferecer a infraestrutura necessária para execução deste projeto. E a todos os funcionários da UNESP, que direta ou indiretamente, foram essenciais para a conclusão desse trabalho.

Meu mais sincero obrigada.

*“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar.  
Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.*

***Santa Teresa de Calcutá*** (O segredo, 2019)

*“Senhor, fazei de mim um instrumento da Vossa paz.*

*Onde houver ódio, que eu leve o amor.*

*Onde houver ofensa, que eu leve o perdão.*

*Onde houver discórdia, que eu leve a união.*

*Onde houver dúvidas, que eu leve a fé.*

*Onde houver erro, que eu leve a verdade.*

*Onde houver desespero, que eu leve a esperança.*

*Onde houver tristeza, que eu leve a alegria.*

*Onde houver trevas, que eu leve a luz.*

*Ó Mestre, fazei que eu procure mais:*

*consolar, que ser consolado;*

*compreender, que ser compreendido;*

*amar, que ser amado.*

*Pois é dando que se recebe.*

*É perdoando que se é perdoado.*

*E é morrendo que se vive para a vida eterna”.*

***Oração de São Francisco de Assis*** (Canção Nova, 2019).

## RESUMO

O biopolímero quitosana apresenta propriedades biológicas favoráveis, incluindo caráter antioxidante, antimicrobiana, baixa toxicidade, biodegradabilidade, biocompatibilidade, ação anti-inflamatória e capacidade de formar filmes, o que a torna um material de grande interesse. Visando à melhoria das propriedades desse biomaterial, o presente trabalho teve como objetivo realizar a síntese e caracterização de derivados anfifílicos de quitosana com potencial para formação de filmes. Os derivados foram obtidos a partir de quitosana comercial ( $\text{CH}_C$ ) previamente desacetilada ( $\text{CH}_D$ ) e despolimerizada ( $\text{CH}_L$ ), que foram submetidos à reação com o cloridrato de 2-cloro-*N,N*-dietiletilamina. O derivado hidrofílico obtido (DEAE- $\text{CH}_L$ ) foi posteriormente modificado com o grupo dodecil aldeído por meio de reação de alquilação, resultando no derivado anfifílico de quitosana (DEAE- $\text{CH}_L$ -Dod). A massa molecular média foi determinada utilizando cromatografia de permeação em gel (CPG), e os valores obtidos foram de 208 kDa para  $\text{CH}_C$ , 143 kDa para  $\text{CH}_D$ , 11 kDa para  $\text{CH}_L$  e 14 kDa para DEAE- $\text{CH}_L$ . O grau de desacetilação e os graus de substituições pelos grupos DEAE e Dod foram determinados por meio da técnica de espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN  $^1\text{H}$ ). O grau de desacetilação da  $\text{CH}_C$  foi de 77% e da  $\text{CH}_D$  foi de 97%. Os graus de substituição por DEAE e Dod foram de 44 e 24%, respectivamente. Filmes de diferentes formulações dos polímeros foram produzidos com concentrações crescentes de dois agentes plastificantes, glicerol e sorbitol (5%, 10% e 20%) e foram caracterizados por suas propriedades estruturais, solubilidade, propriedades óticas, mecânicas, térmicas, permeabilidade ao vapor de água e antifúngicas. Por meio dos resultados obtidos, verificou-se que a composição química dos polímeros, a massa molecular e a presença de plastificantes influenciaram significativamente nas suas características e afetaram muito as propriedades mecânicas, espessura, cor e propriedades de barreira. O estudo antifúngico contra *Aspergillus flavus*, *Alternaria alternata*, *Alternaria solani* e *Penicillium expansum* mostraram que os filmes contendo os grupos DEAE e Dod exibiram maior atividade antifúngica que as quitosanas não modificadas. As propriedades mecânicas de filmes altamente solúveis foram melhoradas pelos plastificantes nas porcentagens de 5 e 10%, indicando esses derivados como potenciais candidatos para o revestimento de grãos e frutos de várias culturas.

**Palavras - chave:** quitosana, biomaterial, anfifílico, filmes, atividade antifúngica.

## ABSTRACT

Chitosan biopolymer has favorable biological characteristics, including antioxidant, antimicrobial characters, low toxicity, biodegradability, biocompatibility, anti-inflammatory action and film display ability, or makes it a material of great interest. Aiming at improving the properties of this biomaterial, the present work aimed to characterize and characterize amphiphilic chitosan compounds with potential for film formation. The derivatives were taken from deacetylated ( $\text{CH}_D$ ) and depolymerized ( $\text{CH}_L$ ) commercial chitosan ( $\text{CH}_C$ ), which were reacted with 2-chloro-N,N-diethylethylamine hydrochloride. The hydrophilic derivative used (DEAE- $\text{CH}_L$ ) was further modified with the dodecyl aldehyde group by alkylation reaction, resulting in no amphiphilic chitosan derivative (DEAE- $\text{CH}_L$ -Dod). An average molecular weight gel permeation chromatography (CPG) was used, and the values were 208 kDa for  $\text{CH}_C$ , 143 kDa for  $\text{CH}_D$ , 11 kDa for  $\text{CH}_L$  and 14 kDa for DEAE- $\text{CH}_L$ . The degree of deacetylation and the degree of substitution of the DEAE and Dod groups were used by the hydrogen nuclear magnetic resonance spectroscopy ( $^1\text{H}$  NMR) technique. The degree of deacetylation of  $\text{CH}_C$  was 77% and the  $\text{CH}_D$  was 97%. The degrees of substitution of DEAE and Dod were 44 and 24%, respectively. Films of different polymer formulations were used with crescents of two plasticizing agents, glycerol and sorbitol (5%, 10% and 20%) and were characterized by their specific characteristics (IV and XRD), solubility, optical, mechanical, thermal properties. water vapor and antifungal permeability. Through the obtained results, it was verified that the chemical composition of the polymers, the molecular mass and the presence of plasticizers influenced the characteristics and greatly affect the mechanical characteristics, thickness, color and substance use. The antifungal study against *Aspergillus flavus*, *Alternaria alternata*, *Alternaria solani*, and *Penicillium expansum* shows that the films published by the DEAE and Dod groups exhibited higher antifungal activity than as unmodified chitosans. As mechanical properties of highly soluble films have been improved by plasticizers at 5 and 10% percentages, these rates are applied as a requirement for the coating of grains and fruits of various crops.

**Keywords:** chitosan, biomaterial, amphiphilic, films, antifungal activity.

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                                                                   |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1</b> - Representação da estrutura idealizada da quitina e da celulose.....                                                                                                                             | 21 |
| <b>Figura 2</b> - Representação da estrutura idealizada da quitina ( $x > y$ ) e quitosana ( $y \geq x$ ).....                                                                                                    | 22 |
| <b>Figura 3</b> - Representação esquemática da estrutura química do glicerol.....                                                                                                                                 | 26 |
| <b>Figura 4</b> - Representação esquemática da estrutura química do sorbitol.....                                                                                                                                 | 27 |
| <b>Figura 5</b> - Esquema ilustrativo da rota de sínteses para obtenção dos derivados de quitosana e suas respectivas caracterizações.....                                                                        | 30 |
| <b>Figura 6</b> - Quitosana em pó obtida após o processo de desacetilação.....                                                                                                                                    | 31 |
| <b>Figura 7</b> - Preparação dos filmes biopoliméricos.....                                                                                                                                                       | 35 |
| <b>Figura 8</b> - Porta- amostra contendo filme de quitosana para análise de DRX.....                                                                                                                             | 37 |
| <b>Figura 9</b> - À esquerda, filme fixado na cápsula de alumínio contendo $\text{CaCl}_2$ anidro e à direita as cápsulas dispostas nos dessecadores antes de serem armazenados na BOD a $25^\circ\text{C}$ ..... | 38 |
| <b>Figura 10</b> - Corpo de prova após o rompimento durante a realização do ensaio de tração.....                                                                                                                 | 39 |
| <b>Figura 11</b> - Solução de BDA utilizada para crescimento dos fungos.....                                                                                                                                      | 41 |
| <b>Figura 12</b> - Esquema da reação de desacetilação da quitosana comercial.....                                                                                                                                 | 44 |
| <b>Figura 13</b> - Espectro de RMN $^1\text{H}$ da quitosana comercial ( $\text{CH}_\text{C}$ ) em $\text{D}_2\text{O}/ \text{DCl}$ a $70^\circ\text{C}$ .....                                                    | 45 |
| <b>Figura 14</b> - Espectro de RMN $^1\text{H}$ da quitosana desacetilada ( $\text{CH}_\text{D}$ ) em $\text{D}_2\text{O}/ \text{DCl}$ a $70^\circ\text{C}$ .....                                                 | 45 |
| <b>Figura 15</b> - Esquema da reação de despolimerização da quitosana.....                                                                                                                                        | 46 |
| <b>Figura 16</b> - Esquema da reação de síntese do derivado hidrofílico de quitosana ( $\text{DEAE-CH}_\text{L}$ ).....                                                                                           | 47 |
| <b>Figura 17</b> - Esquema da reação de síntese do derivado anfifílico de quitosana ( $\text{DEAE-CH}_\text{L}\text{-Dod}$ ).....                                                                                 | 47 |
| <b>Figura 18</b> - Fórmula estrutural idealizada do derivado anfifílico de quitosana ( $\text{DEAE-CH}_\text{L}\text{-Dod}$ ).....                                                                                | 48 |
| <b>Figura 19</b> - Espectro de RMN $^1\text{H}$ da quitosana modificada com o grupo hidrofílico DEAE ( $\text{DEAE-CH}_\text{L}$ ) em $\text{D}_2\text{O}/ \text{DCl}$ a $70^\circ\text{C}$ .....                 | 49 |
| <b>Figura 20</b> - Espectro de RMN $^1\text{H}$ pra o derivado anfifílico de quitosana ( $\text{DEAE-CH}_\text{L}\text{-Dod}$ ) em $\text{D}_2\text{O}/ \text{DCl}$ a $70^\circ\text{C}$ .....                    | 50 |

|                                                                                                                                                                                                                 |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 21</b> - Filme biopolimérico obtido a partir de quitosana.....                                                                                                                                        | 52 |
| <b>Figura 22</b> - Espectros na região do infravermelho para os filmes de quitosana e seus derivados sintetizados.....                                                                                          | 53 |
| <b>Figura 23</b> - Difrátogramas dos filmes de CH <sub>C</sub> , CH <sub>D</sub> , CH <sub>L</sub> , DEAE-CH <sub>L</sub> , DEAE-CH <sub>L</sub> -Dod.....                                                      | 55 |
| <b>Figura 24</b> - Difrátogramas dos filmes de CH <sub>C</sub> contendo glicerol (a) e sorbitol (b) na formulação.....                                                                                          | 56 |
| <b>Figura 25</b> - Difrátogramas dos filmes de (a) DEAE-CH <sub>L</sub> e (b) DEAE-CH <sub>L</sub> -Dod contendo glicerol na formulação.....                                                                    | 57 |
| <b>Figura 26</b> - Percentual de solubilidade dos filmes de quitosana produzidos sem agentes plastificantes na formulação (a) e aspecto visual dos filmes ao término do ensaio de solubilidade em água (b)..... | 59 |
| <b>Figura 27</b> - Efeito da porcentagem de plastificante na solubilidade em água de filmes preparados com CH <sub>L</sub> (a) e seus derivados DEAE-CH <sub>L</sub> (b) e DEAE-CH <sub>L</sub> -Dod (c).....   | 60 |
| <b>Figura 28</b> - Efeito da porcentagem de plastificante na solubilidade em água de filmes preparados com CH <sub>C</sub> (a) e CH <sub>D</sub> (b).....                                                       | 62 |
| <b>Figura 29</b> - Filmes de CH <sub>C</sub> (a), CH <sub>D</sub> (b), CH <sub>L</sub> (c), DEAE-CH <sub>L</sub> (d) e DEAE-CH <sub>L</sub> -Dod (e).....                                                       | 63 |
| <b>Figura 30</b> - Escala de cores CIELAB e representação dos parâmetros a* e b* dos filmes de quitosana em plano cartesiano.....                                                                               | 64 |
| <b>Figura 31</b> - Opacidade em função das porcentagens de glicerol (a) e sorbitol (b) para os filmes preparados com quitosana e seus derivados.....                                                            | 65 |
| <b>Figura 32</b> - Permeabilidade ao vapor de água e espessura dos filmes preparados com quitosana e seus derivados. (a) sem plastificante e com porcentagens crescentes de (b) glicerol e (c) sorbitol.....    | 69 |
| <b>Figura 33</b> - Tensão máxima dos filmes de quitosana preparados com concentrações crescentes de glicerol (a) e sorbitol (b).....                                                                            | 72 |
| <b>Figura 34</b> - Módulo de elasticidade dos filmes de quitosana preparados com concentrações crescentes de glicerol (a) e sorbitol (b).....                                                                   | 74 |
| <b>Figura 35</b> - Deformação na ruptura de filmes preparados com quitosana e seus derivados, aumentando as porcentagens de (a) glicerol e (b) sorbitol.....                                                    | 76 |
| <b>Figura 36</b> - Curvas de TG-DTG para os filmes de quitosana comercial (CH <sub>C</sub> ), quitosana desacetilada (CH <sub>D</sub> ) e quitosana despolimerizada (CH <sub>L</sub> ).....                     | 78 |

|                                                                                                                                                                                                                                        |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 37</b> - Curvas de TG-DTG para os filmes de quitosana despolimerizada (CH <sub>L</sub> ) e derivados de quitosana DEAE-CH <sub>L</sub> e DEAE-CH <sub>L</sub> -Dod.....                                                      | 79 |
| <b>Figura 38</b> - Efeito da concentração no índice de inibição do fungo <i>Aspergillus flavus</i> .....                                                                                                                               | 81 |
| <b>Figura 39</b> - Atividades antifúngicas comparativas de quitosana de baixas massas moleculares contra <i>Alternaria alternata</i> , <i>Alternaria solani</i> e <i>Penicillium expansum</i> .....                                    | 82 |
| <b>Figura 40</b> - Viabilidade celular de células fibroblastos 3T3/NIH na presença dos polímeros.....                                                                                                                                  | 84 |
| <b>Figura 41</b> - Aspecto visual após 15 dias de armazenamento à 25 °C. Tomate à esquerda foi revestido com filme PVC e à direita o tomate que foi revestido com derivado anfifílico de quitosana (DEAE-CH <sub>L</sub> -Dod).....    | 85 |
| <b>Figura 42</b> - Aspecto visual após 15 dias de armazenamento à 25 °C. À esquerda maçã que foi revestida com filme PVC e à direita a maçã que foi revestida com derivado anfifílico de quitosana (DEAE-CH <sub>L</sub> -Dod).....    | 85 |
| <b>Figura 43</b> - Aspecto visual após 5 dias de armazenamento à 25 °C. À esquerda banana que foi revestida com filme PVC e à direita a banana que foi revestida com derivado anfifílico de quitosana (DEAE-CH <sub>L</sub> -Dod)..... | 86 |

## LISTA DE TABELAS

|                                                                                                                                                                                               |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabela 1</b> - Reagentes utilizados no desenvolvimento do trabalho.....                                                                                                                    | 29 |
| <b>Tabela 2</b> - Teor dos plastificantes, glicerol e sorbitol utilizados no preparo dos filmes.....                                                                                          | 35 |
| <b>Tabela 3</b> - Relação entre a massa do polímero e a concentração das soluções de polímeros utilizadas nos ensaios microbiológicos.....                                                    | 40 |
| <b>Tabela 4</b> - Propriedades da quitosana e seus derivados.....                                                                                                                             | 51 |
| <b>Tabela 5</b> - Propriedades de cor dos filmes de quitosana e seus derivados.....                                                                                                           | 66 |
| <b>Tabela 6</b> - Permeabilidade média ao vapor de água dos filmes de quitosana preparados com porcentagens crescentes de glicerol e sorbitol, acondicionados em umidade relativa de 53%..... | 70 |
| <b>Tabela 7</b> - Espessura média dos filmes de quitosana preparados com porcentagens crescentes de glicerol e sorbitol a uma umidade relativa de 53%.....                                    | 70 |
| <b>Tabela 8</b> - Valores de temperatura máxima de degradação, porcentagens de massa perdida e porcentagens de massa residual dos polímeros.....                                              | 80 |
| <b>Tabela 9</b> - Valores dos índices de inibição (%) obtidos para os diferentes derivados de quitosana testados contra o fungo <i>Aspergillus flavus</i> .....                               | 81 |

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

BDA - batata dextrose agar

CH<sub>C</sub> - quitosana comercial

CH<sub>D</sub> - quitosana desacetilada

CH<sub>L</sub> - quitosana degradada

CPG - cromatografia de permeação em gel

DEAE - cloridrato de 2-cloro-*N,N*-dietiletilamina

DEAE-CH<sub>L</sub> - quitosana com dietiletilamina (derivado hidrofílico)

DEAE-CH<sub>L</sub>-Dod - quitosana com dietiletilamina e dodecil ( derivado anfifílico)

Dod - dodecil aldeído

DRX - difração de raio-X

DTG - análise térmica diferencial

Embrapa - empresa brasileira de pesquisa agropecuária

GD - grau de desacetilação

GS<sub>Dod</sub> - grau de substituição por grupos dodecila

GS<sub>DEAE</sub> - grau de substituição por grupos DEAE

IV - espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier

M<sub>n</sub> - massa molecular numérica média

M<sub>w</sub> - massa molecular ponderal média

Pdi - polidispersividade

PVA - permeabilidade ao vapor de água

RMN <sup>1</sup>H - Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

TG - análise termogravimétrica

UR - umidade relativa

## SUMÁRIO

|                                                                                              |           |
|----------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1 INTRODUÇÃO.....</b>                                                                     | <b>19</b> |
| 1.1 QUITINA E QUITOSANA.....                                                                 | 21        |
| 1.2 A QUITOSANA NO DESENVOLVIMENTO DE BIOMATERIAIS.....                                      | 23        |
| 1.3 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA QUITOSANA.....                                               | 24        |
| 1.4 FILMES BIOPOLIMÉRICOS.....                                                               | 25        |
| <b>2 OBJETIVOS.....</b>                                                                      | <b>28</b> |
| 2.1 OBJETIVO GERAL.....                                                                      | 28        |
| 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....                                                               | 28        |
| <b>3 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>                                                            | <b>29</b> |
| 3.1 REAGENTES.....                                                                           | 29        |
| 3.2 SÍNTESES DOS DERIVADOS DE QUITOSANA.....                                                 | 29        |
| 3.2.1 Reação de desacetilação da quitosana comercial.....                                    | 31        |
| 3.2.2 Reação de despolimerização da quitosana desacetilada.....                              | 31        |
| 3.2.3 Síntese do derivado hidrofílico de quitosana.....                                      | 32        |
| 3.2.4 Síntese do derivado anfifílico de quitosana.....                                       | 32        |
| 3.3 CARACTERIZAÇÃO DOS POLÍMEROS.....                                                        | 33        |
| 3.3.1 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio.....                     | 33        |
| 3.3.2 Determinação da massa molecular média por cromatografia de permeação em gel (CPG)..... | 33        |
| 3.3.3 Ensaio de Viabilidade Celular.....                                                     | 34        |
| 3.4 FILMES BIOPOLIMÉRICOS DE QUITOSANA.....                                                  | 35        |
| 3.4.1 Preparo das soluções filmogênicas.....                                                 | 35        |
| 3.5 CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES.....                                                           | 36        |
| 3.5.1 Armazenamento e Espessura dos filmes.....                                              | 36        |
| 3.5.2 Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (IV).....        | 36        |
| 3.5.3 Análise por difração de raios-X (DRX).....                                             | 36        |
| 3.5.4 Solubilidade em água.....                                                              | 37        |
| 3.5.5 Permeabilidade ao vapor de água (PVA).....                                             | 37        |
| 3.5.6 Propriedades mecânicas.....                                                            | 38        |
| 3.5.7 Ensaio de cor e Opacidade.....                                                         | 39        |

|                                                                                                                                                                                                       |           |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.5.8 Análise Termogravimétrica (TG).....                                                                                                                                                             | 40        |
| 3.6 ENSAIOS MICROBIOLÓGICOS.....                                                                                                                                                                      | 40        |
| 3.6.1 Atividade antimicrobiana das soluções de quitosana.....                                                                                                                                         | 40        |
| 3.6.2 Determinação do índice de inibição do crescimento fúngico.....                                                                                                                                  | 42        |
| 3.6.3 Atividade antimicrobiana de filmes de quitosana.....                                                                                                                                            | 42        |
| 3.7 APLICAÇÃO DOS FILMES BIOPOLIMÉRICOS COMO REVESTIMENTO DE ALIMENTOS.....                                                                                                                           | 43        |
| 3.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....                                                                                                                                                                        | 43        |
| <b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>                                                                                                                                                                  | <b>43</b> |
| 4.1 CARACTERIZAÇÃO DA QUITOSANA E DE SEUS DERIVADOS.....                                                                                                                                              | 43        |
| 4.1.1 Reação de desacetilação da quitosana comercial.....                                                                                                                                             | 43        |
| 4.1.2 Determinação do grau de desacetilação da quitosana por meio de espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio.....                                                               | 44        |
| 4.1.3 Reação de despolimerização da quitosana desacetilada.....                                                                                                                                       | 46        |
| 4.1.4 Reação para obtenção do derivado hidrofílico de quitosana.....                                                                                                                                  | 47        |
| 4.1.5 Reação para obtenção do derivado anfifílico de quitosana.....                                                                                                                                   | 47        |
| 4.1.6 Determinação do grau de substituição por grupos DEAE e dodecila dos derivados de quitosana.....                                                                                                 | 48        |
| 4.1.7 Determinação da massa molecular média dos polímeros por CPG.....                                                                                                                                | 51        |
| 4.2 CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES BIOPOLIMÉRICOS.....                                                                                                                                                     | 52        |
| 4.2.1 Espessura e aparência dos filmes.....                                                                                                                                                           | 52        |
| 4.2.2 Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier.....                                                                                                                      | 53        |
| 4.2.3 Difração de raios-X.....                                                                                                                                                                        | 54        |
| 4.2.4 Solubilidade em água.....                                                                                                                                                                       | 58        |
| 4.2.5 Ensaio de cor e Opacidade.....                                                                                                                                                                  | 63        |
| 4.2.6 Permeabilidade ao vapor de água.....                                                                                                                                                            | 67        |
| 4.2.7 Propriedades mecânicas.....                                                                                                                                                                     | 71        |
| 4.2.8 Análise Termogravimétrica.....                                                                                                                                                                  | 76        |
| 4.3 ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....                                                                                                                                                           | 80        |
| 4.3.1 Avaliação do efeito da concentração da quitosana e dos derivados na inibição do crescimento do fungo <i>Aspergillus flavus</i> .....                                                            | 80        |
| 4.3.2 Avaliação do efeito da concentração da quitosana e dos derivados na inibição do crescimento do fungo <i>Alternaria solani</i> , <i>Alternaria alternata</i> e <i>Penicillium expansum</i> ..... | 82        |

|                                                                       |     |
|-----------------------------------------------------------------------|-----|
| 4.4 ESTUDO DA VIABILIDADE CELULAR: CITOTOXICIDADE DOS POLÍMEROS.....  | 83  |
| 4.5 ANÁLISE QUALITATIVA DAS SOLUÇÕES FILMOGÊNICAS EM FRUTOS.....      | 85  |
| 5 CONCLUSÃO.....                                                      | 87  |
| 6 DESTINAÇÃO DOS RESÍDUOS GERADOS NO DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO..... | 88  |
| 7 REFERÊNCIAS.....                                                    | 89  |
| APÊNDICE A - Rendimentos das sínteses.....                            | 99  |
| APÊNDICE B - Curva analítica e cromatogramas de CPG.....              | 100 |
| APÊNDICE C - Espectros na região do infravermelho para os filmes..... | 101 |
| APÊNDICE D - Solubilidade em água dos filmes.....                     | 106 |
| APÊNDICE E - Ganho de massa em função do tempo.....                   | 107 |

## 1 INTRODUÇÃO

Os produtos alimentícios estão sujeitos à contaminação por fungos e bactérias, causando reações indesejáveis que prejudicam as propriedades de sabor, odor, cor e textura, resultando em produtos de baixa qualidade sensorial e inadequados para consumo. Em alimentos embalados, por exemplo, a contaminação tem um impacto significativo na qualidade, que depende de uma variedade de fatores intrínsecos e extrínsecos (LUCERA et al., 2012). Para aumentar a segurança e o prazo de validade de alimentos prontos para consumo, os aditivos sintéticos têm sido amplamente utilizados. No entanto, eles gradualmente estão perdendo participação de mercado devido às preocupações com as consequências para a saúde. Nesse sentido, a busca por produtos que sejam ecologicamente funcionais e economicamente viáveis tem impulsionado as pesquisas sobre compostos biodegradáveis com potencial antimicrobiano. Os aditivos naturais ou semissintéticos para conservação de alimentos foram desenvolvidos para impedir o crescimento de patógenos, garantindo um diferencial de qualidade e apoiando a expansão do mercado (SIRIPATRAWAN, VITCHAYAKITTI, 2016; FLORES-HERNÁNDEZ et al., 2014). Em particular, a quitosana tem sido considerada um potencial conservante para produtos alimentícios devido à sua atividade antimicrobiana e outras propriedades notáveis, como a biodegradabilidade e seu caráter não tóxico. A quitosana também tem a capacidade de formar filmes que podem ser usados para melhorar a qualidade dos alimentos e o prazo de validade dos mesmos (TAVARIA et al., 2013; VERLEE, MINCKE, STEVENS, 2017). Por exemplo, ela tem sido utilizada como um filme comestível para a proteção de sementes (SILVA-CASTRO, 2018) e também em produtos alimentares frescos (SARTORI, MENEGALLI, 2016) e seu derivado carboximetil comercializado como Nutrasave® foi recentemente lançado como um revestimento inovador para frutas frescas (ERKMEN, BARAZI, 2018).

A atividade antimicrobiana da quitosana tem sido relatada contra diferentes microrganismos, como bactérias, fungos e leveduras (XING et al., 2015). Embora a quitosana possua propriedades favoráveis a serem empregues no campo de proteção de alimentos, uma de suas limitações é a baixa solubilidade em pH neutro devido ao pKa de seus grupos amina (6,2 - 6,4). Além disso, os filmes preparados a partir de uma solução de quitosana geralmente não possuem propriedades apropriadas, portanto, durante o processo e dependendo da aplicação pretendida, podem ser necessários plastificantes ou agentes de reticulação para melhorar suas propriedades mecânicas e de

formação de filme (RODRÍGUEZ-NÚÑES et al., 2014; GAUDIN et al., 2000). Para superar essas limitações, a modificação química da quitosana é uma alternativa que pode fornecer as propriedades necessárias, bem como aumentar a ação antifúngica desse polissacarídeo. A inserção de grupos variados na cadeia polimérica da quitosana pode modificar suas propriedades físico-químicas, aumentando a solubilidade e a atividade antimicrobiana contra fungos e bactérias patogênicos de plantas e animais (YANG et al., 2018). Estudo realizado por Xing e colaboradores (2016), no qual foi utilizada uma quitosana modificada com oleoyl, demonstrou um aumento dos índices de inibição em ensaios realizados contra os fungos *Nigrospora sphaerica*, *Botryosphaeria dothidea*, *Nigrospora oryzae*, *Alternaria tenuissima*, *Gibberella seae* e *Fusarium culmorum*. Outras abordagens envolvendo a modificação utilizando pequenas moléculas (SOUZA et al., 2015), íons metálicos (IL'INAA et al., 2017), argilas (CASARIEGO et al., 2009), óleos (LI et al., 2019) e outros aditivos (BAJIC et al., 2019) às formulações também são frequentemente utilizadas para melhorar as propriedades mecânicas e a atividade antimicrobiana dos filmes.

Estudos anteriores realizados pelo laboratório de Biomateriais e Nanotecnologia (LBN) – IBILCE/UNESP mostraram que os derivados anfifílicos de quitosana apresentaram excelente atividade inibitória contra os fungos *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*. Os derivados substituídos com conteúdos variados de grupos dodecila e grupos hidrofílicos como o propiltrimetilamônio (VIEGAS DE SOUZA et al., 2013), pentiltrimetilamônio (TAKAKI et al., 2013) e dietilaminoetil (GABRIEL, TIERA, DE OLIVEIRA TIERA, 2015) apresentaram altos índices de inibição contra esses fungos. Além disso, a atividade antifúngica desses polímeros anfifílicos demonstrou ser fortemente dependente da massa molecular, do conteúdo hidrofóbico e da concentração dos polímeros. Desta forma, para realização do presente trabalho, foi levantada a hipótese de que derivados anfifílicos de quitosana de baixa massa molecular, obtidos a partir de quitosana poderiam ser usados para formar filmes com atividade antimicrobiana melhorada contra alguns fungos comuns e para tanto, um derivado com baixa massa molecular ( $M_w$ ) e contendo grupos DEAE e dodecila foi selecionado devido à sua alta atividade contra os fungos do gênero *Aspergillus* (GABRIEL, TIERA, DE OLIVEIRA TIERA, 2015; DIAS et al., 2018).

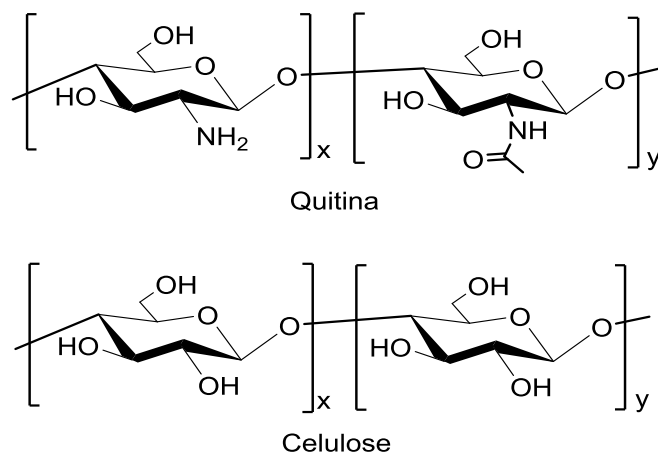
Nesse contexto, realizou-se um estudo comparativo utilizando quitosana de diferentes  $M_w$  para a preparação de filmes, com o objetivo de investigar as propriedades do filme e sua ação antifúngica contra os fungos *Aspergillus flavus*, *Alternaria solani*,

*Alternaria alternata* e *Penicillium expansum*. Os filmes para os ensaios *in vitro* foram preparados por *casting*, que consiste em uma técnica bastante simples na qual a formação do filme se consolida pela evaporação do solvente sobre uma superfície apolar plana (ACEVEDO-FANI et al., 2015; VAN DEN BROEK et al., 2015). Para que os filmes sejam aplicados em embalagem ou como coberturas para alimentos, é necessário o conhecimento de suas propriedades físico-químicas. Geralmente são adicionados agentes plastificantes aos filmes à base de polissacarídeos com o objetivo de diminuir a interação entre as cadeias poliméricas e assim reduzir a fragilidade, o que impede determinadas aplicações. Assim, o efeito de diferentes quantidades de agentes plastificantes, como o glicerol e o sorbitol, também foram avaliados com o objetivo de ajustar as propriedades dos filmes e também de suas possíveis aplicações.

### 1.1 QUITINA E QUITOSANA

A quitina é um polissacarídeo de origem animal encontrado amplamente na natureza, sendo o segundo mais abundante, inferior apenas em relação à celulose e é caracterizado por uma estrutura fibrosa. Encontra-se presente na parede celular de vários fungos e é o principal componente estrutural do exoesqueleto de artrópodes, insetos e crustáceos, fornecendo suporte e sustentação (CAMPANA-FILHO et al., 2007). A estrutura química da quitina é semelhante à celulose, tendo como diferença um grupo hidroxila em cada monômero, substituindo os grupos amina e acetamida da quitina (Figura 1).

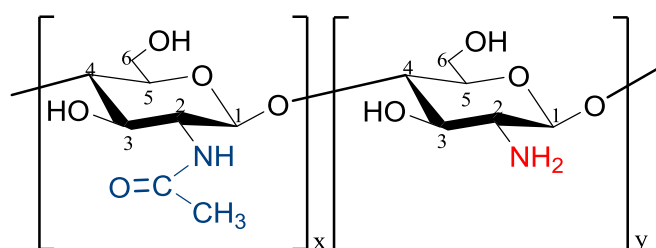
**Figura 1** - Representação da estrutura idealizada da quitina e da celulose.



Fonte: Elaborado pela autora.

A quitina é o precursor direto da quitosana, sendo a reação de hidrólise básica da quitina, o procedimento mais utilizado para essa obtenção. Ambas são constituídas por monômeros de 2-acetamido-2-deoxi-D-glicopirranose e 2-amino-2-deoxi-D-glicopirranose, unidos por ligações glicosídicas de configuração  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4), sendo que o diferencial entre esses polímeros está na proporção entre essas unidades (Figura 2), uma vez que na quitina as unidades acetamida estão em maior quantidade, enquanto que na quitosana os grupos amina predominam (pelo menos 50 - 60%), consequentemente uma distinção entre quitina e quitosana se dá com base no grau de desacetilação (RAAFAT e SAHL, 2009). A desacetilação total da quitina raramente é realizada, uma vez que, para esse fato ocorra, faz-se necessária a realização de sucessivas reações de hidrólise básica, podendo resultar numa despolimerização da cadeia (CAMPANA-FILHO et al., 2007).

**Figura 2** - Representação da estrutura idealizada da quitina ( $x > y$ ) e quitosana ( $y \geq x$ ).



Fonte: Elaborado pela autora.

A solubilidade é o principal fator que limita a utilização da quitina e é o que permite a distinção entre os dois polímeros, pois a quitina apresenta-se insolúvel em soluções aquosas e na maioria dos solventes orgânicos convencionais, enquanto a quitosana embora também seja insolúvel em água, apresenta-se solúvel em soluções de acidez moderada (ácido clorídrico, ácido fórmico e ácido acético) e a dissolução se dá pela protonação dos grupos amina presentes na estrutura da quitosana em meio ácido ( $-\text{NH}_3^+$ ) (VARNA et al., 2003). A quitosana é um polímero versátil, pois apresenta sítios reativos em sua estrutura (grupos amina ligados ao C2 e hidroxilas ligadas aos C3 e C6 dos monômeros) que possibilita a realização de modificações estruturais por meio de reações químicas para inserção de novas moléculas, resultando em um maior grau de solubilidade e ampliando sua variedade de aplicações (KUMAR et al., 2000). A quitosana é caracterizada principalmente com base em seu grau de desacetilação (GD) e pela sua massa molecular ( $M_w$ ). Comercialmente, a quitosana encontra-se disponível

com aproximadamente 80% de unidades desacetiladas e massas moleculares variando entre 100 e 1000 kDa. Não existe um padrão específico para definir  $M_w$ , mas é aceito que  $M_w$  abaixo de 50 kDa são consideradas quitosanas de baixa massa molecular, enquanto que quitosanas de média massa molecular são as que se encontram com  $M_w$  no intervalo de 50 - 150 kDa e acima de 150 kDa considera-se como sendo quitosana de alta massa molecular (GOY, BRITTO, ASSIS, 2009).

A aplicação deste biopolímero abrange diversas áreas e diferentes usos tais como: tratamento de água (como agente floculante para clarificação, remoção de íons metálicos), na agricultura (adubo para as plantas e mecanismos defensivos), na indústria de cosméticos (esfoliante para a pele), na indústria de alimentos (embalagens, fungicida e bactericida), na indústria farmacêutica (controle de colesterol, agente cicatrizante), na área biomédica (liberação controlada de fármacos, reconstrução óssea) (AZEVEDO et al., 2007).

## 1.2 A QUITOSANA NO DESENVOLVIMENTO DE BIOMATERIAIS

Para que um determinado material seja considerado um biomaterial, este deve apresentar como característica imprescindível, a biocompatibilidade, ou seja, deve exercer a função a qual foi destinado ocasionando o mínimo de reações inflamatórias ou tóxicas possíveis (WILLIAMS, 1999). Os polímeros biodegradáveis vêm se destacando em estudos visando diferentes aplicações tanto no meio ambiente quanto em sistemas biológicos, visto às inúmeras vantagens de se utilizar um polímero de origem natural em substituição a outros materiais que causam acentuados impactos ao ambiente. Em particular ressalta-se o uso de quitosana como biomaterial em diversas áreas, por se tratar de um polímero que apresenta propriedades biológicas favoráveis, incluindo caráter antioxidante, antimicrobiano, baixa toxicidade, biodegradabilidade, biocompatibilidade, ação anti-inflamatória e capacidade de formar filmes, o que a torna um material de grande interesse (AZEVEDO et al., 2007). Estudos envolvendo a aplicação de quitosana vêm se destacando no meio científico a medida com que cresce o conhecimento a respeito de sua funcionalidade em diversas áreas e sua ampla aplicabilidade torna-se ainda maior considerando as diferentes formas nas quais ela pode ser utilizada, como por exemplo, soluções, filmes, géis e nanopartículas (CAMPANA-FILHO et al., 2007).

### 1.3 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA QUITOSANA

A quitosana se tornou alvo de muito interesse na comunidade científica e tem sido aplicada em diversas pesquisas como agente antimicrobiano contra uma vasta gama de microrganismos, tais como, algas, bactérias, leveduras e fungos em estudos *in vivo* e *in vitro*, sendo utilizada tanto como solução, quanto na forma de filmes (TAVARIA et al., 2013). Porém, com o crescimento de estudos envolvendo este polissacarídeo, torna-se imprescindível compreender fatores intrínsecos e extrínsecos que possa afetar sua atividade antimicrobiana (massa molecular, viscosidade, força iônica, concentração, pH, temperatura, entre outros.) e os possíveis mecanismos de ação, visando uma melhor compreensão quanto ao seu potencial antimicrobiano.

Há diversos estudos descritos na literatura que buscam compreender a atividade antimicrobiana da quitosana contra diferentes microrganismos e embora ainda não esteja definido um mecanismo exato para essa atividade, na literatura científica é possível encontrar a elucidação de alguns modelos para tentar compreender a interação que ocorre entre o polímero e o microrganismo alvo. O modelo que mais é abordado pelos pesquisadores, mostra as interações eletrostáticas entre o polímero, com seus grupos positivamente carregados ( $-\text{NH}_3^+$ ), e as moléculas com resíduos de carga negativa como lipossacarídeos e proteínas presentes no envoltório celular do microrganismo, resultando em uma desestruturação da parede celular, com consequente perda dos constituintes intracelulares. Desse modo, derivados de quitosana catiônicos apresentam-se como uma proposta promissora, pois acredita-se que quanto maior o número de cargas positivas presentes na estrutura química do polímero, maior será a sua atividade antimicrobiana (GOY et al., 2009; MARTINEZ-CAMACHO et al., 2010). Outro mecanismo de ação proposto por alguns trabalhos na literatura se dá pela atuação da quitosana como um agente de quelação de metais, resultando na retenção de nutrientes essenciais para o crescimento do microrganismo (DUTTA et al., 2009 e GOY et al., 2009).

A compreensão do mecanismo de ação dos derivados de quitosana na inibição do crescimento fúngico possibilita potencializar a ação, além de incrementar a seletividade e eficácia do polímero. Em estudos recentes realizados no laboratório de Biomateriais e Nanotecnologia (LBN) – IBILCE/UNESP por DIAS e colaboradores (2018), mostrou que a interação de derivados anfifílicos de quitosana com modelos de membranas, liga-se fortemente à superfície da membrana celular e que essa adsorção é

muito reforçada pela presença de lipídios carregados negativamente, que também são encontrados na composição da membrana do fungo *Aspergillus flavus*. Os resultados obtidos confirmam que a agregação de constituintes da parede celular, induzida pelo derivado anfifílico, e observada por microscopia eletrônica de transmissão mostram claramente o comprometimento da parede celular como um efeito primário na inibição do crescimento de *Aspergillus flavus* (DIAS, 2018).

#### 1.4 FILMES BIOPOLIMÉRICOS

Considerando a acentuada limitação na biocompatibilidade e biodegradabilidade que existe em relação ao uso dos polímeros sintéticos, cada vez mais estão sendo intensificados os estudos envolvendo polímeros naturais, destacando-se o uso da quitosana em diversas pesquisas, nas quais visa-se o desenvolvimento de embalagens de produtos alimentícios. Além da quitosana, estudos promissores envolvendo o uso de outros polissacarídeos, tais como o alginato e a pectina, estão sendo realizados empregando-os no preparo de revestimentos e embalagens (LUVIELMO; LAMAS, 2012).

São notórios os avanços em pesquisas na preparação e aplicação de filmes baseados em quitosana com múltiplas funcionalidades. Em estudos recentes, filmes de quitosana vêm sendo aplicados no desenvolvimento de novas embalagens, Warsiki (2018) utilizou a quitosana associada ao permanganato de potássio para desenvolver embalagens absorvedoras de etileno para prolongar o tempo de prateleira de tomates. Garcia et al., (2018) analisaram a estrutura de novos materiais tendo como base a quitosana, relacionando as propriedades mecânicas dos filmes de acordo com a variação na composição, confirmando o bom caráter da quitosana quanto a formação de filmes.

Sun et al., (2017) estudaram as propriedades físicas, mecânicas e bioativas de filmes de quitosana incorporados com polifenóis e constataram que os materiais estudados apresentaram propriedades melhores quando comparada com filmes compostos apenas por quitosana e que, portanto, podem ser uma alternativa promissora em substituição aos materiais sintéticos, pois apresentam um ótimo potencial como material de embalagem bioativa para prolongar a vida de prateleira dos alimentos.

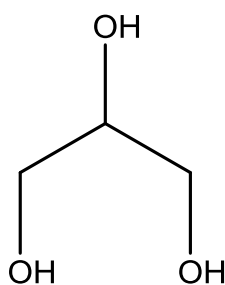
Kaya et al., (2018) estudaram pela primeira vez a incorporação de extratos de caule, folhas e sementes de *Pistacia terebinthus*, popularmente conhecida como terebinto ou cornalheira (ricos em compostos fenólicos) à quitosana para produção de

filmes e constataram que a incorporação desses extratos vegetais aumentou efetivamente as atividades antioxidante, antimicrobiana e elasticidade dos filmes, apresentando-se como um material alternativo para embalagem de alimentos.

Embora a quitosana tenha boa capacidade de formação de filmes, a adição de agentes plastificantes para elaboração dos mesmos é um método cada vez mais utilizado em busca de melhorar as propriedades dos filmes, tais como as propriedades mecânicas, térmicas e estruturais. Os plastificantes em geral são poliálcoois de baixa massa molecular e seu uso se dá com o intuito de reduzir as forças intermoleculares polímero-polímero e promover um distanciamento entre as cadeias, proporcionando maior flexibilidade na rede polimérica (RODRÍGUEZ-NÚÑEZ, 2014). A escolha do plastificante a ser adicionado aos filmes é um fator muito importante e depende da compatibilidade deste com o polímero e o solvente utilizado, de modo a evitar a separação precoce no decorrer do processo de secagem da solução filmogênica. A quantidade de plastificante varia de acordo com a rigidez do material ao qual ele será incorporado. No entanto, há concentrações nas quais se observa um efeito contrário, conhecido como antiplastificante, onde ao invés de tornar o filme mais flexível, ele se torna mais rígido e quebradiço (GAUDIN et al., 2000).

Dentre os plastificantes mais utilizados na produção de filmes com quitosana, destaque-se o uso de glicerol e sorbitol. O glicerol, popularmente conhecido como glicerina, é um triálcool, cujo nome oficial (IUPAC) é 1,2,3-propanotriol (Figura 3), à temperatura ambiente apresenta-se como um líquido incolor, inodoro e viscoso. Apresenta uma natureza altamente hidrofílica devido à presença de três grupos hidroxilas em sua estrutura química, responsáveis por realizar interações de hidrogênio com a água (BEATRIZ et al., 2011).

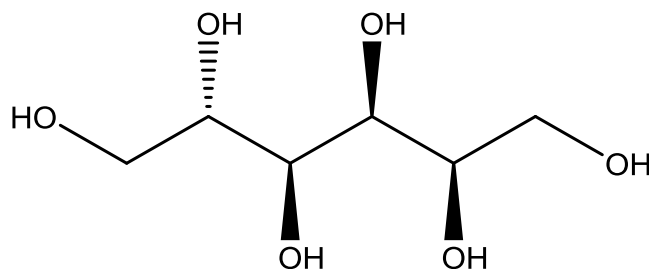
**Figura 3** - Representação esquemática da estrutura química do glicerol.



Fonte: Elaborada pela autora.

O plastificante sorbitol, também denominado como glucitol, é um poliálcool muito utilizado na indústria de alimentos como agente plastificante em filmes biopoliméricos, cuja estrutura química apresenta seis grupos hidroxilas (Figura 4), o que facilita a formação de interações de hidrogênio com as cadeias poliméricas.

**Figura 4** - Representação esquemática da estrutura química do sorbitol.



Fonte: Elaborada pela autora.

Na literatura constam estudos de filmes, cuja base é quitosana com uso de glicerol e sorbitol como plastificantes. Em um estudo publicado por Fakhoury e seus colaboradores (2012), constatou-se que os filmes de quitosana com sorbitol possuíam melhores propriedades físico-químicas do que aqueles contendo glicerol.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho teve como objetivo geral realizar a síntese e caracterização de derivados de quitosana de baixa massa molecular para preparação de filmes biopoliméricos, que ainda não foram avaliados ou descritos na literatura, com potencial emprego como filme e/ou cobertura ativa na indústria alimentícia para conservação pós-colheita de frutas e grãos.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I- Sintetizar e caracterizar os polímeros por: espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio, cromatografia de permeação em gel e ensaio de viabilidade celular.
- II- Preparar e caracterizar filmes de quitosana e de seus derivados, bem como avaliar suas propriedades estruturais, óticas, mecânicas, térmicas, solubilidade e capacidade de absorção de água, puros e na presença de diferentes agentes plastificantes;
- III- Avaliar a atividade antimicrobiana dos filmes, contra os fungos *Aspergillus flavus*, *Alternaria solani*, *Alternaria alternata* e *Penicillium expansum*.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 REAGENTES

Os reagentes utilizados para a elaboração deste trabalho estão listados na Tabela 1, bem como o nome de seus respectivos fabricantes. A água utilizada na preparação dos experimentos foi deionizada em um sistema GEHAKA.

**Tabela 1** - Reagentes utilizados no desenvolvimento do trabalho.

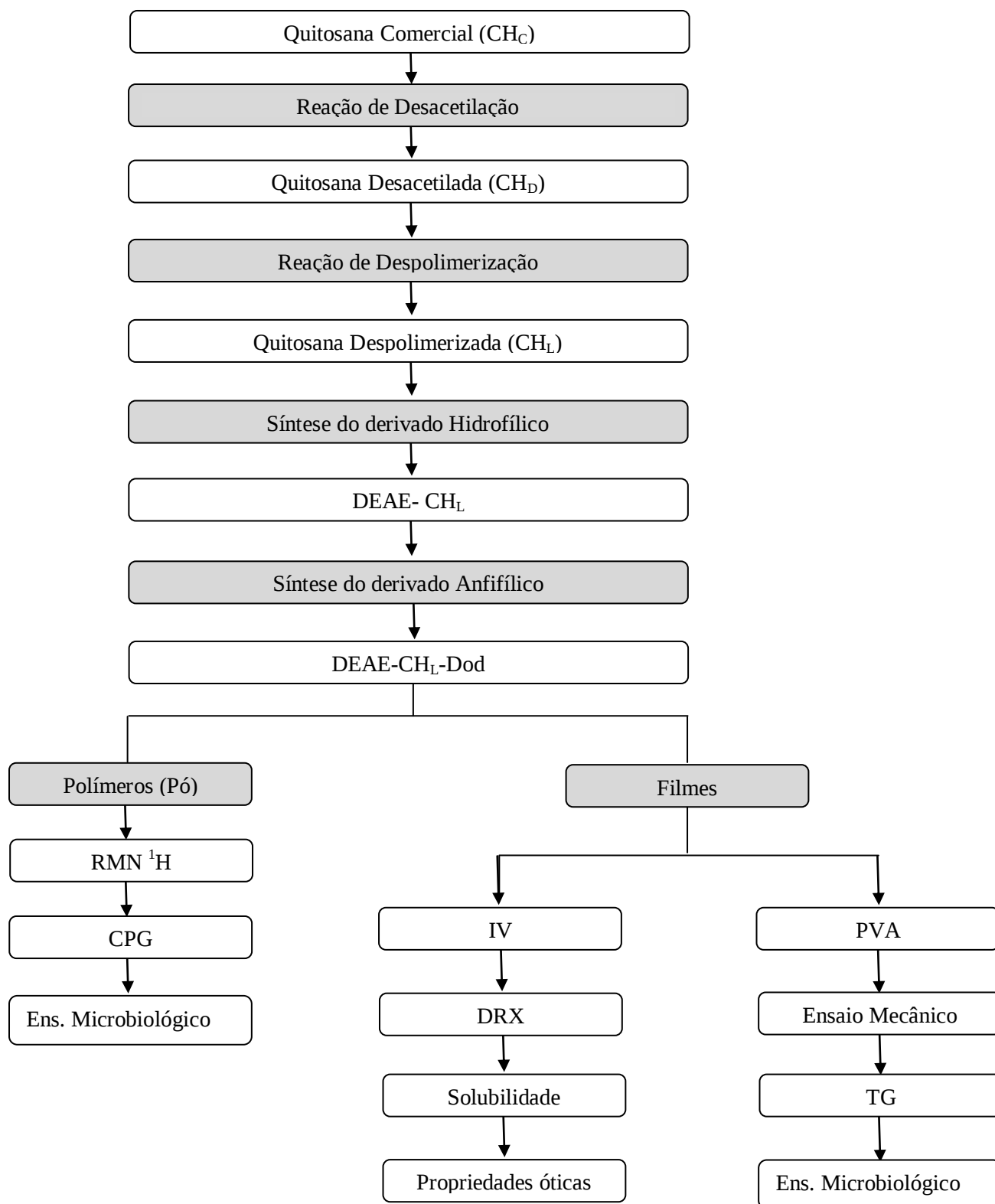
| Reagente                                           | Fabricante              |
|----------------------------------------------------|-------------------------|
| ácido acético glacial                              | Synth                   |
| ácido clorídrico                                   | Dinâmica Ltda           |
| borohidreto de sódio                               | Sigma Aldrich           |
| cloreto de cálcio anidro                           | Sigma Aldrich           |
| cloreto de deutério                                | Aldrich Chemical Co     |
| cloridrato de 2-cloro- <i>N,N</i> -dietiletilamina | Sigma Aldrich           |
| dodecilaaldeído                                    | Sigma Aldrich           |
| etanol                                             | Synth                   |
| glicerol                                           | Synth                   |
| hidróxido de sódio                                 | Synth                   |
| meio de cultura batata dextrose ágar (BDA)         | Himedia                 |
| nitrato de magnésio                                | Dinâmica Ltda           |
| nitrito de sódio                                   | Synth                   |
| óxido de deutério                                  | Aldrich Chemical Co     |
| quitosana comercial                                | Polymar (lote 20100210) |
| sorbitol                                           | Vetec                   |

#### 3.2 SÍNTESES DOS DERIVADOS DE QUITOSANA

A Figura 5 apresenta um esquema ilustrativo referente à rota de sínteses realizadas neste trabalho. Para o desenvolvimento do mesmo, foi necessária uma massa consideravelmente elevada de cada derivado, o que implica numa demanda maior de quitosana desacetilada, que é o polímero de partida para os demais que foram

sintetizados. Os rendimentos obtidos em todas as reações estão apresentados no Apêndice A.

**Figura 5** - Esquema ilustrativo da rota de sínteses realizadas para obtenção dos derivados de quitosana e suas respectivas caracterizações.



Fonte: Elaborado pela autora.

### 3.2.1 Reação de desacetilação da quitosana comercial

Para realização do processo de desacetilação da quitosana comercial, foi utilizado o procedimento descrito por Tiera e colaboradores (2006). Uma massa de 60 g do polímero foi dispersa em 3,0 L de uma solução de ácido acético 2% (v/v) sob agitação magnética, por um período de 15 a 20 horas até obter solubilização completa. Posteriormente, a solução de quitosana foi transferida para um balão volumétrico de 5,0 L equipado com termômetro e condensador. A solução foi mantida sob agitação e aquecimento, em um sistema de refluxo e atmosfera de nitrogênio, até que atingisse uma temperatura de 100 °C ( $\pm 5$  °C), em seguida adicionou-se lentamente 750 mL de uma solução de hidróxido de sódio (NaOH) 23,5 mol L<sup>-1</sup>. Depois de transcorrida 90 minutos, a reação foi interrompida e a mistura obtida foi fracionada e transferida para seis béqueres de volume 4,0 L cada, que inicialmente estavam preenchidos com água deionizada pré-aquecida a aproximadamente 70 °C. O volume de cada béquer foi completado com água deionizada e a mistura foi agitada por cerca de 20 minutos e em seguida foi mantida em repouso para que ocorresse a decantação. O precipitado obtido foi lavado sucessivamente com água deionizada até o pH do meio atingir a neutralidade, e posteriormente foi isolado por filtração a vácuo. O sólido obtido foi submetido novamente ao processo reacional, com o objetivo de obter um maior grau de desacetilação. Após a filtragem da quitosana, a mesma foi seca em liofilizador (L101 da marca LÍOTOP) por aproximadamente 7 dias e depois de seco o polímero foi triturado e armazenado para sua utilização em procedimentos posteriores (Figura 6).

**Figura 6** - Quitosana em pó obtida após o processo de desacetilação.



Fonte: Autora.

### 3.2.2 Reação de despolimerização da quitosana desacetilada

A reação de despolimerização da quitosana desacetilada para obtenção de um derivado com baixa massa molecular ( $M_w$ ) foi realizada de acordo com o procedimento descrito por Huang, Khor e Lim (2004), a partir da oxidação da cadeia polimérica com nitrito de sódio ( $\text{NaNO}_2$ ) em meio ácido. O procedimento a seguir descreve a reação para obtenção de um polímero de  $M_w$  11 kDa, onde uma massa inicial de 320,14 g de quitosana desacetilada ( $\text{CH}_D$ ) foi solubilizada em 5,3 L de solução de ácido acético 24 % (v/v) sob agitação mecânica. Após a completa solubilização do polímero, uma solução de  $\text{NaNO}_2$  17,6 mol  $\text{L}^{-1}$  foi adicionada sob agitação e após transcorrida 1 hora de reação, a mesma foi interrompida com a adição de uma solução de  $\text{NaOH}$  20 mol  $\text{L}^{-1}$  até que o pH do meio reacional fosse elevado para 9. A purificação da quitosana despolimerizada ( $\text{CH}_L$ ) obtida foi realizada por meio de um sistema de diálise contra água deionizada, utilizando uma membrana para diálise com poros de tamanho 3,5 kDa e a mistura foi mantida em diálise por 3 dias (até atingir pH 7). O produto foi recuperado por liofilização.

### 3.2.3 Síntese do derivado hidrofílico de quitosana

Para obtenção do derivado hidrofílico, foi realizada uma reação entre a  $\text{CH}_L$  com o cloridrato de 2-cloro-*N,N*-dietiletilamina (DEAE), segundo o método descrito por Gabriel, Tiera e De Oliveira Tiera (2015). Para obter um derivado com 45 % de substituição de grupos DEAE, uma massa de 210 g de  $\text{CH}_L$  foi solubilizada em 4,2 L de solução de ácido clorídrico ( $\text{HCl}$ ) 0,3 mol  $\text{L}^{-1}$  e foi mantida sob agitação e aquecimento até atingir aproximadamente 70 °C (60 °C - 70 °C). Ao atingir a temperatura adequada, foi adicionado uma massa de aproximadamente 98 g de DEAE e o pH do meio reacional foi ajustado para aproximadamente 8, por meio da adição de solução de  $\text{NaOH}$  20 mol  $\text{L}^{-1}$ . A solução foi mantida sob essas condições por 2 horas. O produto obtido foi purificados por diálise contra uma solução de  $\text{NaOH}$  0,05 mol  $\text{L}^{-1}$ , por 24 horas e posteriormente contra água deionizada por 3 dias, utilizando uma membrana para diálise com poros de tamanho 3,5 kDa. O produto foi recuperado por liofilização.

### 3.2.4 Síntese do derivado anfifílico de quitosana

O procedimento a seguir descreve a reação de alquilação, que foi realizada com base no procedimento descrito por Gabriel, Tiera e De Oliveira Tiera (2015) para

obtenção do derivado anfifílico de quitosana com 24 % de grupos dodecila. Uma massa de 100 g do derivado hidrofílico DEAE-CH<sub>L</sub>, foi solubilizada em 2,75 L de solução de ácido acético 0,8 mol L<sup>-1</sup> e após a solubilização total do polímero, foi adicionado um volume de 1,9 L de etanol. O pH da solução foi ajustado para aproximadamente 5 e em seguida foram adicionados 21,5 mL de dodecil aldeído (Dod) sob agitação. Após 1 hora de reação, foi adicionada uma massa de 163,44 g de borohidreto de sódio (NaBH<sub>4</sub>). A mistura obtida foi mantida sob agitação vigorosa por 24 horas à temperatura ambiente. O derivado obtido (DEAE-CH<sub>L</sub>-Dod) foi purificado por diálise contra água deionizada, utilizando uma membrana com poros de tamanho 3,5 kDa durante 10 dias, realizando trocas de água 3 vezes ao dia. O produto da reação foi recuperado por liofilização.

### 3.3 CARACTERIZAÇÃO DOS POLÍMEROS

#### 3.3.1 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN <sup>1</sup>H)

Buscando avaliar a eficiência da reação de desacetilação, por meio da determinação do grau de desacetilação (GD) da CH<sub>C</sub> e da CH<sub>D</sub>, assim como a determinação dos graus de substituição das sínteses realizadas, utilizou-se a técnica Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio. O preparo das amostras foi realizado através da dissolução de uma massa de aproximadamente 15 mg dos polímeros (amostras previamente secas em estufa a 60 °C, sob pressão reduzida) em 700,0 µL de óxido de deutério (D<sub>2</sub>O) , seguida da adição de 10,0 µL de cloreto de deutério (DCl). As amostras foram mantidas sob agitação magnética constante até completa solubilização. As medidas foram realizadas na Central de Análises Químicas (CAQI) do Instituto de Química de São Carlos - SP (IQSC-USP), a 70 °C em um espectrômetro de ressonância magnética nuclear operando a 400 MHz (marca Bruker) e para determinar as áreas referentes aos sinais obtidos com o comportamento do núcleo dos átomos de hidrogênio, utilizou-se o software MestReNova versão 6.02.

#### 3.3.2 Determinação da massa molecular média por cromatografia de permeação em gel (CPG)

A técnica de cromatografia de permeação em gel é muito utilizada para determinar massa molecular de polímeros naturais e sintéticos. As medidas de massa

molecular foram realizadas no Laboratório de Fotoquímica do Instituto de Química de São Carlos - SP (IQSC - USP) em um cromatógrafo Shimadzu (LC - 20) com colunas com limites de exclusão de  $10^{-5}$  e  $10^{-6}$  com tamanhos de 0,8 cm x 30 cm, utilizando um detector por índice de refração modelo RID-10<sup>a</sup>. Para a análise foi empregado como eluente a solução tamponante ácido acético 0,3 mol L<sup>-1</sup> e acetato de sódio 0,2 mol L<sup>-1</sup> (pH 4,5), a temperatura de 35 °C e o fluxo foi de 0,8 mL min<sup>-1</sup>. A curva de calibração das colunas foi construída tendo como padrões soluções de pululana (polissacarídeo constituído por monômeros de glicose) de M<sub>w</sub> na faixa de 805,0 a 6,2 kDa.

### 3.3.3 Ensaio de Viabilidade Celular

Os polímeros foram solubilizados em solução de ácido clorídrico 0,1 mol L<sup>-1</sup>. As células que foram utilizadas nos ensaios são de fibroblastos da linhagem 3T3/NIH e o controle foi realizado com SDS (dodecil sulfato de sódio) 3% (m/v) e células não tratadas. As células foram cultivadas em placa de 96 poços a uma densidade de 20.000 células/poço em meio DMEM (*Meio de Eagle modificado por Dulbecco*) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS) e 1% de penicilina/ estreptomicina (PS) e incubadas por 24 horas a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Depois de transcorrido esse período, o meio foi trocado por novo meio DMEM suplementado e diferentes concentrações das soluções dos polímeros foram adicionadas de modo a atingir as concentrações finais de 0,02; 0,05; 0,1; 0,2; e 0,5 g L<sup>-1</sup>. O experimento foi realizado em triplicata, incubando-se por 24 horas. No último dia do ensaio, o meio de cultura foi trocado por 100 µL de meio DMEM contendo 20 µL de MTS e incubado por 3 horas em estufa a 37 °C e fez-se a leitura da placa em 490 nm. A porcentagem de viabilidade celular foi calculada segundo a Equação 1, ajustando-se as células controle (sem tratamento) como sendo 100% e as células tratadas com SDS como sendo 0%.

$$Viabilidade\ ceular = \frac{(A_{amostra} - A_{SDS})}{(A_{cel} - A_{SDS})} (x100) \quad (Equação\ 1)$$

Onde, A<sub>cel</sub> é a absorbância do controle negativo de citotoxicidade (isto é, somente células não tratadas), A<sub>SDS</sub> é a absorbância do controle positivo (de citotoxicidade) e A<sub>amostra</sub> é a absorbância do poço com a amostra. Os resultados obtidos foram expressos na forma de média ± desvio padrão.

### 3.4 FILMES BIOPOLIMÉRICOS DE QUITOSANA

#### 3.4.1 Preparo das soluções filmogênicas

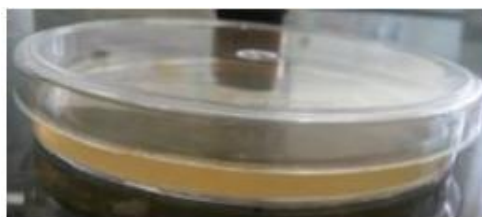
As soluções filmogênicas de polímeros foram preparadas na concentração de 2 % (m/v), solubilizando 0,5 g de polímero em 25,0 mL de solução de ácido acético 0,5 % (v/v). As soluções foram mantidas sob agitação magnética constante por 24 horas em temperatura ambiente. Após a completa solubilização, os agentes plastificantes (sorbitol e glicerol) foram adicionados sob agitação branda, a fim de se obter teores (m/m) de plastificante de 5 %, 10 % e 20 % em relação à massa de polímero utilizado, como é apresentado na Tabela 2.

**Tabela 2** - Teor dos plastificantes glicerol e sorbitol utilizados no preparo dos filmes.

| Plastificantes |            |          |             |
|----------------|------------|----------|-------------|
| Sorbitol       |            | Glicerol |             |
| %              | Massa (mg) | %        | Volume (µL) |
| 5              | 25         | 5        | 20          |
| 10             | 50         | 10       | 40          |
| 20             | 100        | 20       | 80          |

As soluções foram mantidas sob agitação magnética branda por 24 horas e em seguida foram vertidas em placas de poliestireno de 9 cm de diâmetro e foram armazenadas em capela (sem exaustão) a temperatura ambiente para evaporação do solvente, durante 7 dias (Figura 7). O efeito da adição dos plastificantes foi estudado comparando com os filmes sintetizados na ausência dos mesmos (Adaptado de LIMA, ANDREANI e SOLDI, 2007).

**Figura 7** - Preparação dos filmes biopoliméricos.



Fonte: Autora.

### 3.5 CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES

#### 3.5.1 Armazenamento e espessura dos filmes

Antes de serem submetidos aos procedimentos de caracterizações, os filmes foram acondicionados em dessecadores com umidade relativa (UR) de 53 %, a temperatura ambiente ( $\sim 25^{\circ}\text{C}$ ), por sete dias. A espessura média dos filmes foi obtida com base na média entre cinco medidas realizadas em regiões aleatórias dos filmes, utilizando um micrômetro digital (MDC - 25SB, Mitutoyo).

#### 3.5.2 Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (IV)

Amostras de todos os filmes foram analisadas em um espectrômetro de infravermelho médio com transformada de Fourier da marca Boker, modelo Vertex 70 com cristal de diamante como elemento interno de reflexão. As análises foram realizadas na Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa Instrumentação, São Carlos - SP). As varreduras foram realizadas em uma faixa espectral na região de  $4000$  a  $400\text{ cm}^{-1}$  em sistema ATR (reflectância total atenuada), com resolução de  $4\text{ cm}^{-1}$ .

#### 3.5.3 Análise por difração de raios-X (DRX)

Os filmes produzidos neste trabalho foram submetidos à análise estrutural por difração de raios-X. As análises foram realizadas em um difratômetro para bancada (Rigaku, modelo RINT 2000, Japão), com radiação monocromática de cobre ( $\text{Cu-K}\alpha$ ,  $\lambda=0,154\text{ nm}$ ) com voltagem de  $50\text{ kV}$  e corrente de  $30\text{ mA}$ , no laboratório de Cereais do departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos, UNESP- São José do Rio Preto. Foram utilizadas amostras em formato quadrangular de lado  $3\text{ cm}$  (Figura 8) e os difratogramas foram obtidos por meio de uma varredura realizada entre os ângulos de  $3^{\circ}$  a  $60^{\circ}$  ( $2\theta$ ), com uma velocidade de  $0,02^{\circ}\text{ min}^{-1}$ .

**Figura 8** - Porta-amostra contendo filme de quitosana para análise de DRX.



Fonte: Autora.

### 3.5.4 Solubilidade em água

A solubilidade em água (S) dos filmes de quitosana foi determinada com base na metodologia proposta por Farias e colaboradores (2012). Para realização desse experimento, foram utilizadas amostras circulares dos filmes (diâmetro 20 mm) e cada composição estudada, teve sua solubilidade avaliada em triplicata. Os filmes foram previamente secos em estufa a vácuo a 60 °C até obtenção de massa constante, sendo esta denominada como massa inicial do material seco ( $M_i$ ), em seguida foram submersos em tubo cônico para centrífuga contendo 50 mL de água deionizada a 25 °C e o sistema foi mantido em agitação branda (60 rpm) por 24 horas. Após esse intervalo de tempo, as amostras dos filmes foram removidas da água e novamente submetidas ao processo de secagem em estufa a vácuo (60 °C) até obter uma massa constante, ou seja, a massa final do material que não foi solubilizado ( $M_f$ ). A solubilidade foi calculada e expressa em % de acordo com a Equação 2.

$$S = \frac{M_i - M_f}{M_i} (x100) \quad (\text{Equação 2})$$

### 3.5.5 Permeabilidade ao vapor de água (PVA)

O estudo de permeabilidade ao vapor de água dos filmes foi realizado no laboratório de Processos e Análises do departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos, UNESP- São José do Rio Preto e foi determinado com base no método ASTM E96/E96M-16 (ASTM, 2016), com algumas modificações. Para realização das análises, filmes com diâmetro médio de 6,5 cm foram condicionados por 7 dias em umidade relativa (UR) de 53 %. Após o período de armazenamento, os filmes foram fixados na parte superior de cápsulas de alumínio contendo  $\text{CaCl}_2$  anidro (UR 2 %), sendo tais sistema mantidos vedados com borracha. As cápsulas foram armazenadas em

dessecador contendo água (UR 100 %) a 25 °C, com sistema interno de ventilação constante (Figura 9), de modo que a permeação do vapor de água ocorra da maior UR (dessecador) para a menor UR (cápsula).

**Figura 9** - À esquerda, filme fixado na cápsula de alumínio contendo CaCl<sub>2</sub> anidro e à direita as cápsulas dispostas nos dessecadores antes de serem armazenados na BOD a 25 °C.



Fonte: Autora.

As massas das cápsulas foram medidas em balança analítica por dez vezes com intervalos de 1 hora. O experimento foi realizado em triplicata para todos os filmes e a PVA foi calculada com base na Equação 3.

$$PVA = \frac{T_{PVA} \cdot E}{A \cdot P_{sat} \left( \frac{UR_{des} - UR_{cáp}}{100} \right)} \quad (\text{Equação 3})$$

Na qual:

$T_{PVA}$ : taxa de permeabilidade ao vapor de água ( $g \, s^{-1}$ ).

E: espessura média dos filmes (m).

A: área de permeação da cápsula ( $m^2$ ).

$P_{sat}$ : pressão de saturação do vapor de água a 25 °C (3169 Pa).

$UR_{des}$ : umidade relativa de equilíbrio no interior do dessecador.

$UR_{cáp}$ : umidade relativa de equilíbrio no interior da cápsula.

### 3.5.6 Propriedades mecânicas

Os ensaios de tração uniaxial foram realizados para determinar a tensão máxima, deformação na ruptura e o módulo de elasticidade (módulo de Young) dos filmes de quitosana e seus derivados, utilizando-se o equipamento TA. XT. Plus (Texture Analyzer Stable Micro Systems, Surrey, UK), do laboratório de análise sensorial do

departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos, UNESP- São José do Rio Preto. As propriedades mecânicas dos filmes foram avaliadas de acordo com o método padrão ASTM D882-12 (ASTM, 2012), com algumas modificações e foram replicadas em 5 corpos de prova de cada tipo de filme, sendo cada corpo de prova um retângulo de dimensões de 10 mm × 40 mm, acondicionados por 7 dias em UR de 53 % a 25 °C. Para realização dos ensaios mecânicos, empregou-se uma célula de carga de 50 N e garras com separação inicial de 20 mm e velocidade de aplicação de carga de 50 mm/min (Figura 10). Os parâmetros analisados foram resistência a tração ( $\sigma_{\max}$ , MPa), o alongamento percentual na ruptura ( $\epsilon_{\max}$ , %) e o módulo de elasticidade calculado como a inclinação da porção linear da curva tensão-deformação ( $E = \sigma/\epsilon$ , MPa).

**Figura 10** - Corpo de prova após o rompimento durante a realização do ensaio de tração.



Fonte: Autora.

### 3.5.7 Ensaio de cor e Opacidade

A cor e a opacidade dos filmes de quitosana e seus respectivos derivados, foram determinadas utilizando um colorímetro de bancada (HunterLab, ColorFlex, Estados Unidos), por meios dos parâmetros estabelecidos pelo modelo colorimétrico CIELAB:  $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$ , que permitem a identificação da cor. Sendo  $L^*$ , o parâmetro de dimensão da claridade, variando de 0 (preto) a 100 (branco); o parâmetro  $a^*$  cuja variação de valores se dá entre o verde ( $-a^*$ ) e o vermelho ( $+a^*$ ) e o parâmetro  $b^*$  que varia do azul ( $-b^*$ ) ao amarelo ( $+b^*$ ). A opacidade ( $Y$ ) dos filmes foi determinada pelo colorímetro com base na Equação 4, que apresenta uma relação da opacidade do filme em relação ao padrão preto ( $Y_P$ ) e ao padrão branco ( $Y_B$ ).

$$Y = \left( \frac{Y_P}{Y_B} \right) \times 100 \quad (\text{Equação 4})$$

Para realização do ensaio de cor e opacidade utilizou-se filmes circulares com diâmetro de aproximadamente 4 cm e as análises foram realizadas em triplicata, sendo que para cada amostra de filme a leitura foi realizada em quatro posições distintas, nos ângulos de 0°, 90°, 180° e 270°.

### 3.5.8 Análise Termogravimétrica (TG)

O estudo de estabilidade térmica dos filmes de quitosana e de seus derivados foi realizado utilizando-se o equipamento TGA Q500 (TA Instruments), na Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa Instrumentação, São Carlos - SP). As análises foram realizadas utilizando amostras de aproximadamente 7 mg dos filmes, colocadas em cadinho de platina e as medidas foram obtidas em atmosfera de N<sub>2</sub> (fluxo de 40 mL min<sup>-1</sup>), num intervalo de temperatura de 25 °C a 600 °C, com razão de aquecimento de 10 °C min<sup>-1</sup> (Adaptado de LIMA, 2006).

## 3.6 ENSAIOS MICROBIOLÓGICOS

### 3.6.1 Atividade antimicrobiana das soluções de quitosana

O preparo das soluções dos polímeros para realização dos ensaios microbiológicos ocorreu por meio da solubilização da massa do polímero correspondente a concentração final desejada (0,1 g L<sup>-1</sup>, 0,5 g L<sup>-1</sup> e 1,0 g L<sup>-1</sup>), como está descrito na Tabela 3, em 30,0 mL de solução de ácido acético 1 % (v/v), mantidas sob agitação até obter completa solubilização.

**Tabela 3** - Relação entre a massa de polímero e a concentração das soluções de polímeros utilizadas nos ensaios microbiológicos.

| Concentração final em 60 mL de solução<br>(g L <sup>-1</sup> ) | Massa do polímero<br>(g) |
|----------------------------------------------------------------|--------------------------|
| 0,1                                                            | 0,006                    |
| 0,5                                                            | 0,03                     |
| 1,0                                                            | 0,06                     |

As soluções controles foram preparadas utilizando 30,0 mL de solução de ácido acético 1 % (v/v) na ausência de polímero. Sabendo-se que o pH ótimo de desenvolvimento do fungo *Aspergillus flavus* é 5,5 , o pH de todas as soluções foi corrigido para 4,9, utilizando uma solução de NaOH, para que ao ser misturado com o meio de cultura, a solução final apresentasse um pH 5,5. O meio de cultura utilizado para o desenvolvimento do fungo (BDA- batata dextrose agar) foi preparado em erlenmeyer de 250 mL, por meio da adição de 1,26 g do meio em 30,0 mL de água deionizada, sendo preparada uma solução para cada concentração de polímero estudado e para o controle. As soluções de BDA foram aquecidas em micro-ondas até a completa solubilização (Figura 11) e logo após, foram esterilizadas a 121 °C ( $\pm$  1 °C) por 20 minutos. Posteriormente, as soluções de quitosana e a solução controle foram vertidas nos erlenmeyers contendo BDA para obter as concentrações finais desejadas 0,1 g L<sup>-1</sup>; 0,5 g L<sup>-1</sup> e 1,0 g L<sup>-1</sup>. As soluções foram homogeneizadas e divididas em placas de Petri, sendo 20 mL em cada placa, uma vez que cada concentração de polímero foi testada em triplicata.

**Figura 11** - Solução de BDA utilizada para crescimento dos fungos.



Fonte: Autora.

Para realização dos ensaios microbiológicos *in vitro*, foi preparada uma suspensão de esporos, que foi submetida à agitação em vórtex por 2 minutos para promover a dispersão dos esporos e a concentração foi determinada pela contagem direta em microscópio empregando-se a câmara de Neubauer, na qual foi determinada uma concentração de  $1,0 \times 10^6$  esporos mL<sup>-1</sup> de solução. Posteriormente com o auxílio de uma micropipeta esterilizada, transferiu-se 5,0 µL da suspensão de esporos para um orifício (5 mm de diâmetro), no centro de cada placa ( 9,0 cm de diâmetro) contendo o meio de cultura solidificado juntamente com as soluções de polímeros, assim como nas

placas contendo BDA - controle. As placas foram incubadas (câmara incubadora B.O.D. MA 415 - Marconi) por um intervalo de tempo de 7 dias a 25 °C.

### 3.6.2 Determinação do índice de inibição do crescimento fúngico

O índice de inibição do crescimento do fungo *Aspergillus flavus* pela ação da quitosana e dos seus derivados sintetizados foi determinado com base no crescimento radial das colônias, medido no sétimo dia de incubação (dia correspondente ao fim do primeiro ciclo de crescimento do micro-organismo) diretamente nas placas de Petri com o auxílio de um paquímetro. O cálculo do índice de inibição foi realizado utilizando a Equação 5 (MARTINEZ- CAMACHO et al., 2010).

$$\text{Índice de inibição (\%)} = \left[ 1 - \left( \frac{D_a}{D_b} \right) \right] \times 100 \quad (\text{Equação 5})$$

Onde:

Da: diâmetro das colônias das placas contendo polímero + BDA;

Db: diâmetro das placas contendo apenas BDA (controle).

### 3.6.3 Atividade antimicrobiana de filmes de quitosana

A atividade antimicrobiana de filmes à base de quitosana, foi realizada em microplacas de 96 poços e utilizou cepas dos fungos *Alternaria alternata*, *Alternaria solani* e *Penicillium expansum* (adquiridas na Embrapa Instrumentação, São Carlos – SP), as quais foram utilizadas para o preparo de uma suspensão de esporos. Para tanto foram utilizadas amostras circulares de filmes esterilizadas com luz UV, cujo diâmetro era de aproximadamente 0,5 cm. As suspensões de esporos foram preparadas seguindo o procedimento descrito no item 3.6.1. O meio de cultura utilizado para o desenvolvimento dos fungos (batata dextrose) foi preparado, por meio da solubilização em água deionizada. As placas foram armazenadas em câmara incubadora B.O.D. (MA 415 - Marconi) por um intervalo de tempo de 7 dias a 28 °C. O crescimento fúngico foi avaliado no 3º, 5º e 7º dia de incubação, pela leitura da turbidez do meio a 405 nm por um leitor de microplacas (Biotek ELx 808). Para fins de comparação, foi utilizado como controle o meio de cultura na ausência do filme de quitosana. Todos os ensaios foram realizados em quadruplicata. (LECETA et al., 2013 e JUNIOR et al., 2005)

### 3.7 APLICAÇÃO DOS FILMES BIOPOLIMÉRICOS COMO REVESTIMENTOS DE ALIMENTOS

Soluções dos filmes de quitosana e seus derivados foram preparadas para serem testadas qualitativamente como revestimentos de frutas. Para tanto, as frutas foram imersas na solução filmogênica durante 60 segundos a temperatura ambiente e suspensas para secagem. Para fins de comparação, utilizou-se um plástico filme comercial oriundo de petróleo. O procedimento foi realizado em tomates, maçãs e bananas e durante 15 dias essas frutas ficaram armazenadas a 25°C, exceto a banana, que devido a sua maior fragilidade, a análise se deu em 5 dias, para acompanhamento do aspecto visual da conservação do alimento.

### 3.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

A análise estatística dos dados foi realizada utilizando o software Minitab 17. Os resultados dos experimentos foram expressos na forma de média  $\pm$  desvio padrão e a variância foi analisada utilizando o procedimento ANOVA, onde as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, considerando um nível de significância de 5%, ou seja, com intervalo de confiança de 95%.

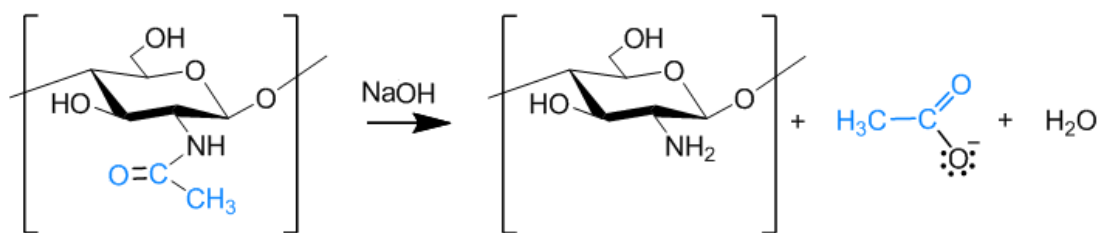
## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 CARACTERIZAÇÃO DA QUITOSANA E DE SEUS DERIVADOS

#### 4.1.1 Reação de desacetilação da quitosana comercial

A reação de desacetilação da quitosana é uma reação de hidrólise básica da amida, cujo mecanismo se dá por um processo de substituição nucleofílica bimolecular (MURPHY et al., 2000) e o esquema geral da reação está representado na Figura 12.

**Figura 12-** Esquema da reação de desacetilação da quitosana comercial.



Fonte: Elaborado pela autora.

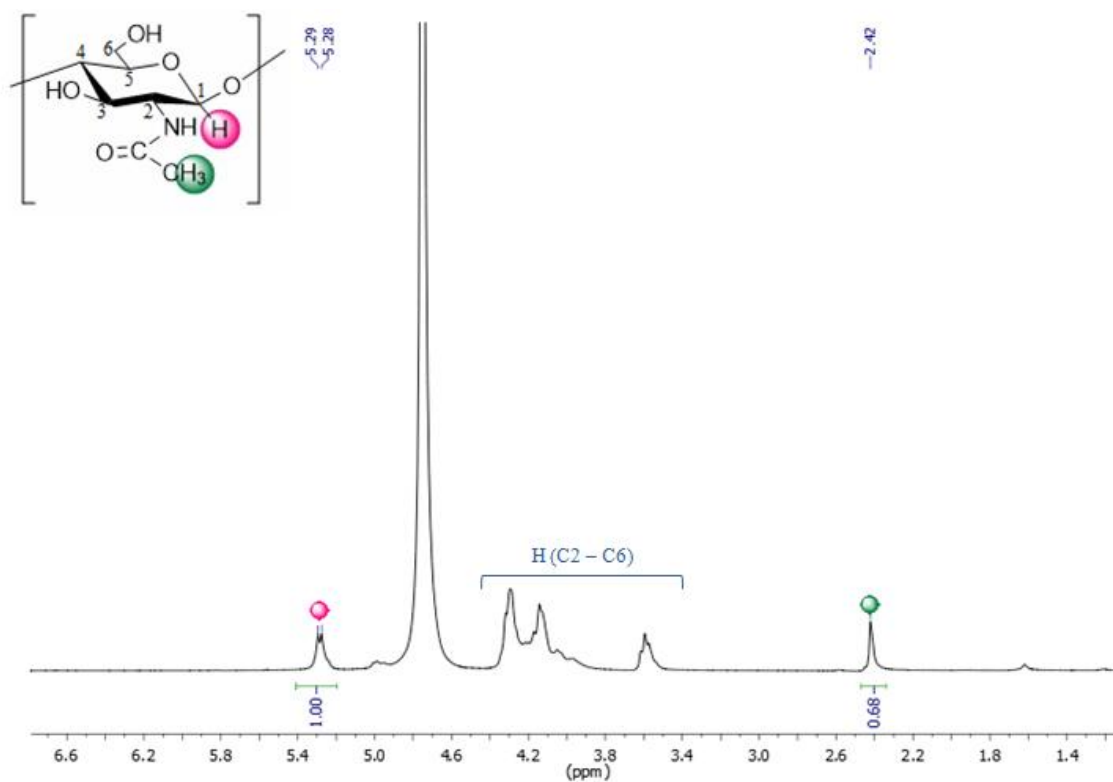
Por meio da desacetilação é possível obter um aumento de grupamentos amina livres na estrutura do polímero, as quais são passíveis de modificações devido a um aumento de sua reatividade e solubilidade. O processo ocorre em várias etapas, inicialmente tem-se a adição de íons hidróxido no grupo carbonila da amida, seguida da transferência de prótons da água do meio reacional para a forma aniônica do intermediário. Em seguida ocorre a protonação do nitrogênio do grupo amina e consequentemente tem-se a dissociação da forma protonada, resultando na clivagem da ligação entre o carbono e o nitrogênio, obtendo assim, a estrutura da quitosana com maior porcentagem de monômeros contendo grupos amina livres e liberando íons acetato e água. (SOLOMONS; FRYHLE, 2006).

#### 4.1.2 Determinação do grau de desacetilação da quitosana por meio de espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio

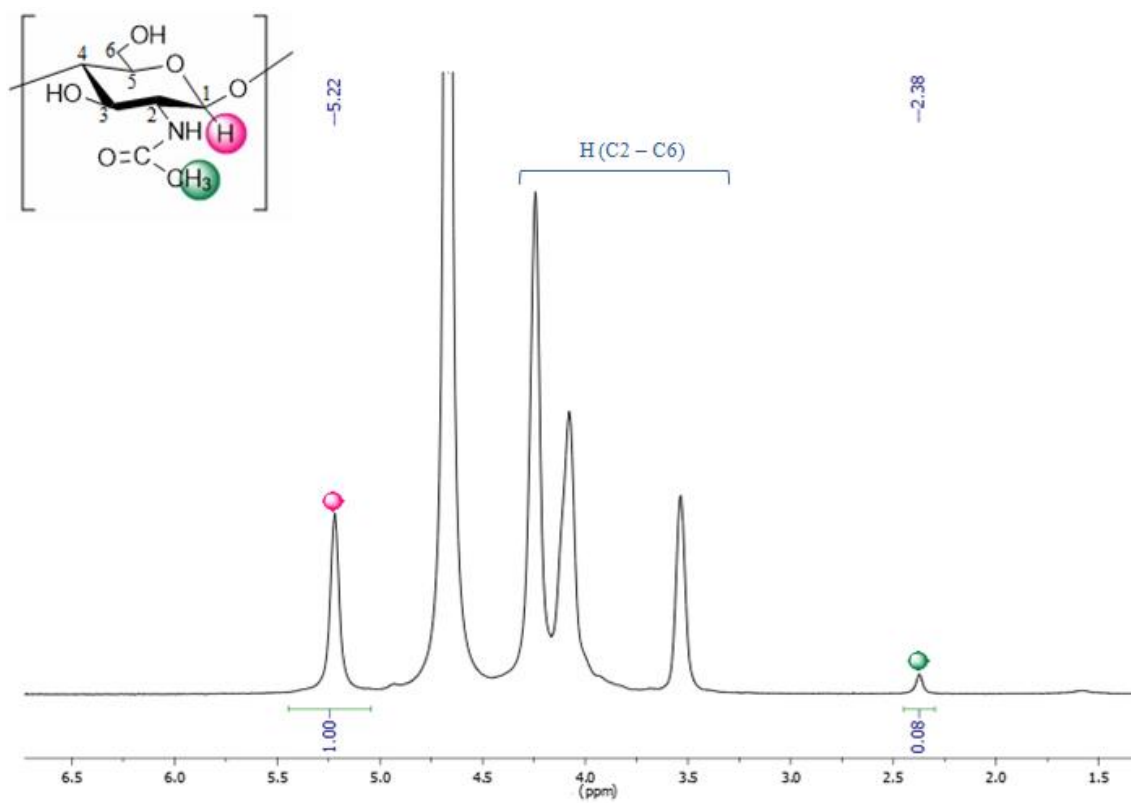
O grau de desacetilação foi obtido por meio da análise dos espectros de RMN  $^1\text{H}$  das  $\text{CH}_\text{C}$  e  $\text{CH}_\text{D}$  que estão apresentados nas Figuras 13 e 14, respectivamente, comparando-se as áreas dos sinais referentes aos hidrogênios metílicos ( $A_{\text{CH}_3}$ ) do grupo acetamida com a dos hidrogênios ( $A_{\text{H}}$ ) ligados ao carbono anomérico (C1).

O sinal correspondente aos hidrogênios anoméricos dos monômeros desacetilados e acetilados da quitosana aparecem na região de 5,2 ppm. A região de 3,5 a 4,4 ppm apresenta sinais correspondentes aos hidrogênios ligados aos carbonos 2 a 6 (C2- C6) da unidade monomérica, sendo que o sinal do hidrogênio ligado ao carbono 2 do anel (C2) aparece isolado dos demais em 3,5 ppm. O sinal correspondente aos hidrogênios metílicos do grupo acetamida aparece na região de 2,3 ppm (OLIVEIRA, et al., 2013; FIAMINGO, CAMPANA- FILHO, 2016).

**Figura 13** - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da quitosana comercial ( $\text{CH}_\text{C}$ ) em  $\text{D}_2\text{O}/\text{DCl}$  a  $70^\circ\text{C}$ .



**Figura 14** - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  para quitosana desacetilada ( $\text{CH}_\text{D}$ ) em  $\text{D}_2\text{O}/\text{DCl}$  a  $70^\circ\text{C}$ .



É possível observar a diminuição da intensidade do sinal referente aos hidrogênios metílicos do grupo acetamida dos monômeros acetilados, o que evidencia a eficiência da reação de desacetilação. Por meio da integração dos sinais referentes aos hidrogênios anoméricos (~5,2 ppm) e aos hidrogênios do grupo CH<sub>3</sub> da acetamida (2,3-2,4 ppm), foi possível determinar o grau médio de desacetilação da quitosana utilizando a Equação 6.

$$GD = \left[ 1 - \frac{A_{\text{CH}_3}}{3A_{\text{H}}} \right] \times 100 \quad (\text{Equação 6})$$

Na qual:

$A_{\text{CH}_3}$  refere-se à área de integração dos hidrogênios metílicos do grupo acetamida;

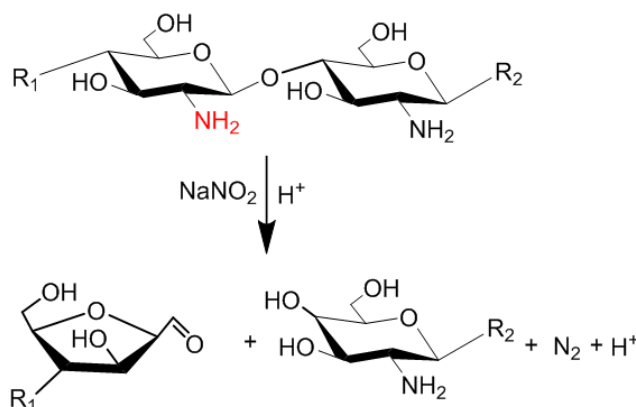
$A_{\text{H}}$  refere-se à área de integração dos hidrogênios anoméricos da cadeia polimérica da quitosana.

Com base nos espectros de RMN <sup>1</sup>H e na Equação 6, tem-se que o grau de desacetilação (GD) obtido para quitosana comercial foi de 77% e para a quitosana desacetilada foi de 97%.

#### 4.1.3 Reação de despolimerização da quitosana desacetilada

A reação de despolimerização da quitosana foi realizada com o intuito de se obter um polímero de menor massa molecular. A presente reação envolveu a quebra da ligação glicosídica pela ação do nitrito de sódio adicionado ao meio reacional (Figura 15) (HUANG, KHOR e LIM, 2004; TOMMERAAS et al., 2001).

**Figura 15** - Esquema da reação de despolimerização da quitosana.



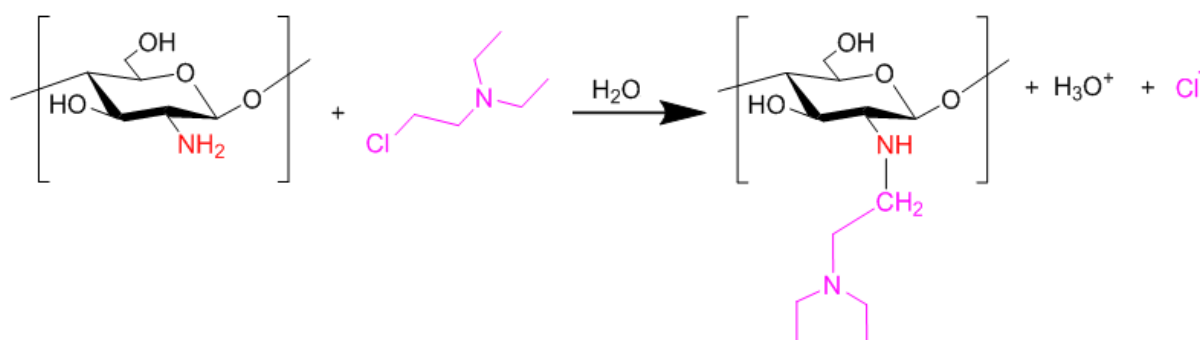
Fonte: Elaborado pela autora.

A despolimerização com  $\text{NaNO}_2$  produziu quitosana com  $M_w$  de 11 kDa.

#### 4.1.4 Reação para obtenção do derivado hidrofílico de quitosana

A inserção do grupo hidrofílico DEAE na cadeia da quitosana consiste em uma reação substituição nucleofílica bimolecular ( $\text{S}_{\text{N}}2$ ) e ocorre pelo ataque nucleofílico ao carbono ligado ao átomo de cloro do grupo DEAE com consequente rompimento da ligação entre carbono e cloro e formação da ligação carbono-nitrogênio (Figura 16).

**Figura 16** - Esquema da reação de síntese do derivado hidrofílico (DEAE- $\text{CH}_L$ ) de quitosana.

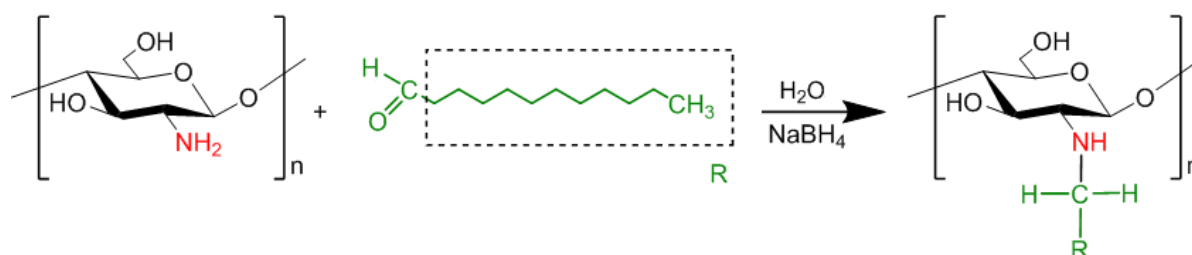


Fonte: Elaborado pela autora.

#### 4.1.5 Reação para obtenção do derivado anfifílico de quitosana

A reação de alquilação da quitosana (Figura 17) ocorre em duas etapas, primeiramente ocorre a formação de uma base de Schiff (imina) entre o nitrogênio do grupo amina da quitosana e o carbono carbonílico do aldeído, seguida da redução da dupla ligação da base de Schiff empregando-se borohidreto de sódio (DESBRIERES et al., 1996).

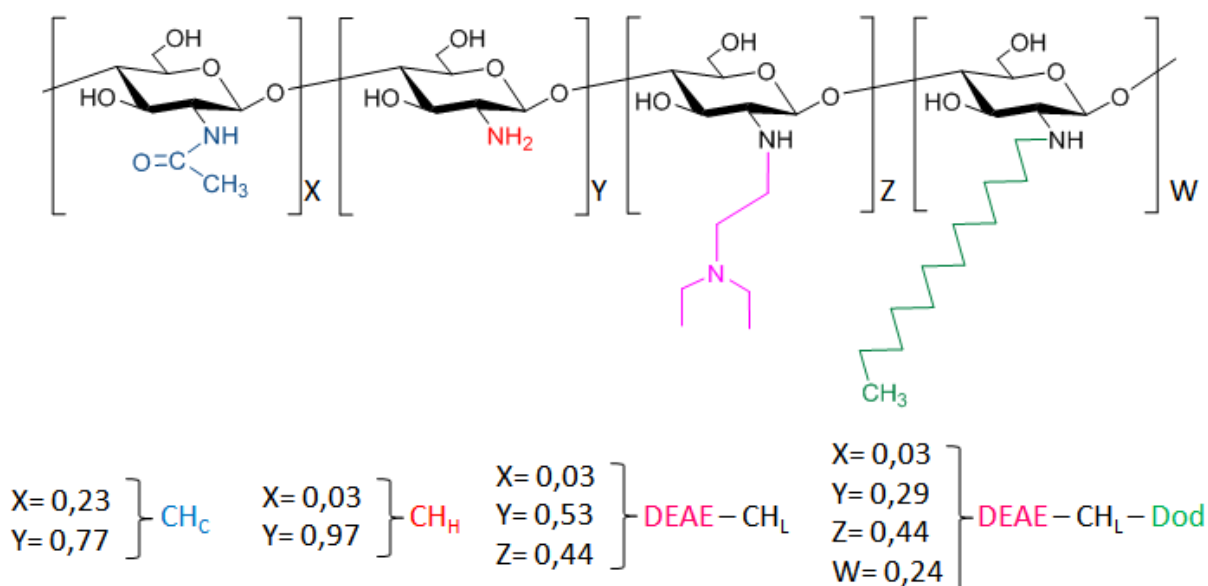
**Figura 17** - Esquema da reação de síntese do derivado anfifílico (DEAE- $\text{CH}_L$ -Dod) de quitosana.



Fonte: Elaborado pela autora.

A Figura 18 apresenta a fórmula estrutural plana idealizada do derivado anfifílico de quitosana sintetizado neste trabalho, que teve por objetivo avaliar comparativamente os efeitos da massa molecular e das modificações químicas sobre as propriedades físico-químicas e antimicrobianas de filmes de quitosana. Cinco amostras de diferentes Mw e graus de substituição foram utilizadas para o estudo (Tabela 4); uma amostra comercial (CH<sub>C</sub>) com de 77% de monômeros desacetilados, uma amostra altamente desacetilada (CH<sub>D</sub>, GD = 97%), uma amostra de baixa massa molecular obtida após o processo de despolimerização (CH<sub>L</sub>) e seus derivados contendo grupos dietilaminoetil (DEAE-CH<sub>L</sub>) e dodecila (DEAE-CH<sub>L</sub>-Dod ).

**Figura 18** - Fórmula estrutural idealizada do derivado anfifílico de quitosana (DEAE-CH<sub>L</sub>-Dod).

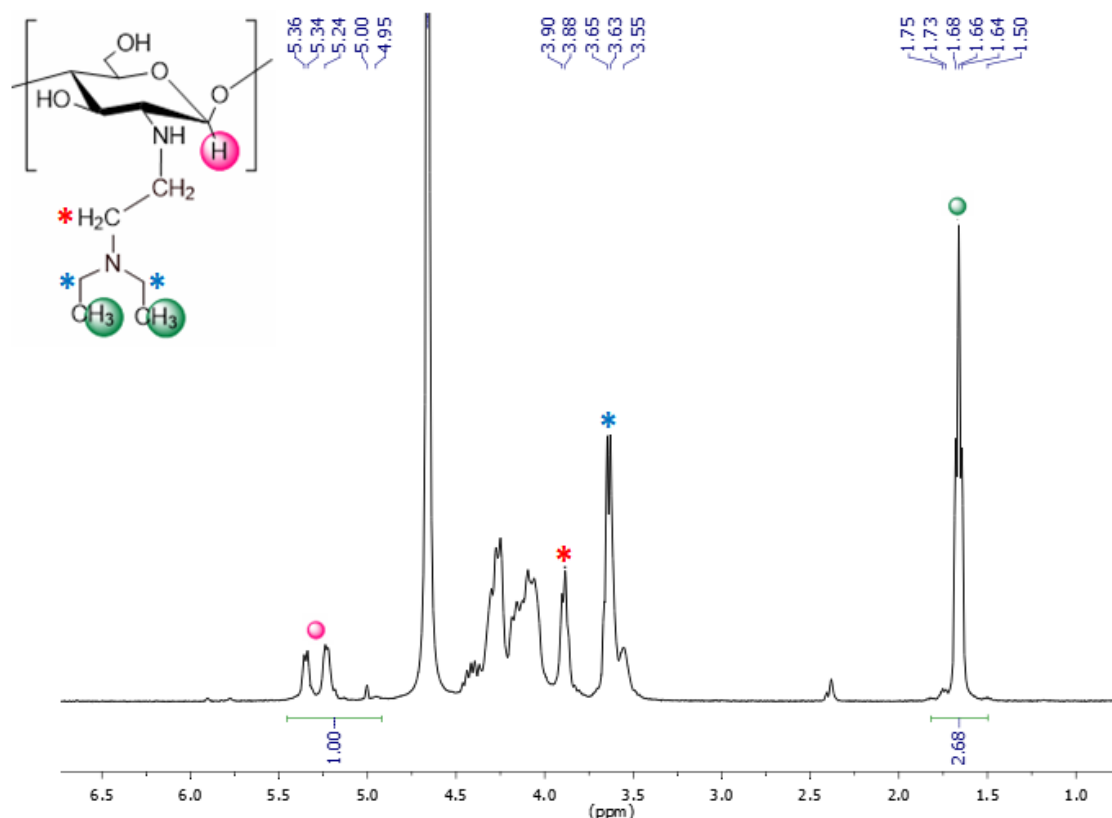


Fonte: Elaborado pela autora.

#### 4.1.6 Determinação do grau de substituição por grupos DEAE e dodecila dos derivados de quitosana

O grau médio de substituição de grupos DEAE (GS<sub>DEAE</sub>), bem como o de grupos dodecila (GS<sub>Dod</sub>) na cadeia polimérica da quitosana foi determinado por meio da técnica de RMN <sup>1</sup>H. A Figura 19 apresenta o espectro da quitosana modificada com o grupo hidrofílico DEAE (DEAE-CH<sub>L</sub>).

**Figura 19** - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da quitosana modificada com o grupo hidrofílico DEAE (DEAE- $\text{CH}_2\text{L}$ ) em  $\text{D}_2\text{O}/\text{DCl}$  a  $70^\circ\text{C}$ .



Na Figura 19 estão indicados os sinais característicos do substituinte DEAE que confirmam a eficiência do processo reacional. O sinal presente em  $\delta \sim 1,6$  ppm refere-se aos hidrogênios metílicos do DEAE, já os sinais evidentes na região de 3,5 a 3,9 ppm são atribuídos aos hidrogênios metilênicos (OLIVEIRA, et al., 2013). O  $\text{GS}_{\text{DEAE}}$  foi determinado utilizando-se a Equação 7 (KIM e CHUN, 1999).

$$\text{GS}_{\text{DEAE}} = \left( \frac{A_{\text{CH}_3}}{6 \times A_{\text{H}}} \right) \times 100 \quad (\text{Equação 7})$$

Na qual:

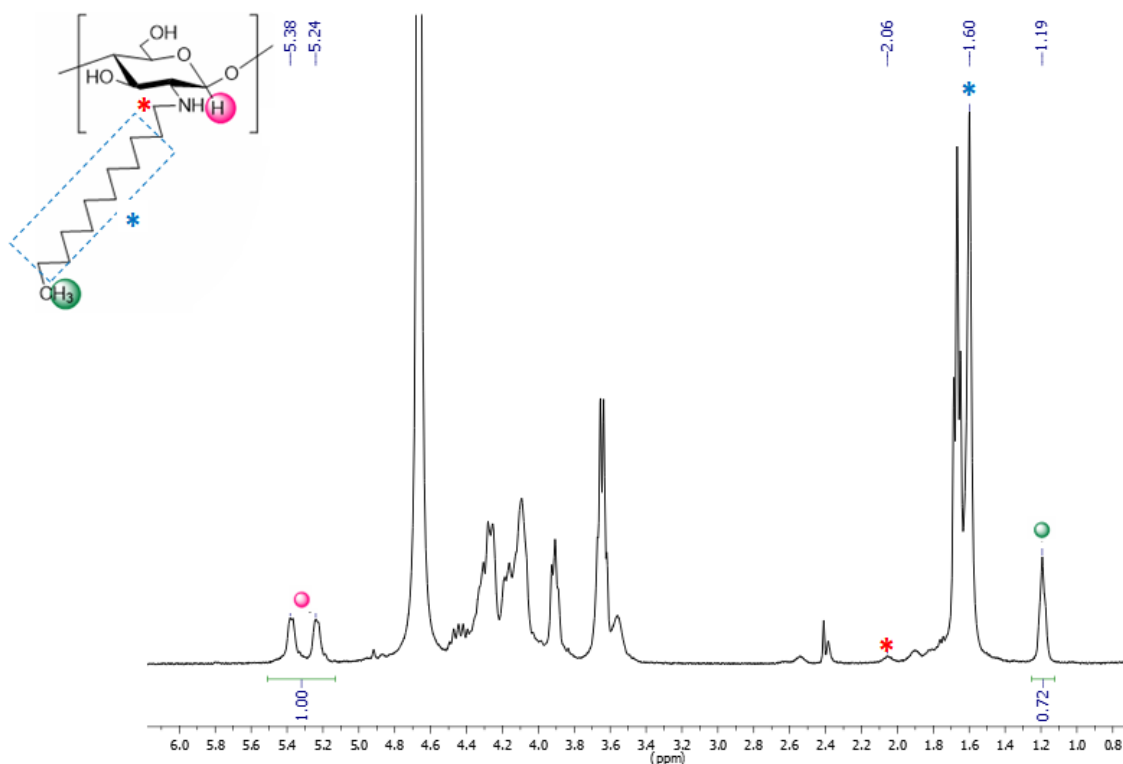
$A_{\text{CH}_3}$  refere-se à área de integração dos hidrogênios metílicos do grupo DEAE;

$A_{\text{H}}$  refere-se à área de integração dos hidrogênios anoméricos da cadeia polimérica da quitosana.

Com base no espectro de RMN  $^1\text{H}$  e na Equação 7, obteve-se 44% de substituição de grupos DEAE na cadeia da quitosana.

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  do derivado anfifílico de quitosana deu origem a três novos sinais referentes a esse grupo, como pode ser observado na Figura 20. O sinal em 1,19 ppm corresponde aos hidrogênios do grupo metila ( $-\text{CH}_3$ ) da cadeia do grupo dodecila; o deslocamento químico na região de 1,6 ppm corresponde aos sinais dos hidrogênios metilênicos ( $\text{CH}_2$ ) do substituinte, e o sinal em 2,06 ppm pode ser atribuído ao grupo metileno ligado diretamente ao nitrogênio do grupo amina da quitosana. O espectro mostra ainda um desdobramento no sinal na região de  $\delta \sim 5,3$  ppm que corresponde aos hidrogênios anoméricos dos monômeros acetilados, desacetilados e substituídos pelo grupo dodecil (DESBRIERES, MARTINEZ e RINAUDO, 1996).

**Figura 20** - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  para o derivado anfifílico de quitosana (DEAE- $\text{CH}_L$ -Dod) em  $\text{D}_2\text{O}/\text{DCl}$  a  $70^\circ\text{C}$ .



O cálculo do grau de substituição de grupos dodecila ( $\text{GS}_{\text{Dod}}$ ) foi realizado utilizando a Equação 8.

$$\text{GS}_{\text{Dod}} = \left( \frac{A_{\text{CH}_3}}{3 \times A_{\text{H}}} \right) \times 100 \quad (\text{Equação 8})$$

Na qual:

$A_{CH_3}$  refere-se à área de integração dos hidrogênios metílicos do grupo dodecila;

$A_H$  refere-se à área de integração dos hidrogênios anoméricos da cadeia polimérica da quitosana.

Foi obtido, portanto, um derivado anfifílico contendo 24% do grupo hidrofóbico dodecila.

#### 4.1.7 Determinação da massa molecular média dos polímeros por CPG

A técnica de cromatografia de permeação em gel, também conhecida como cromatografia por exclusão de tamanho é uma técnica muito aplicada que separa moléculas com base no seu tamanho. Os polímeros  $CH_C$ ,  $CH_D$ ,  $CH_L$  e DEAE-  $CH_L$  foram submetidos à análise por CPG para determinação de suas massas moleculares, tendo como padrão soluções de pululana. A Tabela 4 apresenta o valor da massa molecular ponderal média ( $M_w$ ), massa molecular numérica média ( $M_n$ ) e a polidispersividade (Pdi) dos polímeros citados, de acordo com suas respectivas composições. As curvas analíticas e os cromatogramas de CPG são apresentados no Apêndice B.

**Tabela 4** - Propriedades da quitosana e seus derivados.

| Polímeros           | $M_w$<br>(kDa) | $M_n$<br>(kDa) | Pdi<br>( $M_w/M_n$ ) | GD<br>(%) | GS <sub>DEAE</sub><br>(%) | GS <sub>Dod</sub><br>(%) |
|---------------------|----------------|----------------|----------------------|-----------|---------------------------|--------------------------|
| $CH_C$              | 208            | 108            | 1,92                 | 77        | —                         | —                        |
| $CH_D$              | 143            | 44             | 3,26                 | 97        | —                         | —                        |
| $CH_L$              | 11             | 4,3            | 2,56                 | 97        | —                         | —                        |
| DEAE - $CH_L$       | 14             | 5,6            | 2,51                 | 53        | 44                        | —                        |
| DEAE - $CH_L$ - Dod | —              | —              | —                    | 29        | 44                        | 24                       |

Diante dos valores determinados, pode-se afirmar que tanto o processo de desacetilação quanto o processo de despolimerização resultaram na diminuição da massa molecular média dos polímeros. A despolimerização obtida em consequência do processo de desacetilação pode ser resultante das condições reacionais como,

temperatura, tempo e concentração de hidróxido de sódio. Já a reação na presença de nitrito de sódio, mostrou-se como sendo um processo eficiente para despolimerizar a cadeia da quitosana, obtendo um produto de baixa massa molecular. Como esperado, o processo de desacetilação realizado em solução aquosa de NaOH, aumentou a polidispersão (PDi) da  $CH_D$  comparado a quitosana de partida ( $CH_C$ ). Por outro lado, o processo de despolimerização, seguido pelo processo de purificação por diálise, diminuiu os valores de PDi para cerca de 2,5, indicando que os comprimentos de cadeia estão cada vez mais monodispersos.

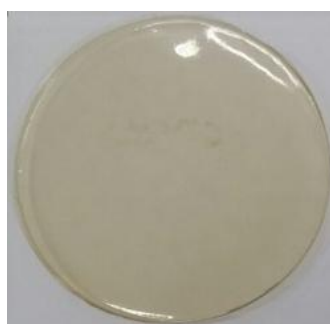
## 4.2 CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES BIOPOLIMÉRICOS

Os filmes foram caracterizados quanto à sua espessura, estrutura, solubilidade em água, coloração, opacidade, propriedades mecânicas, térmicas e permeabilidade ao vapor de água.

### 4.2.1 Espessura e aparência dos filmes

A espessura é um importante fator para filmes, uma vez que pode influenciar nas propriedades de barreira e resistência mecânica, bem como para avaliar a uniformidade desses materiais. De acordo com estudos realizados por Sobral e colaboradores (1999), quando se trata de filmes biodegradáveis, a espessura é um fator relevante, devido a variação que pode ocorrer, decorrente do método de *casting* pelo qual são formados, onde a solução filmogênica é depositada em uma superfície plana e o filme é formado após a evaporação do solvente. A espessura média dos filmes de quitosana (Figura 21) utilizados neste trabalho foi de aproximadamente 0,04 mm.

**Figura 21** – Filme biopolimérico obtido a partir de quitosana.

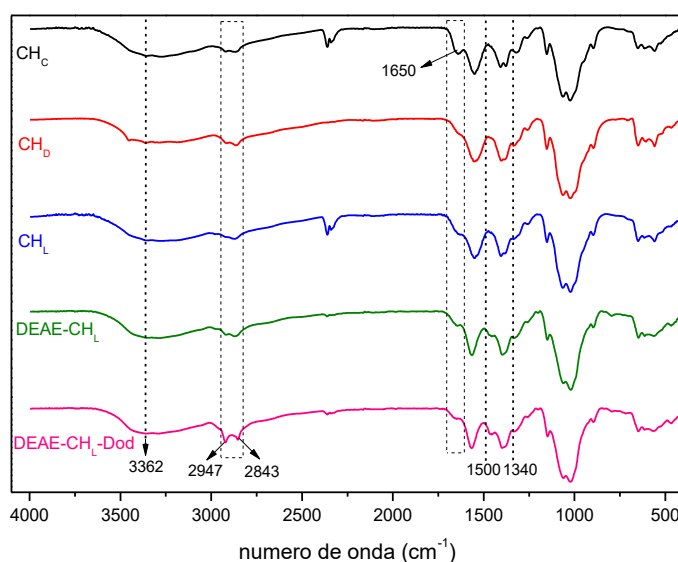


Fonte: Autora.

#### 4.2.2 Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier

A Figura 22 apresenta os espectros de IV dos filmes de quitosana comercial ( $\text{CH}_C$ ), da quitosana desacetilada ( $\text{CH}_D$ ), da quitosana degradada ( $\text{CH}_L$ ), da quitosana modificada com grupos DEAE ( $\text{DEAE-CH}_L$ ) e do derivado anfifílico ( $\text{DEAE-CH}_L$ -Dod). As bandas de absorção presentes na região de  $3362\text{ cm}^{-1}$  são bandas características resultantes das vibrações de estiramento axial dos grupamentos hidroxilas existentes nos polímeros, as quais se encontram sobrepostas ao estiramento das ligações N-H (PAVIA et al., 2010). Em aproximadamente  $1650\text{ cm}^{-1}$  há uma banda que corresponde à ligação  $\text{C=O}$  da carbonila do grupamento amida, o que permite diferenciar a  $\text{CH}_C$  dos demais polímeros estudados, pois ela apresenta maior proporção de grupos acetamida em sua estrutura. Após ser submetida à reação de desacetilação há uma redução na quantidade de grupos amida na estrutura polimérica, o que torna essa banda de absorção menos intensa nos demais.

**Figura 22** - Espectros na região do infravermelho para os filmes de quitosana e seus derivados sintetizados.



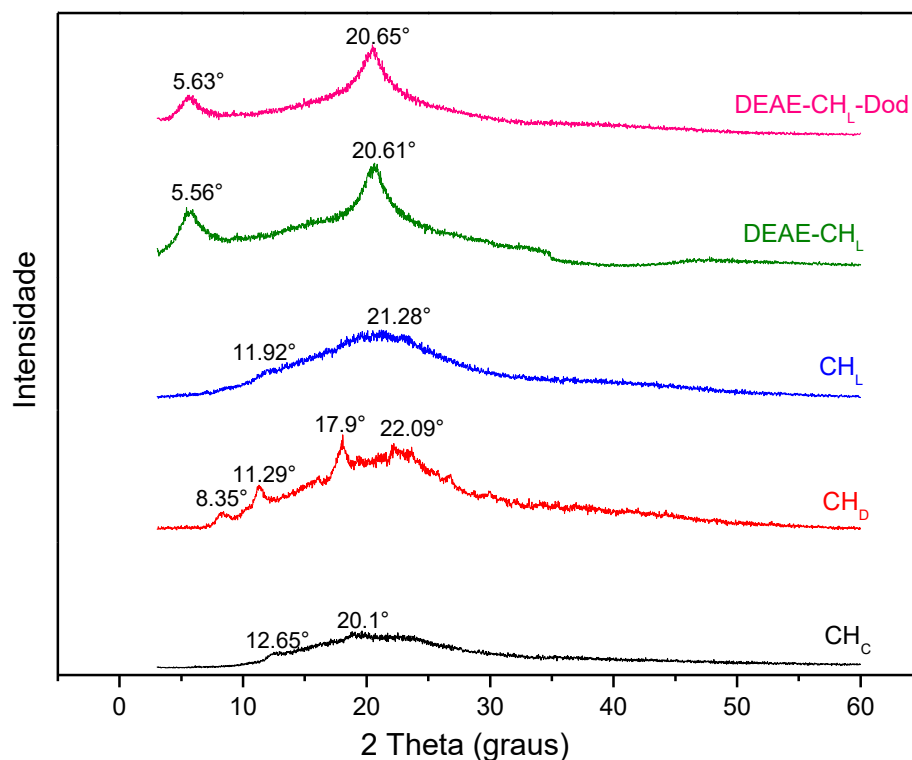
A partir da comparação entre os espectros, é possível observar bandas no intervalo de  $1500 - 1340\text{ cm}^{-1}$ , que correspondem às deformações axiais das ligações  $\text{C-N}$  presentes na estrutura molecular do DEAE e também, nota-se o surgimento de bandas na região entre  $2947 - 2843\text{ cm}^{-1}$  nos espectros do derivado anfifílico que não são observadas no espectro da quitosana. Tais bandas correspondem às deformações

axiais da ligação C—H dos grupos metila (CH<sub>3</sub>) e dos grupos metilênicos (CH<sub>2</sub>) presentes nos substituintes DEAE e Dod (GABRIEL, TIERA e DE OLIVEIRA TIERA, 2015). A similaridade entre os espectros de IV (Apêndice C), tanto em termos de posição quanto a intensidade das bandas de absorção de todos os filmes biopoliméricos com os diferentes plastificantes utilizados, indica que a adição do agente plastificante e o aumento de sua concentração, não alteraram significativamente a estrutura química do polímero durante a formação do filme. Em todos os espectros é possível observar a presença de bandas de absorção das principais ligações presentes na estrutura de cada plastificante utilizado. No trabalho realizado por Medeiros e colaboradores (2010), no qual realizaram um estudo sobre a polimerização do glicerol, os autores destacaram regiões do IV características do poliálcool, que também podem ser observadas nos espectros obtidos no presente trabalho, sendo a região de 3380 cm<sup>-1</sup> tem-se a banda de estiramento OH, em aproximadamente 1215 cm<sup>-1</sup> encontra-se a bandas associadas à ligação C—O de álcool secundário e em 1045 cm<sup>-1</sup> a banda de C—O de álcool primário.

#### 4.2.3 Difração de raios - X

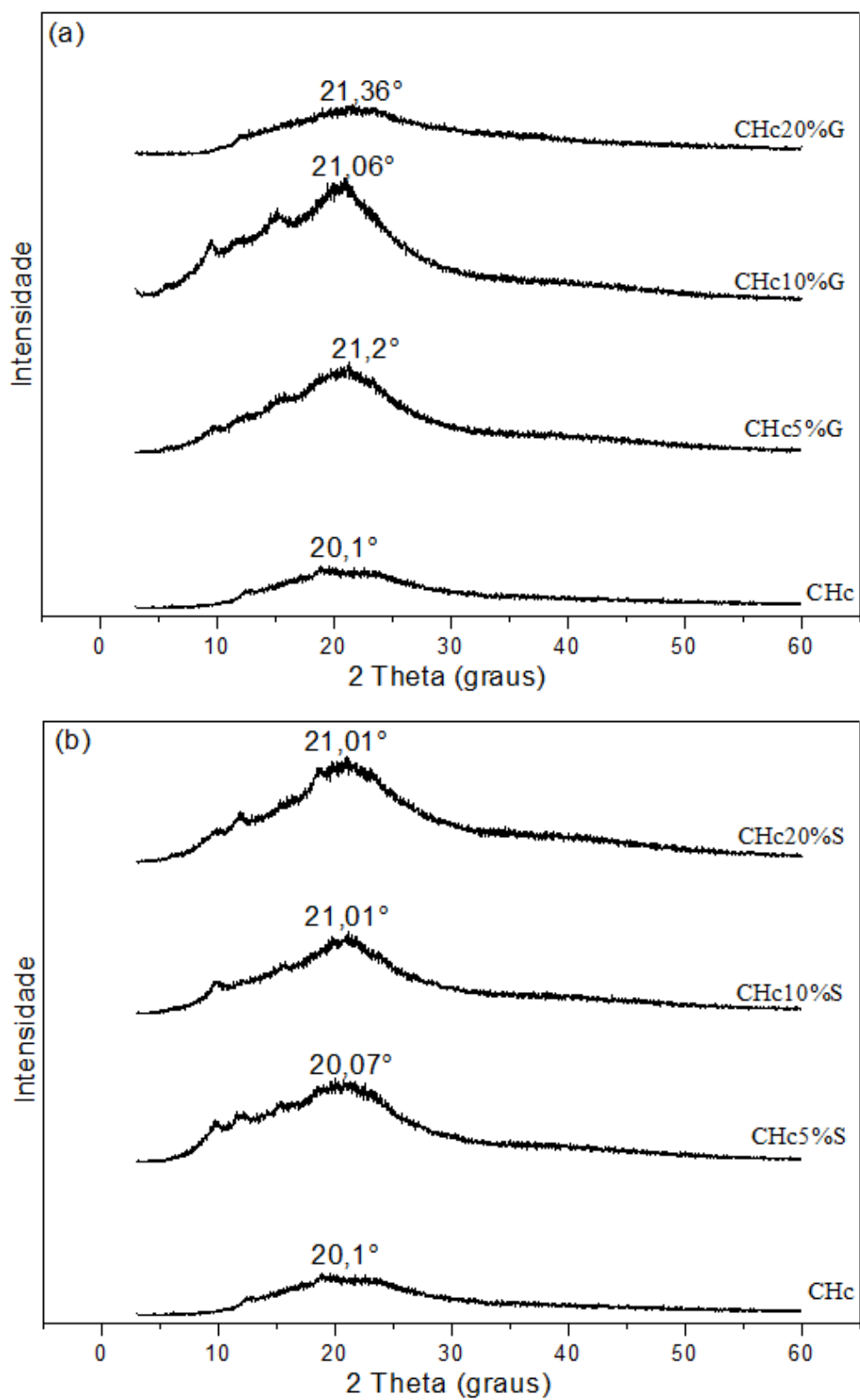
A difração de raios - X, assim como a técnica de IV é utilizada para avaliar a estrutura dos filmes e nos permite compreender o que ocorre com a mobilidade das cadeias dos polímeros. A Figura 23 apresenta os difratogramas dos filmes de quitosana e dos derivados sintetizados, na ausência de agentes plastificantes. Em geral, os filmes preparados sem plastificantes exibiram estruturas amorfas, caracterizadas pelo pico largo centrado na região de  $2\theta \sim 20^\circ$ . O difratograma de CH<sub>C</sub> mostra um pico largo centrado em  $2\theta \sim 20^\circ$ , enquanto o filme CH<sub>D</sub> exibiu outros três picos em  $2\theta = 8,35^\circ$ ,  $11,29^\circ$  e  $17,90^\circ$ , que foram atribuídos à região cristalina hidratada ( $8,35^\circ$  e  $11,29^\circ$ ) e a região amorfa ( $17,90^\circ$ ) (RHIM, et al., 2006). Diferentemente de CH<sub>L</sub>, os difratogramas de filmes preparados com seus derivados DEAE-CH<sub>L</sub> e DEAE-CH<sub>L</sub>-Dod se diferenciaram pelo aparecimento de um pico centrado em  $2\theta \sim 5,6^\circ$ , o que indica a formação de regiões cristalinas resultantes da inserção com grupos DEAE. Embora o grupo DEAE seja um grupo amina terciário, ele dá à cadeia polimérica um caráter anfifílico devido a seus grupos metila e metileno. Observações semelhantes foram feitas para N-octanoila e N-miristoilquitosanas, sugerindo que DEAE-CH<sub>L</sub> tem uma organização mais cristalina do que a obtida para o filme com CH<sub>L</sub> (TIEN et al., 2003).

**Figura 23** - Difratomogramas dos filmes de CH<sub>C</sub>, CH<sub>D</sub>, CH<sub>L</sub>, DEAE-CH<sub>L</sub> e DEAE-CH<sub>L</sub>-Dod.



A análise por difração de raios-X foi utilizada para verificar a ocorrência de modificações na cristalinidade dos filmes, com a adição de diferentes concentrações de plastificantes e de um modo geral, a adição de glicerol e sorbitol não afetou significativamente os difratogramas dos filmes e, para todas as formulações estudadas, foi observado um perfil semelhante. Para filmes preparados com CH<sub>C</sub>, a adição de glicerol e sorbitol intensificou os picos de  $2\theta = 8,35^\circ$ ,  $11,29^\circ$  e  $17,90^\circ$ , que mal eram vistos na ausência de plastificante (Figura 24), sugerindo um aumento no padrão de cristal hidratado (MA, X. et al., 2018). Este resultado indicou que uma pequena quantidade de plastificante poderia promover a cristalização da quitosana.

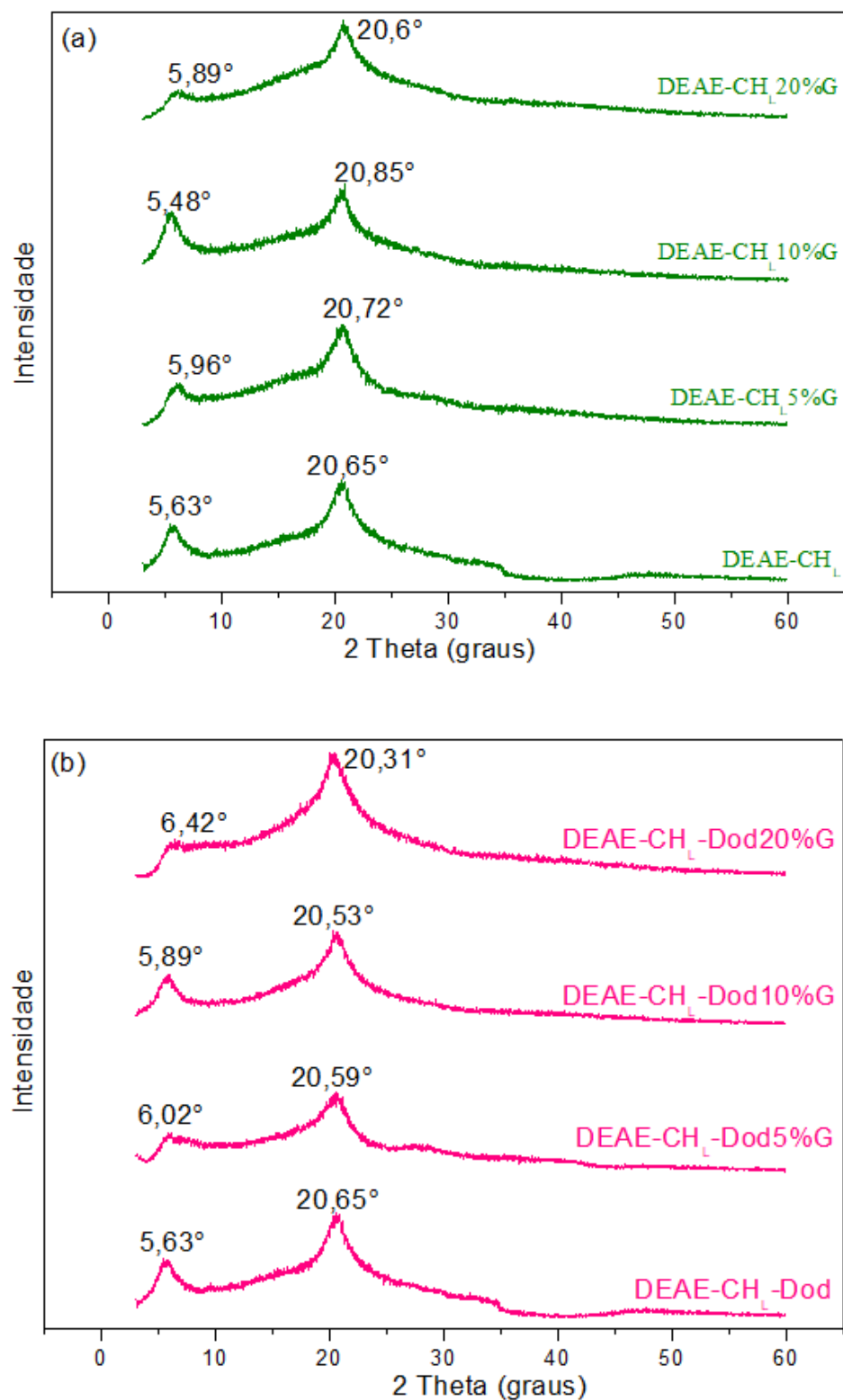
**Figura 24** - Difratogramas dos filmes de CH<sub>C</sub> contendo glicerol (a) e sorbitol (b) na formulação.



Da mesma forma, a adição dos plastificantes aos filmes CH<sub>D</sub> e CH<sub>L</sub> não afetou significativamente o seu ordenamento estrutural. Os filmes obtidos com os derivados

DEAE-CH<sub>L</sub> e DEAE-CH<sub>L</sub>-Dod na presença de 20% de glicerol tornaram-se menos cristalinos, indicados pela intensidade reduzida para o pico a  $2\theta \pm 5,6^\circ$  (Figura 25).

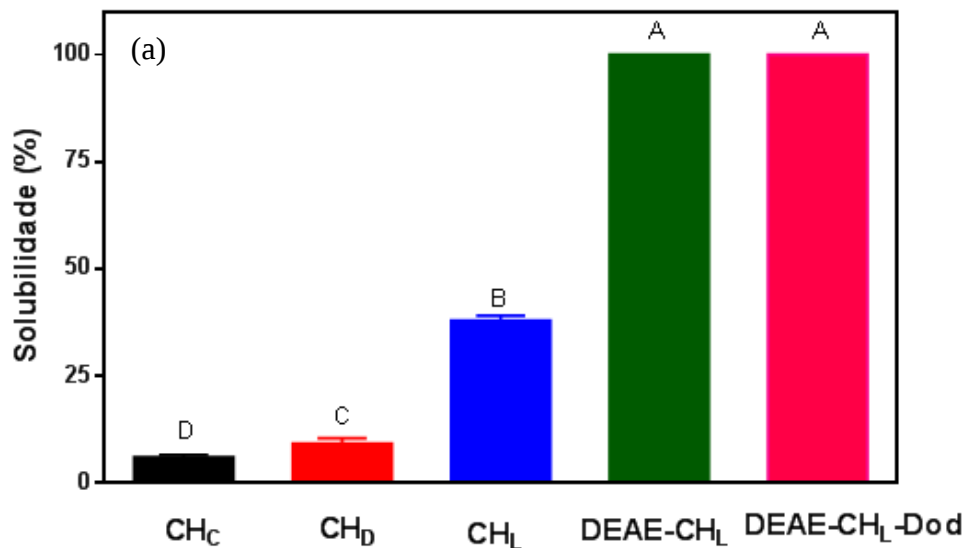
**Figura 25** - Difrátogramas dos filmes de (a) DEAE-CH<sub>L</sub> e (b) DEAE-CH<sub>L</sub>-Dod contendo glicerol na formulação.



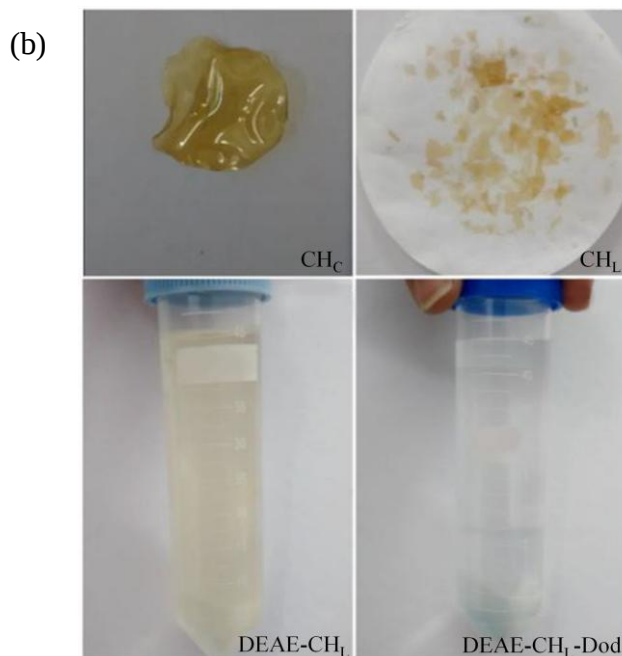
#### 4.2.4 Solubilidade em água

A biodegradabilidade de um filme é uma das características mais interessantes quanto ao seu uso como embalagem, o que reforça a necessidade do estudo da solubilidade dos filmes em água, avaliando as alterações que ocorrem na integralidade de cada filme quando em contato com a água. A solubilidade do filme é uma propriedade muito importante, particularmente para filmes comestíveis, onde a solubilidade pode ser uma propriedade necessária. O estudo da solubilidade permite uma escolha mais adequada quando se utiliza o filme na prática, uma vez que, para certos fins, como a proteção de alimentos contra ação microbiana, filmes de baixa solubilidade são necessários, enquanto para uso como revestimento comestível, solubilidades moderadas a altas podem ser necessário (ERKMEN; BARAZI, 2018). A Figura 26 mostra a solubilidade em água de filmes sem plastificante. Em geral, a quitosana de baixa massa molecular e seus respectivos derivados proporcionaram filmes com alta solubilidade em água, atingindo 100% tanto para DEAE-CH<sub>L</sub> como para DEAE-CH<sub>L</sub>-Dod. Por outro lado, CH<sub>C</sub> e CH<sub>D</sub> sem plastificante proporcionaram filmes cujas solubilidades eram 6,1 e 9,2% respectivamente (Apêndice D, Tabela D1). A alta solubilidade para DEAE-CH<sub>L</sub> e DEAE-CH<sub>L</sub>-Dod pode ser atribuída a uma combinação do maior pKa (~ 10.0) do grupo amino terciário de DEAE com o Mw baixo para CH<sub>L</sub> (Mw 11 kDa), uma vez que seu filme teve uma solubilidade de aproximadamente 40% em água, em contraste com o filme preparado com CH<sub>D</sub> (Mw 143 kDa), cuja solubilidade foi de apenas 9,2%.

**Figura 26** - Percentual de solubilidade dos filmes de quitosana produzidos sem agentes plastificantes na formulação (a) e aspecto visual dos filmes ao término do ensaio de solubilidade em água (b).



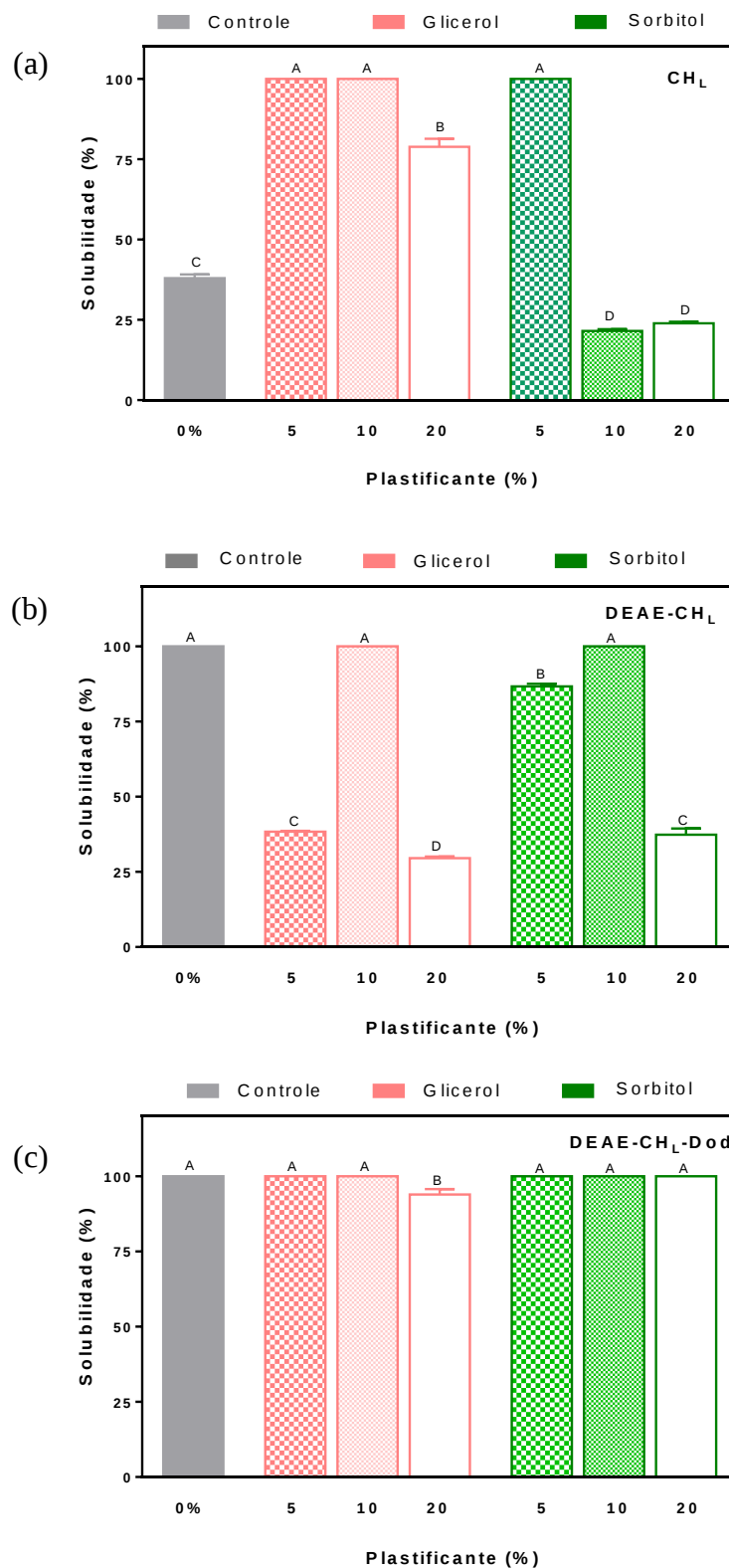
\* Os resultados correspondem à média  $\pm$  desvio padrão. Letras diferentes no mesmo gráfico indicam uma diferença significativa a  $p < 0,05$ , de acordo com o teste de Tukey.



Fonte: Autora.

As Figuras 27.a, 27.b e 27.c mostram o efeito da porcentagem de plastificante na solubilidade de filmes preparados com CH<sub>L</sub> e seus derivados.

**Figura 27** - Efeito da porcentagem de plastificante na solubilidade em água de filmes preparados com CH<sub>L</sub> (a) e seus derivados DEAE-CH<sub>L</sub> (b) e DEAE-CH<sub>L</sub>-Dod (c).

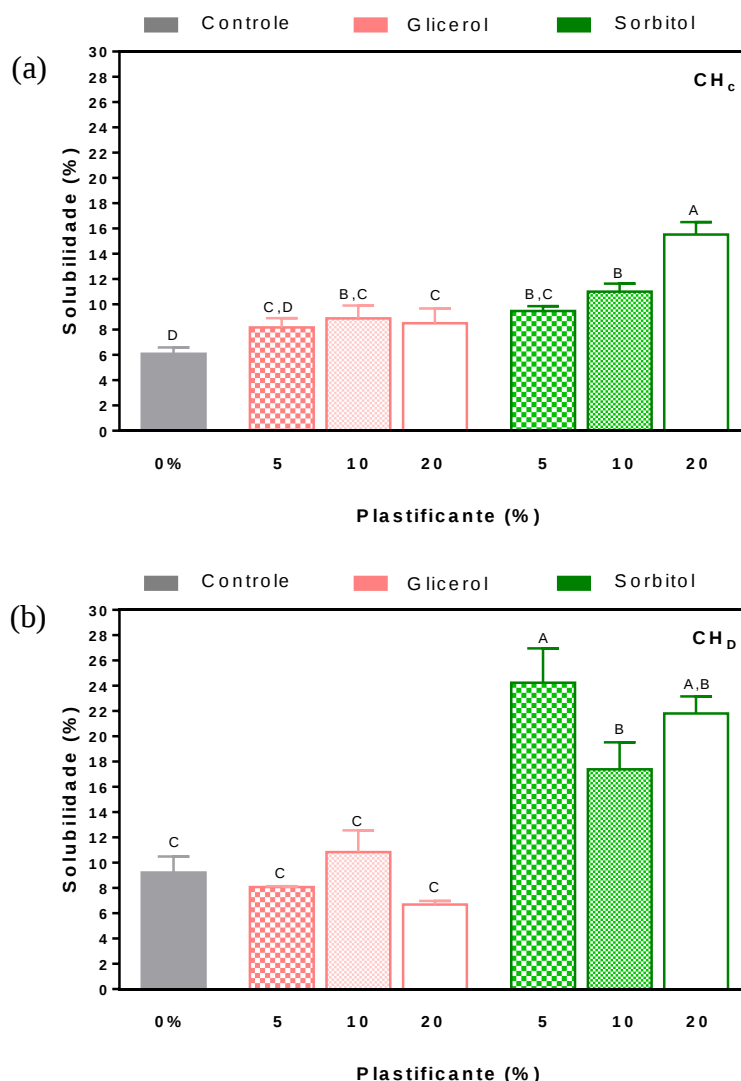


\* Os resultados correspondem à média  $\pm$  desvio padrão. Letras diferentes no mesmo gráfico indicam uma diferença significativa a  $p < 0,05$ , de acordo com o teste de Tukey.

O plastificante é um dos principais componentes dos filmes e sua porcentagem pode ser ajustada para controlar a solubilidade, que por sua vez permite o ajuste das propriedades do filme para atender diferentes aplicações, pois para alguns alimentos filmes insolúveis são necessários para melhorar a integridade do produto e resistência à água (RODRÍGUEZ-NÚÑES et al., 2014). Neste estudo, ficou claro que as porcentagens de glicerol e sorbitol afetaram a solubilidade de todos os filmes de quitosana, exceto o derivado anfifílico DEAE-CH<sub>L</sub>-Dod, cujos filmes apresentaram-se solúveis independentemente da concentração do plastificante (5% a 20%, Figura 27c ).

Em contraste, a solubilidade do CH<sub>L</sub> e DEAE-CH<sub>L</sub> de filmes preparados com 20% de plastificante foram menos solúveis do que as outras formulações, enquanto que, para CH<sub>C</sub> e CH<sub>D</sub>, a adição de glicerol e / ou sorbitol aumentou a solubilidade dos filmes para 15 -20% (Figuras 28.a e 28.b). No geral, os resultados mostraram que a porcentagem de plastificante pode ser ajustada para controlar a solubilidade das quitosanas acetiladas e desacetiladas, independentemente da sua Mw.

**Figura 28** - Efeito da porcentagem de plastificante na solubilidade em água de filmes preparados com CH<sub>C</sub> (a) e CH<sub>D</sub> (b).



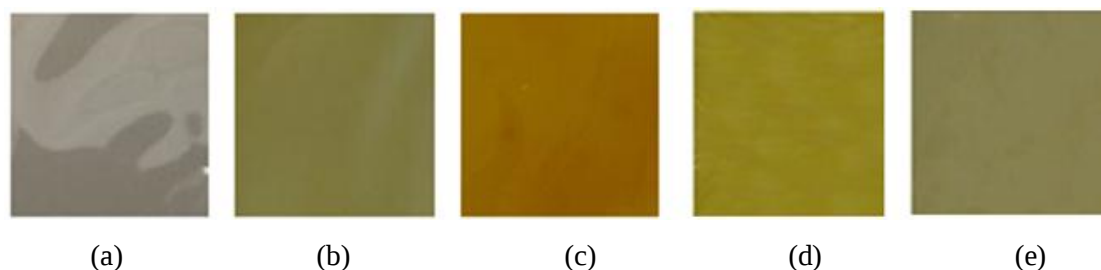
\* Os resultados correspondem à média  $\pm$  desvio padrão. Letras diferentes no mesmo gráfico indicam uma diferença significativa a  $p < 0,05$ , de acordo com o teste de Tukey.

Alguns estudos demonstram que o fato de um filme apresentar uma elevada solubilidade não torna o seu uso inviável, uma vez que para determinadas aplicações, se faz necessário que o filme apresente uma boa solubilidade em água, como em casos onde os filmes são utilizados no processo de encapsulamento de alimentos, no qual se faz uso de cápsulas de matérias comestíveis para revestir partículas (ex. pigmentos, conservantes, compostos de sabor, etc.) (AZEREDO, 2005) ou também, ser utilizado na área agrícola como recobrimento para sementes, para reduzir a perda de aditivos, inibir o ressecamento das raízes e ainda atuar no controle de pragas (TANADA-PALMU et. al., 2005).

#### 4.2.5 Ensaio de cor e Opacidade

Os resultados obtidos no ensaio de cor para as diferentes formulações dos filmes estão apresentados na Tabela 5 sob a forma de seus valores médios e respectivos desvios-padrão. A cor e a opacidade dos filmes de quitosana foram afetadas por todas as modificações químicas (desacetilação, despolimerização e substituições) às quais os polímeros foram submetidos, bem como pela porcentagem de plastificante adicionada. Essas variações na coloração dos filmes podem ser observadas na Figura 29, que mostra os filmes de quitosana e seus derivados sintetizados na ausência de agentes plastificantes.

**Figura 29** - Filmes de CH<sub>C</sub> (a), CH<sub>D</sub> (b), CH<sub>L</sub> (c), DEAE-CH<sub>L</sub> (d) e DEAE-CH<sub>L</sub>-Dod (e).

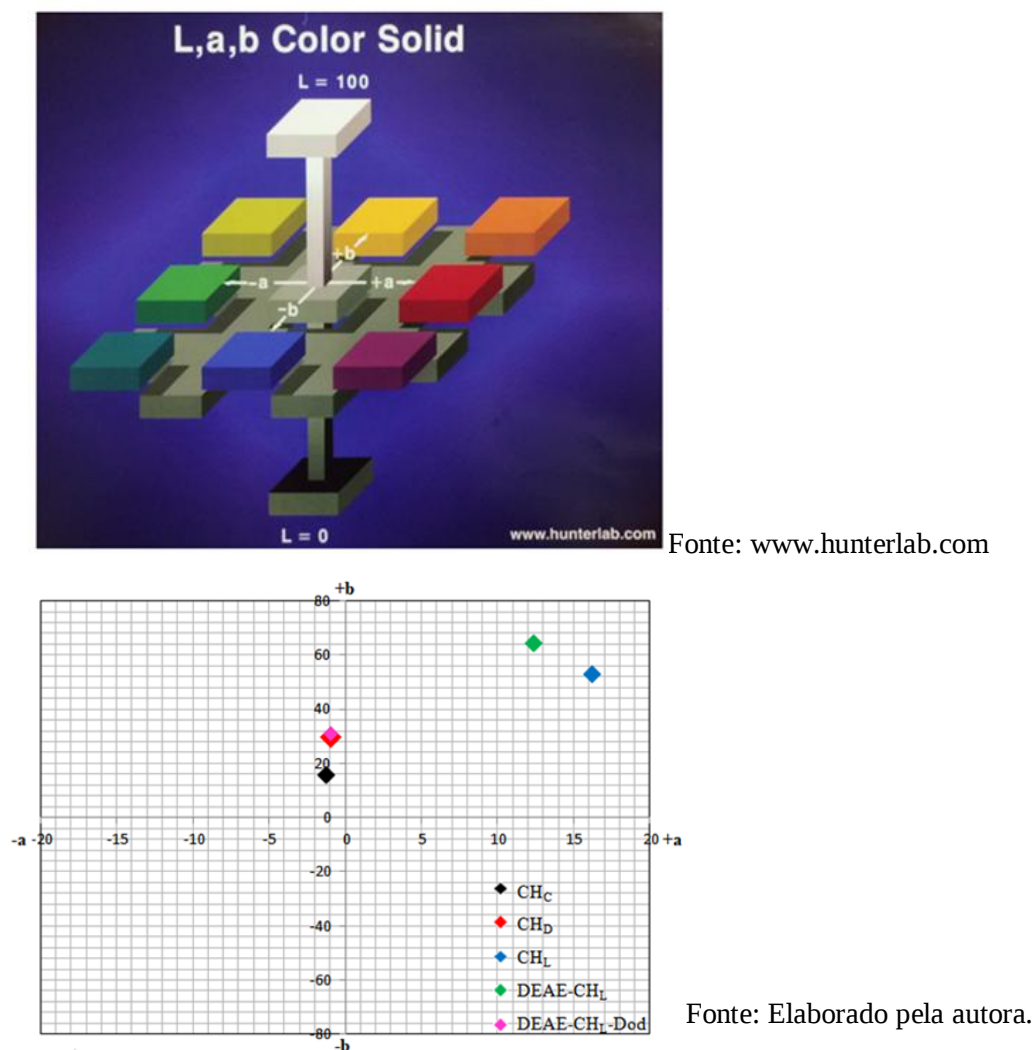


Fonte: Autora.

A Figura 30 mostra a escala padrão de cores CIELAB e a respectiva representação dos parâmetros  $a^*$  e  $b^*$  dos filmes de quitosana em plano cartesiano. As alterações nos parâmetros de cor dos filmes CH<sub>D</sub> e CH<sub>L</sub> e DEAE-CH<sub>L</sub>, em comparação ao filme CH<sub>C</sub>, estão ligadas a processos de oxidação durante a desacetilação e principalmente ao processo de despolimerização, resultando em altos valores de  $b^*$ , como os obtidos para CH<sub>L</sub> ( $53,11 \pm 1,86$ ) e DEAE-CH<sub>L</sub> ( $64,69 \pm 1,95$ ), sendo estes dois filmes os mais amarelos sem adição de plastificante. O filme CH<sub>L</sub> destacou-se dos demais por apresentar um matiz laranja-avermelhado, indicado pelo maior valor de  $a^*$  ( $16,16 \pm 1,98$ ). O filme para o derivado anfifílico DEAE-CH<sub>L</sub>-Dod apresentou uma coloração semelhante à do CH<sub>D</sub> (Tabela 5). Esta melhoria de coloração resultou do ambiente redutor proporcionado por NaBH<sub>4</sub> utilizado no passo de aminação redutiva com grupos dodecila (DIAS et al., 2018). Filmes de quitosana comercial apresentaram média de valor de claridade ( $L^*$ ) de  $84,42 \pm 1,80$ , enquanto quitosanas desacetiladas (CH<sub>D</sub>) e despolimerizadas (CH<sub>L</sub>) apresentaram valores de  $80,07 \pm 0,83$  e  $67,65 \pm 1,71$ , respectivamente, indicando menor transparência e filmes ligeiramente mais escuros

(Tabela 5). A modificação com grupos dodecila (DEAE-CH<sub>L</sub>-Dod) aumentou novamente L para  $82,50 \pm 055$ .

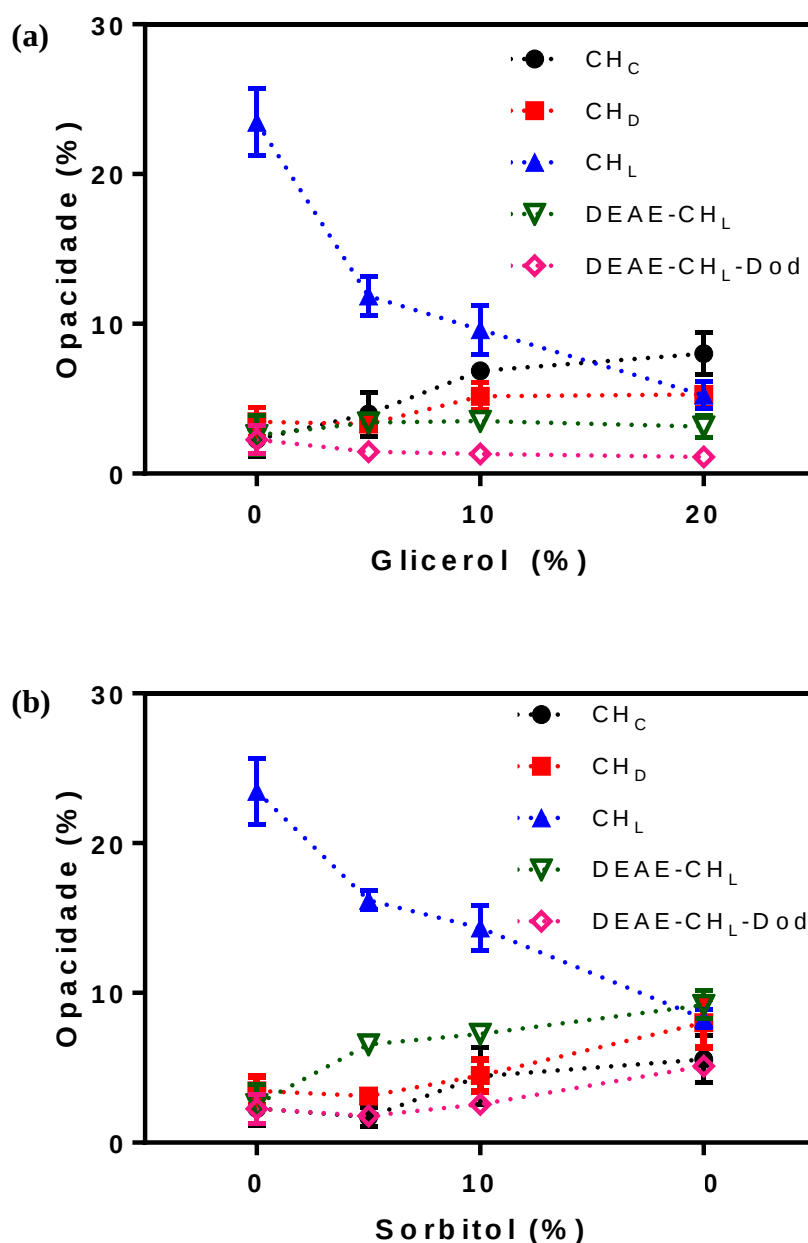
**Figura 30** - Escalas de cores CIELAB e representação dos parâmetros a\* e b\* dos filmes de quitosana em plano cartesiano.



A Figura 31 mostra que a opacidade do filme foi grandemente alterada pelo processo de despolimerização, o que reduziu significativamente a transparência do filme CH<sub>L</sub>. Os valores de opacidade também foram influenciados pela adição dos plastificantes. Diferentemente do filme CH<sub>L</sub>, cuja opacidade diminuiu com a porcentagem dos plastificantes, os valores de opacidade de CH<sub>C</sub>, CH<sub>D</sub>, DEAE-CH<sub>L</sub> aumentaram de 2% para cerca de 6-10%. Além disso, a opacidade do filme anfifílico DEAE-CH<sub>L</sub>-Dod não exibiu nenhuma mudança significativa com glicerol adicionado. Assim, além de melhorar as propriedades mecânicas, a adição de glicerol e sorbitol

aumentaram as opacidades de todos os filmes, o que pode ser uma vantagem adicional, levando em consideração que maiores valores de opacidade reduzem a incidência de luz em produtos alimentícios, impedindo a oxidação induzida pela luz com perda de nutrientes, descoloração e sabores desagradáveis (HANANI et al., 2013).

**Figura 31** - Opacidade em função das porcentagens de glicerol (a) e sorbitol (b) para os filmes preparados com quitosana e seus derivados.



\*Os resultados correspondem à média  $\pm$  desvio padrão.

**Tabela 5** - Propriedades de cor de filmes de quitosana e seus derivados.

| Parâmetros de Cor          |    |                            |                            |                            |                            |                            |                            |                            |
|----------------------------|----|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| Filme                      | L* | Controle                   | Glicerol                   |                            |                            | Sorbitol                   |                            |                            |
|                            | a* | 0                          | 5%                         | 10%                        | 20%                        | 5%                         | 10%                        | 20%                        |
|                            | b* |                            |                            |                            |                            |                            |                            |                            |
| CH <sub>C</sub>            |    | 84,42±1,80 <sup>A, B</sup> | 84,91±1,34 <sup>A, B</sup> | 86,22±2,76 <sup>A</sup>    | 85,19±2,45 <sup>A, B</sup> | 84,13±0,87 <sup>B</sup>    | 85,48±0,51 <sup>A, B</sup> | 85,65±0,49 <sup>A, B</sup> |
|                            |    | -1,29±0,07 <sup>A</sup>    | -2,32±0,18 <sup>B, C</sup> | -2,31±0,07 <sup>B, C</sup> | -2,42±0,37 <sup>B, C</sup> | -2,46±0,39 <sup>C</sup>    | -2,28±0,42 <sup>B, C</sup> | -2,11±0,06 <sup>B</sup>    |
|                            |    | 15,89±0,56 <sup>E</sup>    | 21,24±0,73 <sup>C, D</sup> | 20,13±1,66 <sup>D</sup>    | 24,34±2,49 <sup>A</sup>    | 22,50±1,23 <sup>B, C</sup> | 23,10±1,70 <sup>A, B</sup> | 22,20±0,77 <sup>B, C</sup> |
| CH <sub>D</sub>            |    | 80,07±0,83 <sup>D</sup>    | 81,36±0,52 <sup>B, C</sup> | 82,00±1,13 <sup>A, B</sup> | 82,49±0,60 <sup>A</sup>    | 80,86±0,54 <sup>C, D</sup> | 81,42±0,37 <sup>B, C</sup> | 82,85±0,94 <sup>A</sup>    |
|                            |    | -1,02±0,47 <sup>A, B</sup> | -1,01±0,15 <sup>A, B</sup> | -0,98±0,14 <sup>A</sup>    | -1,17±0,03 <sup>A, B</sup> | -0,99±0,07 <sup>A</sup>    | -0,96±0,06 <sup>A</sup>    | -1,24±0,07 <sup>B</sup>    |
|                            |    | 29,71±1,29 <sup>A</sup>    | 29,70±1,40 <sup>A</sup>    | 26,65±1,32 <sup>C, D</sup> | 25,59±0,31 <sup>D</sup>    | 27,24±0,51 <sup>B, C</sup> | 27,99±0,47 <sup>B</sup>    | 29,34±0,66 <sup>A</sup>    |
| CH <sub>L</sub>            |    | 67,65±1,71 <sup>D</sup>    | 75,77±0,92 <sup>B</sup>    | 76,13±1,35 <sup>B</sup>    | 78,07±1,58 <sup>A</sup>    | 64,26±0,43 <sup>E</sup>    | 68,85±0,42 <sup>D</sup>    | 71,42±0,75 <sup>C</sup>    |
|                            |    | 16,16±1,98 <sup>A</sup>    | 8,30±0,45 <sup>D</sup>     | 10,75±0,61 <sup>C</sup>    | 9,56±0,61 <sup>C</sup>     | 13,60±0,82 <sup>B</sup>    | 13,45±0,70 <sup>B</sup>    | 13,04±0,86 <sup>B</sup>    |
|                            |    | 53,11±1,86 <sup>C</sup>    | 47,35±1,62 <sup>E</sup>    | 50,85±1,72 <sup>D</sup>    | 53,16±1,65 <sup>C</sup>    | 63,75±1,47 <sup>B</sup>    | 63,21±0,92 <sup>B</sup>    | 69,06±0,94 <sup>A</sup>    |
| DEAE- CH <sub>L</sub>      |    | 66,49±0,98 <sup>C</sup>    | 64,93±2,50 <sup>C</sup>    | 65,92±1,39 <sup>C</sup>    | 56,45±0,77 <sup>D</sup>    | 66,98±1,17 <sup>A</sup>    | 66,68±0,89 <sup>A</sup>    | 68,31±0,87 <sup>B</sup>    |
|                            |    | 12,31±0,78 <sup>F</sup>    | 16,76±0,72 <sup>G</sup>    | 22,54±1,62 <sup>B</sup>    | 26,29±0,45 <sup>A</sup>    | 15,70±0,86 <sup>D</sup>    | 14,23±0,98 <sup>E</sup>    | 17,13±0,69 <sup>C</sup>    |
|                            |    | 64,69±1,95 <sup>D</sup>    | 66,34±2,85 <sup>C</sup>    | 66,19±1,61 <sup>D</sup>    | 69,79±1,02 <sup>E</sup>    | 67,34±1,78 <sup>A</sup>    | 68,77±1,24 <sup>B</sup>    | 70,39±1,00 <sup>C</sup>    |
| DEAE- CH <sub>L</sub> -Dod |    | 82,50±0,55 <sup>C</sup>    | 80,80±0,29 <sup>F</sup>    | 81,98±1,20 <sup>D</sup>    | 81,17±0,45 <sup>E</sup>    | 82,94±0,21 <sup>C</sup>    | 84,10±0,26 <sup>B</sup>    | 86,23±0,96 <sup>A</sup>    |
|                            |    | -0,96±0,31 <sup>A</sup>    | -0,39±0,13 <sup>B</sup>    | -0,88±0,43 <sup>C</sup>    | -0,27±0,27 <sup>A</sup>    | -0,89±0,07 <sup>B</sup>    | -1,21±0,05 <sup>C</sup>    | -1,44±0,04 <sup>D</sup>    |
|                            |    | 30,99±2,23 <sup>B</sup>    | 33,88±0,64 <sup>A</sup>    | 35,25±1,73 <sup>A</sup>    | 34,96±1,31 <sup>A</sup>    | 27,75±0,50 <sup>C</sup>    | 26,27±0,43 <sup>C</sup>    | 17,76±0,70 <sup>D</sup>    |

\* Letras diferentes na mesma linha para formulações do mesmo plastificante indicam uma diferença significativa (p <0,05) de acordo com o teste de Tukey.

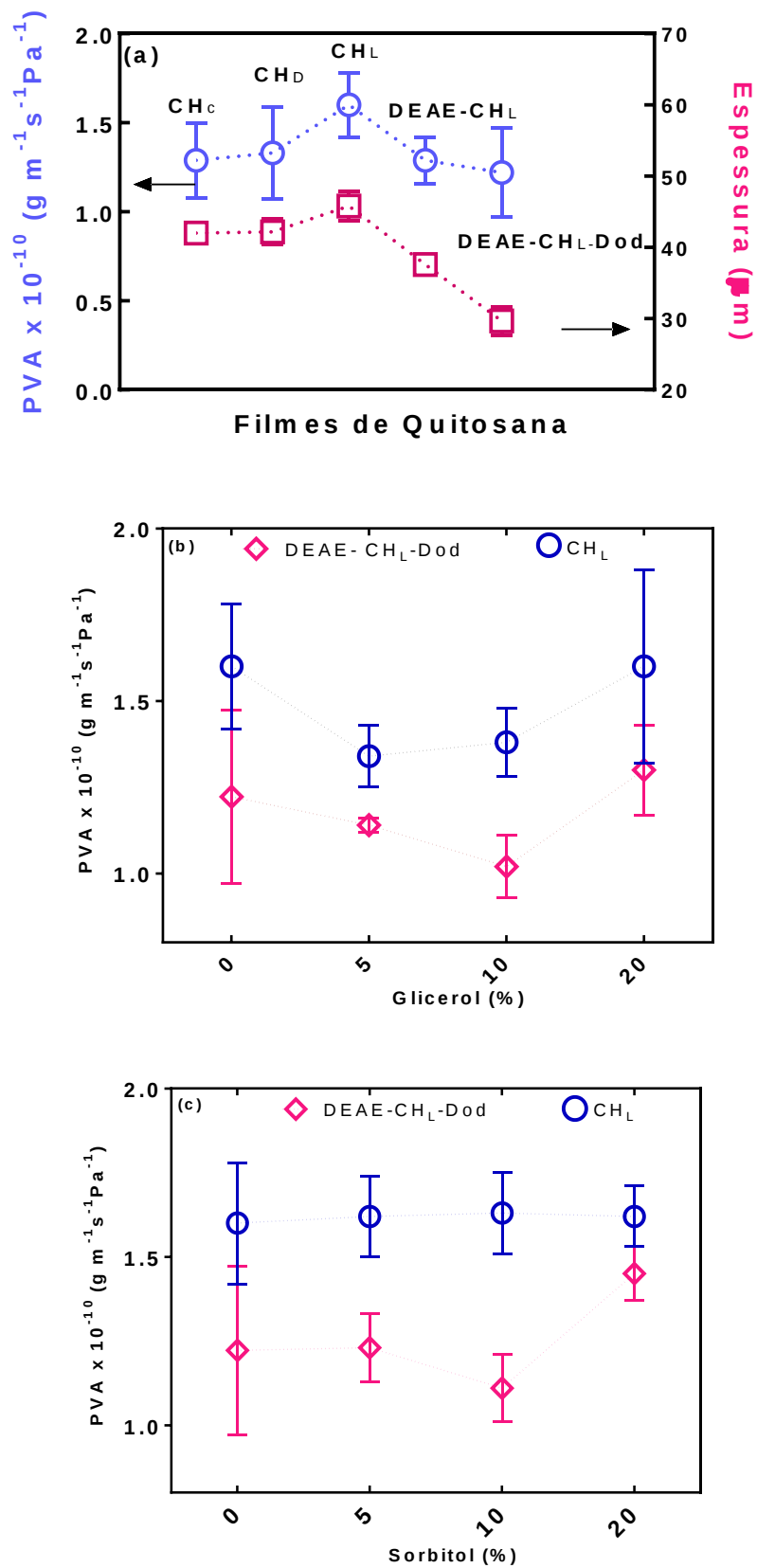
#### 4.2.6 Permeabilidade ao vapor de água

A permeabilidade ao vapor de água (PVA) é uma das propriedades mais importantes para avaliar o potencial de aplicação dos filmes, devido à importância da água no processo de deterioração dos alimentos. É bem conhecido que vários parâmetros como estrutura química, concentração, método de preparação, condições de armazenamento e a presença de aditivos podem afetar a permeabilidade ao vapor de água (ESCAMILLA-GARCÍA et al., 2017; MORILLON et al., 2002). Assim, neste trabalho, espera-se que as alterações sequenciais na estrutura da quitosana, isto é, desacetilação, despolimerização e modificação com grupos DEAE e dodecila afetem a PVA, uma vez que estes processos irão alterar a natureza anfifílica da cadeia polimérica. Para avaliar o efeito de modificações estruturais na PVA para cada filme, o ganho em massa foi determinado em função do tempo para todas as formulações de filmes estudadas e a taxa de PVA foi calculada conforme descrito no item 3.5.5 deste trabalho e as curvas representativas do ganho de massa de todos os filmes estão apresentadas no Apêndice E. A Figura 32 (a) mostra que os valores de PVA para os filmes preparados sem plastificantes exibiram uma tendência para aumentar com os processos de desacetilação e despolimerização e depois começam a diminuir com a inserção de grupos DEAE e dodecila. Essa tendência pode ser explicada pela natureza hidrofóbica dos grupos dodecila, que também afetou a espessura dos filmes, diminuindo de 45  $\mu\text{m}$  para 30  $\mu\text{m}$  (Figura 32a e Tabela 7) com a inserção desses grupos. Os valores mais elevados de PVA para  $\text{CH}_C$ ,  $\text{CH}_D$  e  $\text{CH}_L$  estão associados à natureza hidrofílica da quitosana fornecido pelos grupos amina protonados e sua afinidade com a água, que é gradualmente diminuída com a inserção dos grupos DEAE e dodecila (Tabela 6). Esta tendência para espessura e PVA também foi relatada quando óleos são adicionados a filmes de quitosana (VALDERRAMA, ALBARRACÍN, ALGECIRA, 2015) e após a neutralização dos grupos amina (CHANGA et al., 2019).

A adição de glicerol e sorbitol a filmes resultou em taxas de permeação de vapor de água variando de 1,02 a 1,67 ( $10^{-10} \text{ g m}^{-1} \text{ s}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$ ) e esses valores estão em estreita concordância com os relatados por PARK e colaboradores (2002). Para filmes preparados com  $\text{CH}_C$  e  $\text{CH}_D$ , a PVA aumentou apenas com as porcentagens de sorbitol. Por exemplo, sem plastificantes, a PVA para  $\text{CH}_C$  e  $\text{CH}_D$  foi de 1,29 e 1,33 e, com a adição de sorbitol, aumentou para 1,67 e 1,65  $10^{-10} \text{ g m}^{-1} \text{ s}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$ , respectivamente (Tabela 6). Por outro lado, a adição de glicerol não alterou significativamente a PVA

para filmes de CH<sub>C</sub> e CH<sub>D</sub> e, independente da porcentagem de glicerol, os valores permaneceram na faixa de  $1,2 - 1,4 \cdot 10^{-10} \text{ g m}^{-1} \text{ s}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$  (Tabela 6). A mesma tendência também foi observada em relação ao efeito do sorbitol na espessura dos filmes CH<sub>C</sub> e CH<sub>D</sub>, que aumentaram de 42,0 e 42,2  $\mu\text{m}$  para  $53,1 \pm 2$  e  $55,2 \pm 1 \mu\text{m}$ , respectivamente, enquanto a adição de glicerol aumentou apenas ligeiramente a espessura do filme. para CH<sub>D</sub>, de 42,2  $\mu\text{m}$  a 46,8  $\mu\text{m}$ . Para os filmes preparados com CH<sub>L</sub>, DEAE-CH<sub>L</sub> e DEAE-CH<sub>L</sub>-Dod, a PVA apresentou uma tendência a diminuir para formulações com 5% e 10% de plastificante (Figura. 32b e Tabela 6) e depois mudou para um aumento de 20%, com exceção das formulações de sorbitol-CH<sub>L</sub> que não mudaram e a PVA permaneceu em torno de  $1,6 \cdot 10^{-10} \text{ g m}^{-1} \text{ s}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$  (Tabela 6). A adição de glicerol e sorbitol aumentou continuamente a espessura desses filmes, indicando que os plastificantes proporcionam uma superfície mais hidrofílica, contribuindo para o aumento da adsorção de moléculas de água e do inchamento dos filmes.

**Figura 32** - Permeabilidade ao vapor de água e espessura dos filmes preparados com quitosana e seus derivados. (a) sem plastificante e com porcentagens crescentes de (b) glicerol e (c) sorbitol.



**Tabela 6** - Permeabilidade média ao vapor de água dos filmes de quitosana preparados com porcentagens crescentes de glicerol e sorbitol, acondicionados em umidade relativa de 53%.

| PVA x 10 <sup>-10</sup> (g m <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> Pa <sup>-1</sup> ) |                        |                          |                         |                          |                          |                          |                         |
|-------------------------------------------------------------------------------|------------------------|--------------------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|-------------------------|
| Filme                                                                         | Controle               | Glicerol                 |                         |                          | Sorbitol                 |                          |                         |
|                                                                               | 0                      | 5%                       | 10%                     | 20%                      | 5%                       | 10%                      | 20%                     |
| CH <sub>C</sub>                                                               | 1,29±0,21 <sup>A</sup> | 1,41±0,09 <sup>A</sup>   | 1,47 ±0,09 <sup>A</sup> | 1,32 ±0,21 <sup>A</sup>  | 1,34 ±0,12 <sup>A</sup>  | 1,41 ±0,20 <sup>A</sup>  | 1,67 ±0,19 <sup>A</sup> |
| CH <sub>D</sub>                                                               | 1,33±0,26 <sup>A</sup> | 1,31±0,08 <sup>A</sup>   | 1,34±0,40 <sup>A</sup>  | 1,22±0,04 <sup>A</sup>   | 1,30±0,23 <sup>A</sup>   | 1,56±0,54 <sup>A</sup>   | 1,65±0,53 <sup>A</sup>  |
| CH <sub>L</sub>                                                               | 1,60±0,18 <sup>A</sup> | 1,34±0,09 <sup>A</sup>   | 1,38±0,30 <sup>A</sup>  | 1,60±0,28 <sup>A</sup>   | 1,62±0,12 <sup>A</sup>   | 1,63±0,32 <sup>A</sup>   | 1,62±0,09 <sup>A</sup>  |
| DEAE-CH <sub>L</sub>                                                          | 1,29±0,13 <sup>A</sup> | 1,19±0,15 <sup>A</sup>   | 1,45±0,26 <sup>A</sup>  | 1,32±0,14 <sup>A</sup>   | 1,46±0,15 <sup>A</sup>   | 1,45±0,12 <sup>A</sup>   | 1,22±0,14 <sup>A</sup>  |
| DEAE-CH <sub>L</sub> -Dod                                                     | 1,22±0,25 <sup>B</sup> | 1,14±0,02 <sup>A,B</sup> | 1,02±0,09 <sup>B</sup>  | 1,30±0,13 <sup>A,B</sup> | 1,23±0,10 <sup>A,B</sup> | 1,11±0,10 <sup>A,B</sup> | 1,45±0,08 <sup>A</sup>  |

**Tabela 7** - Espessura média dos filmes de quitosana preparados com porcentagens crescentes de glicerol e sorbitol a uma umidade relativa de 53%.

| Espessura média (µm)      |                       |                       |                         |                         |                      |                       |                       |
|---------------------------|-----------------------|-----------------------|-------------------------|-------------------------|----------------------|-----------------------|-----------------------|
| Filme                     | Controle              | Glicerol              |                         |                         | Sorbitol             |                       |                       |
|                           | 0                     | 5%                    | 10%                     | 20%                     | 5%                   | 10%                   | 20%                   |
| CH <sub>C</sub>           | 42,0 ± 1 <sup>B</sup> | 46,1 ± 2 <sup>B</sup> | 43,3 ± 2 <sup>B</sup>   | 41,1 ± 1 <sup>B</sup>   | 43,2± 2 <sup>B</sup> | 44,1 ± 4 <sup>B</sup> | 53,1 ± 2 <sup>A</sup> |
| CH <sub>D</sub>           | 42,2 ± 2 <sup>C</sup> | 47,5 ± 1 <sup>B</sup> | 46,4 ± 1 <sup>B,C</sup> | 46,8 ± 1 <sup>B,C</sup> | 49,8± 4 <sup>B</sup> | 55,8± 1 <sup>A</sup>  | 55,2 ± 1 <sup>A</sup> |
| CH <sub>L</sub>           | 45,8 ± 2 <sup>A</sup> | 45,0 ± 1 <sup>A</sup> | 43,9 ± 1 <sup>A</sup>   | 47,3 ± 1 <sup>A</sup>   | 44,5± 1 <sup>A</sup> | 44,4 ± 2 <sup>A</sup> | 45,4 ± 1 <sup>A</sup> |
| DEAE-CH <sub>L</sub>      | 37,6± 1 <sup>B</sup>  | 37,8± 1 <sup>B</sup>  | 39,7± 1 <sup>A</sup>    | 39,5± 1 <sup>A</sup>    | 39,9± 1 <sup>A</sup> | 39,3± 1 <sup>A</sup>  | 39,8± 3 <sup>A</sup>  |
| DEAE-CH <sub>L</sub> -Dod | 29,7± 2 <sup>C</sup>  | 30,5± 8 <sup>C</sup>  | 33,4± 1 <sup>B</sup>    | 39,7± 2 <sup>A</sup>    | 30,4± 1 <sup>C</sup> | 32,5± 1 <sup>B</sup>  | 39,5± 1 <sup>A</sup>  |

\*Resultados expressos em (média ± desvio padrão). Letras diferentes na mesma linha para formulações do mesmo plastificante indicam uma diferença significativa (p <0,05) de acordo com o teste de Tukey.

#### 4.2.7 Propriedades mecânicas

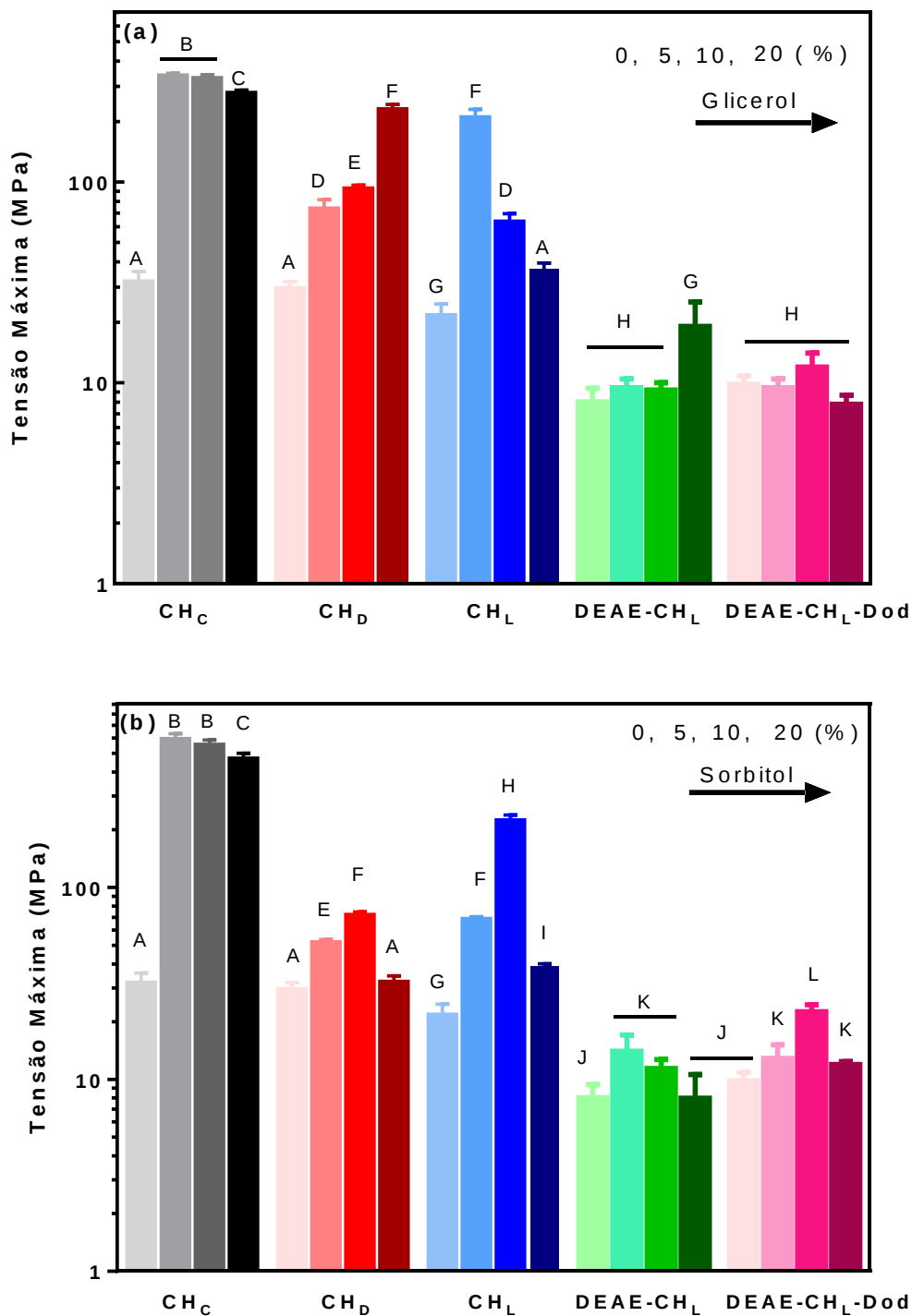
As propriedades mecânicas dos filmes biopoliméricos foram determinadas com base na resposta apresentada por cada composição em estudo por meio do ensaio de tração uniaxial dos filmes. Conhecer as propriedades mecânicas é um fator de extrema importância para direcionar uma possível aplicação a um material, uma vez que elas fornecem informações a respeito de sua resistência. No presente trabalho, filmes biopoliméricos de diferentes composições e massas moleculares tiveram suas propriedades mecânicas estudadas por meio dos parâmetros: módulo de elasticidade, tensão máxima e deformação na ruptura. Sabe-se que, dentre os fatores que mais afetam o comportamento mecânico dos polímeros, a massa molecular, estrutura química e plastificante estão entre os principais parâmetros.

Para realizar os ensaios de tração, os filmes foram previamente acondicionados em UR 53 %, de modo a evitar ao máximo que a umidade interferisse nos resultados obtidos. Em pesquisa realizada por EPURE e colaboradores (2011), destacou-se a importância de se controlar a umidade relativa na realização de ensaios mecânicos, uma vez que se as propriedades forem medidas em alta umidade, a água pode atuar como plastificante alterando as propriedades dos filmes. Em contrapartida, valores muito baixos de umidade relativa, podem resultar em filmes muito secos.

As Figuras 33 e 34 mostram os efeitos do aumento das porcentagens de plastificante na tensão máxima e módulo de elasticidade. Os filmes preparados com CH<sub>C</sub>, CH<sub>D</sub> e CH<sub>L</sub> sem plastificantes apresentaram valores do parâmetro tensão de 32,06 MPa, 29,69 MPa e 21,84 MPa, respectivamente. Estes dados revelam que a massa molecular tem um efeito significativo na tensão máxima dos filmes que, como esperado, aumenta com o aumento da massa molecular da quitosana (PARK, MARSH, RHIM, 2002), sendo semelhantes aos relatados recentemente para quitosanas de  $M_w$  similares (HAMDI et al., 2019). Além disso, o glicerol e o sorbitol afetaram de forma semelhante o módulo de elasticidade e a tensão máxima, ou seja, em geral a adição dos plastificantes em porcentagem de 5% e 10% aumentaram o módulo de elasticidade e a tensão, sendo dependente da  $M_w$  e da modificação química com os grupos DEAE e Dod. A adição de 5% de plastificante aos filmes de CH<sub>C</sub>, CH<sub>D</sub> e CH<sub>L</sub> aumentou seus valores de tensão máxima de 2,5 a 10 vezes, enquanto para 20% de glicerol ou sorbitol, tanto a tensão máxima, quanto o módulo de elasticidade começaram a diminuir, embora ainda

permanecendo acima dos valores obtido para filmes sem plastificantes (Figuras 33a e 33b).

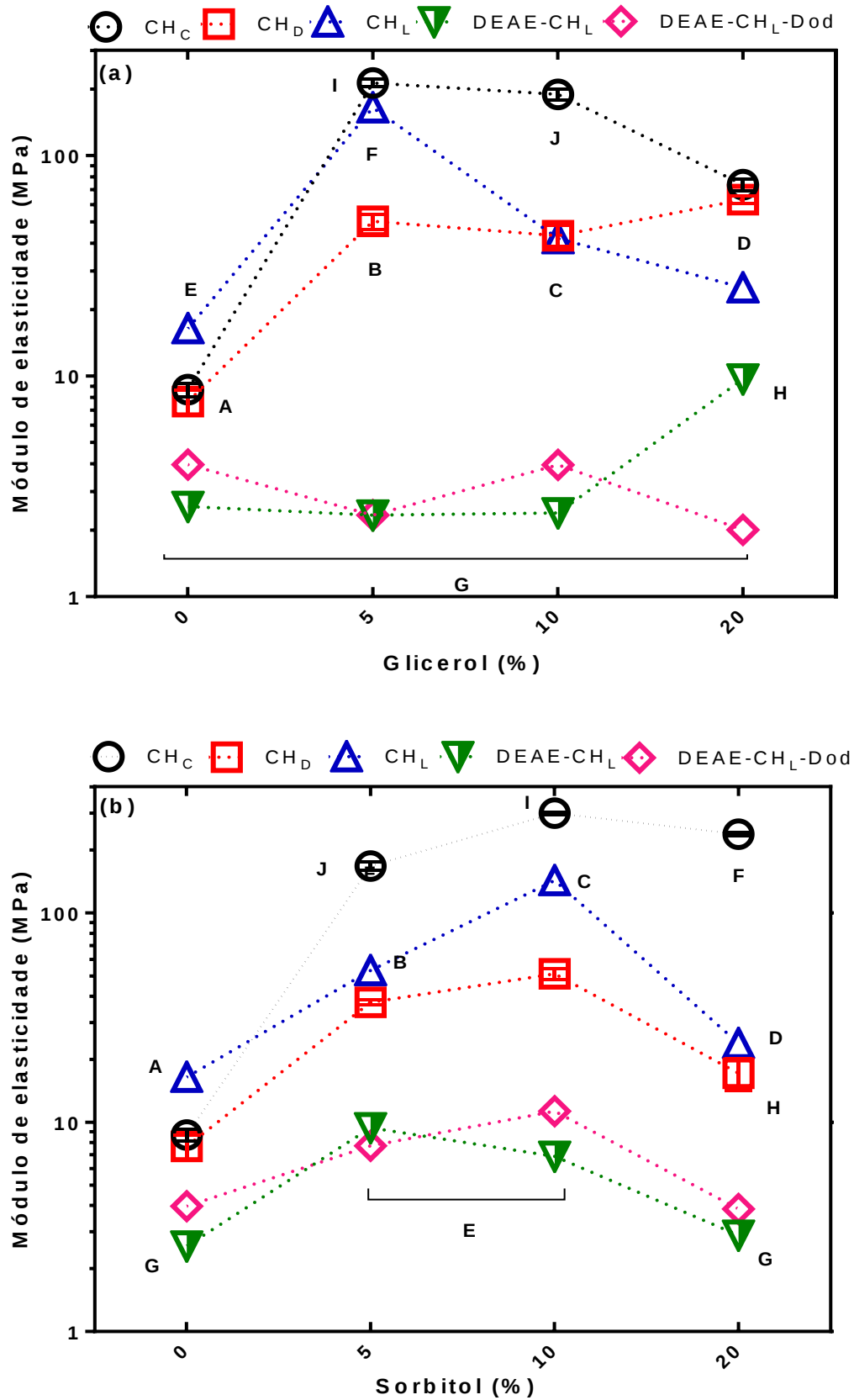
**Figura 33** - Tensão máxima dos filmes de quitosana preparados com concentrações crescentes de glicerol (a) e sorbitol (b).



\*Valores correspondem a  $n = 5 \pm$  desvio padrão. Letras diferentes indicam uma diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

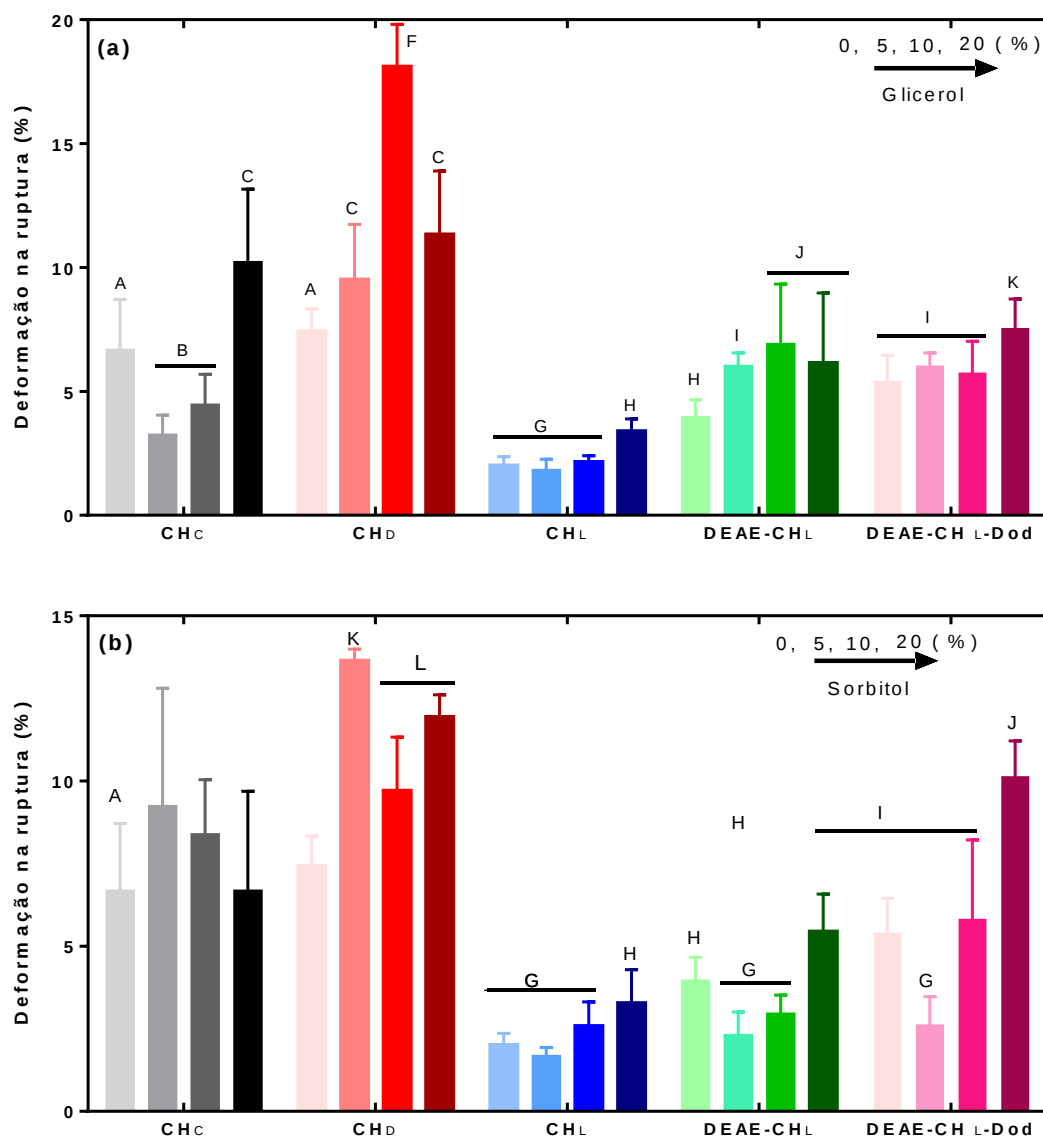
Além disso, nota-se que os plastificantes aumentaram a tensão mais abruptamente para  $\text{CH}_\text{C}$  do que para os filmes preparados com  $\text{CH}_\text{D}$  e  $\text{CH}_\text{L}$  e seus derivados, levando a valores de até cerca de 590 MPa e corroborando a importância de  $M_w$  para resistência à tração. Os valores do módulo de elasticidade também refletiram as porcentagens crescentes de plastificantes e a mesma tendência foi observada, deixando claro que a composição pode ser ajustada para atingir as propriedades necessárias (Figura 34).

**Figura 34** - Módulo de elasticidade dos filmes de quitosana preparados com concentrações crescentes de glicerol (a) e sorbitol (b).



Como mostrado na Figura 35, a adição de plastificantes também resultou em um aumento na flexibilidade e extensibilidade, e, semelhante aos efeitos produzidos na tensão máxima e no módulo de elasticidade, a deformação na ruptura dos filmes foi dependente da estrutura plastificadora, grau de desacetilação e  $M_w$ . A adição de glicerol a filmes preparados com  $CH_C$  (208 kDa) e  $CH_D$  (143 kDa) forneceu os maiores valores de deformação, com aumentos máximos de 10,2% e 18% respectivamente (Figura 35a). Além disso, a adição de glicerol resultou em aumentos ligeiramente maiores na deformação do que o sorbitol, indicando que as forças intermoleculares entre as cadeias poliméricas foram afetadas diferentemente pelos plastificantes. O GD também desempenhou um papel importante para este parâmetro, o processo de desacetilação reduziu a  $M_w$  de 208 para 143 kDa, a adição de glicerol proporcionou maiores valores de deformação na ruptura para  $CH_D$  do que para  $CH_C$ . Este resultado indica que os grupos amina desempenham um papel importante no fornecimento de flexibilidade nos filmes, resultando de interações mais eficazes entre os plastificantes e as cadeias poliméricas. Além disso, graus crescentes de acetilação afetam a conformação e flexibilidade da cadeia polimérica, e, quanto maior o grau de acetilação (menor disponibilidade de grupos amina), menos flexíveis são os filmes (HAMDI et al., 2019). O efeito de  $M_w$  é claramente visto comparando a deformação na ruptura para  $CH_D$  (143 kDa) e  $CH_L$  (11 kDa), cujos maiores valores foram 18% e 3,4%, respectivamente (Fig. 5).

**Figura 35** - Deformação na ruptura de filmes preparados com quitosana e seus derivados, aumentando as porcentagens de (a) glicerol e (b) sorbitol.



\* Valores correspondem a  $n = 5 \pm$  desvio padrão. Letras diferentes indicam uma diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

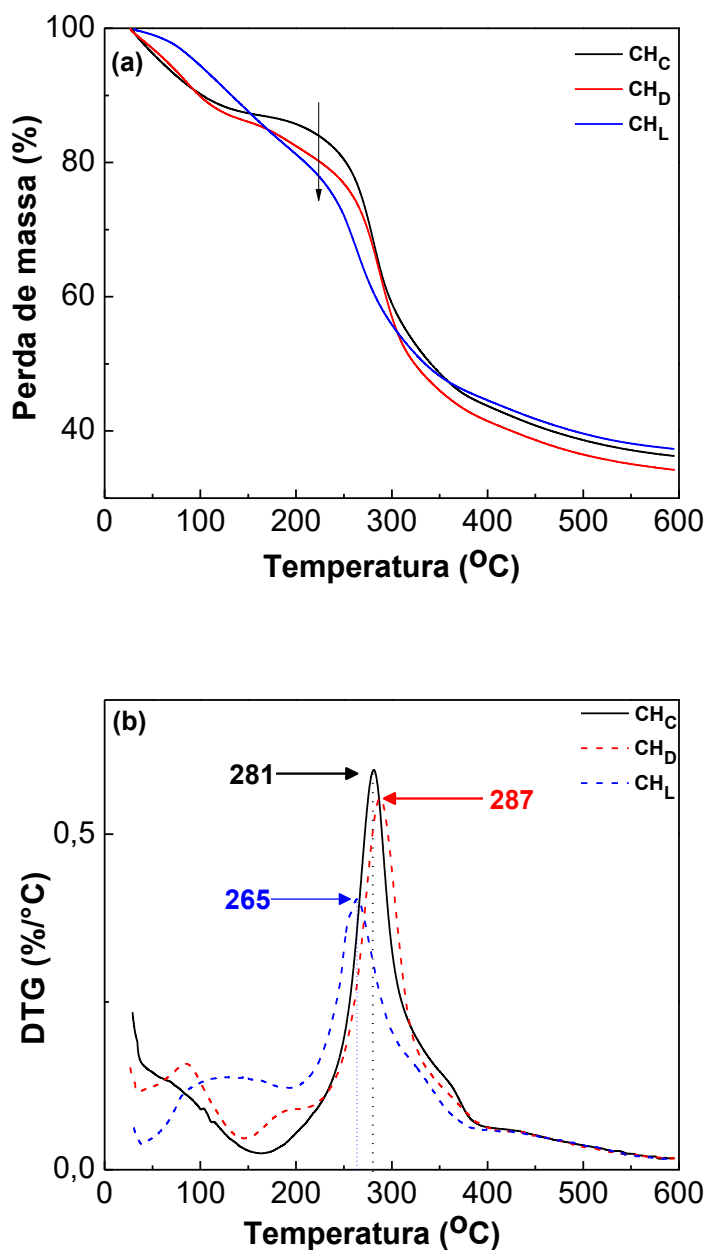
#### 4.2.8 Análise Termogravimétrica

A estabilidade térmica dos filmes de quitosana e seus derivados foi avaliada por meio de análise termogravimétrica (TG) e a Figura 36 mostra as curvas de TG e suas derivadas (DTG). O uso da DTG torna mais fácil a compreensão dos dados obtidos nas análises, pois realiza uma espécie de tradução da curva em degraus (TG), proporcionando que as informações sejam visivelmente mais esclarecidas, fornecendo

uma série de picos, cujas áreas correspondem a variação de massa da amostra (ganho ou perda) em função da temperatura (MOTHÉ e AZEVEDO, 2009).

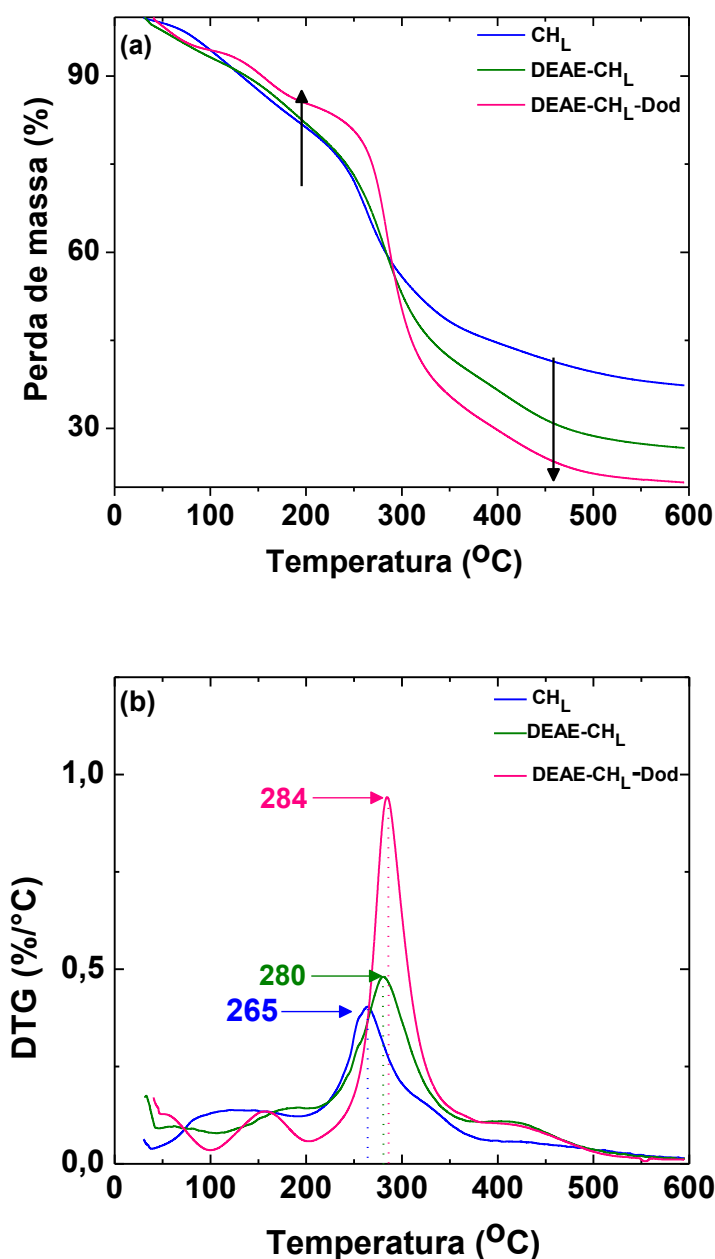
Os termogramas são caracterizados por uma perda de massa em duas etapas, sendo a primeira relacionada à perda de água. Como pode ser visto na Figura 36a, o primeiro evento térmico ocorre desde o início da corrida até 200 ° C e refere-se à perda de água adsorvida na cadeia de quitosana e ligada por meio de ligação de hidrogênio, enquanto o segundo evento térmico ocorre na faixa de 250 ° C a 450 ° C e refere-se à degradação térmica da cadeia de quitosana, que corresponde a maior perda de massa. (FIORI, GABIRABA, 2014; ZAWADZKI, KACZMAREK, 2010). A partir da Figura 36a, é também visto que a temperatura para a taxa de degradação máxima para CH<sub>C</sub>, CH<sub>D</sub> e CH<sub>L</sub> é primeiro deslocada para uma temperatura mais elevada (de 281 a 287 ° C) quando o grau de desacetilação (GD) aumentou de 77 % a 97% e diminuiu de 287 para 265 ° C quando o massa molecular foi diminuído de 143 kDa para 11 kDa. Assim, o grau de desacetilação tem uma influência significativa na estabilidade térmica da quitosana e para amostras mais desacetiladas, o aumento da ligação de hidrogênio intramolecular e intermolecular ajuda a aumentar a estabilidade térmica (HAMDI et al., 2019). Além disso, a M<sub>w</sub> inferior diminui o emaranhamento das cadeias de polímero, diminuindo a estabilidade térmica.

**Figura 36** - Curvas de TG-DTG para os filmes de quitosana comercial ( $\text{CH}_C$ ), quitosana desacetilada ( $\text{CH}_D$ ) e quitosana despolimerizada ( $\text{CH}_L$ ).



As Figuras 37a e 37b também mostram que a modificação com os grupos DEAE e Dod resultou em alterações significativas na análise térmica dos derivados quando comparado com a amostra inicial  $\text{CH}_L$ . O primeiro evento térmico ocorreu na faixa de 30 a 200 °C e é atribuído principalmente à perda de água. Além disso, a perda de água aumentou com a inserção dos grupos DEAE e dodecil, de 7% ( $\text{CH}_L$ ) para 8,6% e 10,1%, para DEAE- $\text{CH}_L$  e DEAE- $\text{CH}_L$ -Dod, respectivamente.

**Figura 37** – Curvas de TG-DTG para os filmes de quitosana despolimerizada ( $\text{CH}_L$ ) e derivados de quitosana DEAE- $\text{CH}_L$  e DEAE- $\text{CH}_L$ -Dod.



A inserção de grupos funcionais pode quebrar a interação de ligação de hidrogênio intramolecular e intermolecular, alterando as quantidades relativas de moléculas de água adsorvidas e ligadas através da ligação de hidrogênio (HAMDI et al., 2019). Além disso, como resultado do reforço de interações hidrofóbicas, a temperatura máxima de degradação foi deslocada para temperaturas mais altas, indicando um aumento na estabilidade térmica fornecida pelos grupos DEAE e Dod. A Tabela 8 mostra todos esses dados juntos e revela que, para derivados anfifílicos, a massa

residual diminuiu com a modificação de DEAE e Dod, com valores respectivos de 27% e 20,9% para DEAE-CH<sub>L</sub> e DEAE -CH<sub>L</sub>-Dod, respectivamente.

**Tabela 8** - Valores de temperatura máxima de degradação e porcentagens de massa perdida e porcentagens de massa residual para os polímeros.

| Filmes                    | Temperatura máxima (°C) | Perda de massa de H <sub>2</sub> O (%) | Perda de massa de quitosana (%) | Massa residual (%) |
|---------------------------|-------------------------|----------------------------------------|---------------------------------|--------------------|
| CH <sub>C</sub>           | 281                     | 12,5                                   | 51,3                            | 36,2               |
| CH <sub>D</sub>           | 287                     | 13,3                                   | 52,2                            | 34,5               |
| CH                        | 265                     | 7,0                                    | 55,4                            | 37,6               |
| DEAE-CH <sub>L</sub>      | 280                     | 8,6                                    | 64,4                            | 27                 |
| DEAE-CH <sub>L</sub> -Dod | 284                     | 10,1                                   | 69                              | 20,9               |

### 4.3 ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

#### 4.3.1 Avaliação do efeito da concentração da quitosana e dos derivados na inibição do crescimento do fungo *Aspergillus flavus*

A atividade antifúngica contra o fungo *Aspergillus flavus* foi avaliada a partir do crescimento micelial como descrito anteriormente no item 3.6.2 (GABRIEL, TIERA, DE OLIVEIRA TIERA, 2015) no sétimo dia de cultivo, com o fungo sendo inoculado em meio de cultura contendo concentrações crescentes de anfifílicos. Demonstrou-se que a atividade antifúngica de quitosanas anfifílicas contra *A. flavus* depende muito da massa molecular e do grau de substituição (DIAS et al., 2018). Como pode ser observado na Figura 38, independente da estrutura química, todas as amostras de quitosana exibiram alguma atividade antifúngica contra *A. flavus* e os índices de inibição aumentaram de uma maneira dependente da concentração. Esta atividade da quitosana tem sido atribuída principalmente à adsorção de cadeias de quitosana na parede celular e na membrana celular, desencadeada principalmente pelas interações eletrostáticas, afetando os esporos e a população de conidióforos (DIAS et al., 2018). Assim, o aumento do GD de 77% para 97% resultou em índices de inibição mais altos

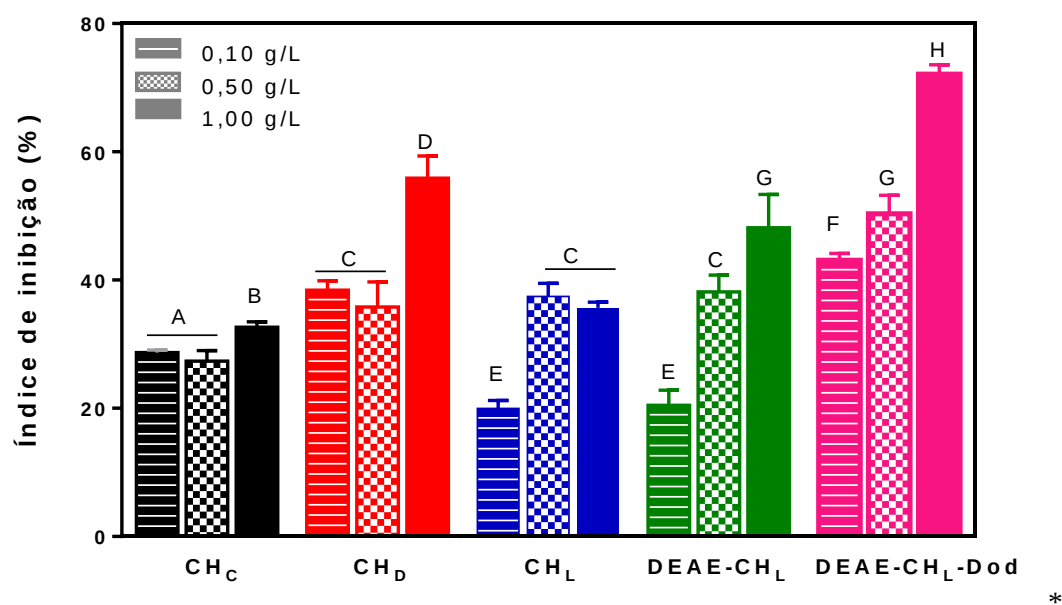
para o CH<sub>D</sub> do que para o CH<sub>C</sub>, como resultado do aumento da disponibilidade de grupos amina (Figura 38 e Tabela 9). Para a CH<sub>L</sub>, a capacidade de inibição diminuiu o que pode ser atribuído a menor massa molecular desta amostra, o que, por sua vez, pode diminuir a adsorção na parede celular dos fungos. No entanto, como visto na Figura 38, a inserção de grupos DEAE e dodecil melhorou significativamente ( $p < 0,05$ ) o índice de inibição, atingindo mais de 70% para o derivado anfifílico DEAE-CH<sub>L</sub>-Dod a 1,0 g L<sup>-1</sup>.

**Tabela 9** - Valores dos índices de inibição (%) obtidos para os diferentes derivados de quitosana testados contra o fungo *Aspergillus flavus*.

| Concentração<br>(g L <sup>-1</sup> ) | Índice de inibição (%)    |                           |                           |                           |                           |
|--------------------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
|                                      | CH <sub>C</sub>           | CH <sub>D</sub>           | CH <sub>L</sub>           | DEAE-CH <sub>L</sub>      | DEAE-CH <sub>L</sub> -Dod |
| 0,1                                  | 28,70 ± 0,37 <sup>A</sup> | 38,44 ± 1,46 <sup>C</sup> | 19,97 ± 1,26 <sup>E</sup> | 20,47 ± 2,36 <sup>E</sup> | 43,09 ± 1,07 <sup>F</sup> |
| 0,5                                  | 27,34 ± 1,67 <sup>A</sup> | 35,79 ± 3,92 <sup>C</sup> | 37,44 ± 2,06 <sup>C</sup> | 38,15 ± 2,64 <sup>C</sup> | 50,32 ± 2,88 <sup>G</sup> |
| 1,0                                  | 32,64 ± 0,87 <sup>B</sup> | 55,91 ± 3,44 <sup>D</sup> | 35,65 ± 0,89 <sup>C</sup> | 48,17 ± 5,18 <sup>G</sup> | 66,07 ± 5,00 <sup>H</sup> |

\*Os resultados estão expressos na forma de média ± desvio padrão. Letras diferentes indicam uma diferença significativa a  $p < 0,05$ , de acordo com o teste de Tukey.

**Figura 38** - Efeito da concentração no índice de inibição do fungo *Aspergillus flavus*.

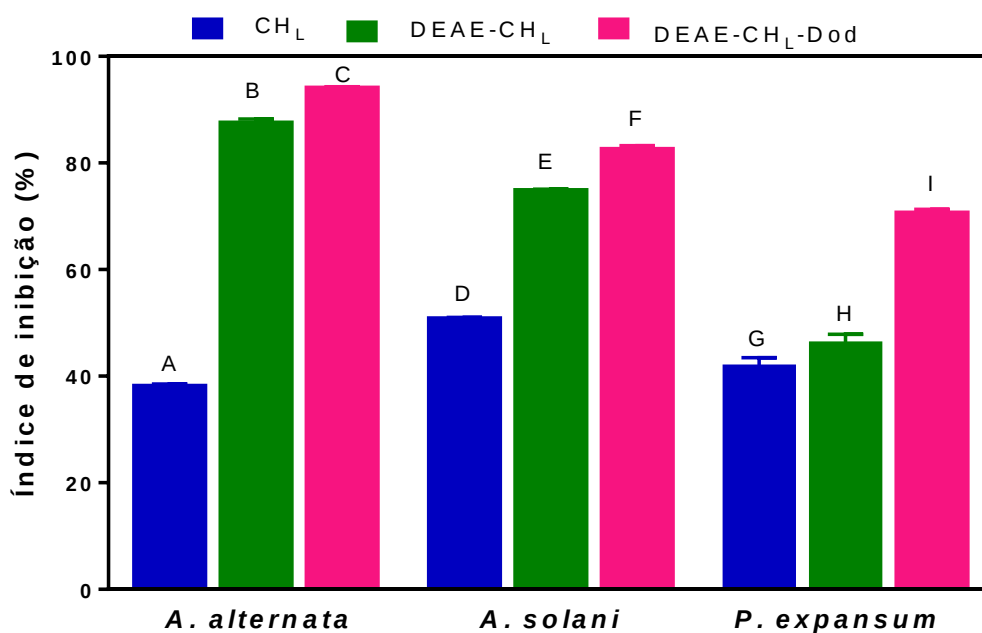


\*Resultados expressos em (média ± desvio padrão). Letras diferentes indicam uma diferença significativa a  $p < 0,05$ , de acordo com o teste de Tukey.

#### 4.3.2 Avaliação do efeito da concentração da quitosana e dos derivados na inibição do crescimento do fungo *Alternaria solani*, *Alternaria alternata* e *Penicillium expansum*

Os fungos filamentosos *Alternaria solani*, *Alternaria alternata* e *Penicillium expansum* estão entre os agentes causadores da deterioração de vários frutos (OLIVEIRA JUNIOR, MELO, FRANCO, 2012), sendo responsáveis por perdas durante o armazenamento. Os índices de inibição para estes fungos foram determinados como relatado anteriormente no item 3.6.3 (OLIVEIRA JR et al., 2008; LANGVAD, 1999). As modificações químicas também melhoraram a atividade antifúngica da quitosana despolimerizada (CH<sub>L</sub>) e o derivado mais eficaz, DEAE-CH<sub>L</sub>-Dod, inibiu o crescimento de *A. solani*, *A. alternata* e *P. expansum*, por 94,2, 83 e 71%, respectivamente (Figura 39).

**Figura 39-** Atividades antifúngicas comparativas de quitosanas de baixas massas moleculares contra *Alternaria alternata*, *Alternaria solani*, *Penicillium expansum*.



\*Resultados expressos em (média  $\pm$  desvio padrão). Letras diferentes indicam uma diferença significativa a  $p < 0,05$ , de acordo com o teste de Tukey.

Atividades antifúngicas de várias quitosanas e seus derivados contra estes fungos foram relatadas por muitos autores. GUO e colaboradores (2013) relataram um índice inibitório de cerca de 50% contra *A. solani* por ação da quitosana desacetilada

(GD 97%) em uma concentração de  $0,5 \text{ g L}^{-1}$ , enquanto YOUNES e colaboradores (2014) indicaram que as quitosanas com menor grau de acetilação foram mais eficientes contra *A. solani* sem dependência da massa molecular. Esses estudos confirmam a importância da densidade de carga positiva para a atividade antifúngica da quitosana, como mostrado para a maior atividade da  $\text{CH}_D$  quando comparado ao  $\text{CH}_C$  contra o fungo *A. flavus* (Figura 38). BADAWEY e RABEA (2013) também relataram a atividade antifúngica de derivados de N- (cinamil) quitosana contra *Alternaria alternata*, avaliada pela técnica de crescimento radial micelial in vitro. Esses autores verificaram que a inibição de 50% do crescimento micelial ( $\text{EC}_{50}$ ,  $672 \text{ mg / L}$ ) de *A. alternata* foi mais efetiva com o derivado N- (o-metoxicinamil) quitosana, sugerindo que a natureza anfipática do derivado é importante para melhorar a atividade antifúngica da quitosana, como observado no presente estudo para os derivados DEAE- $\text{CH}_L$  e DEAE- $\text{CH}_L$ -Dod contra *A. solani* e *A. alternata* na Figura 39. A inibição do crescimento micelial de *P. expansum* proporcionada pelos filmes de  $\text{CH}_L$  e seus derivados apresentou a mesma tendência. A inibição fornecida pela  $\text{CH}_L$  foi de cerca de 40%, semelhante à obtida contra os outros fungos testados e de acordo com a relatada recentemente para a quitosana de alto peso molecular (350 kDa) (WANG et al., 2014). No geral, a modificação com os grupos DEAE e dodecila melhorou significativamente ( $p < 0,05$ ) a atividade antifúngica do  $\text{CH}_L$ , tornando esses derivados potenciais revestimentos e filmes comestíveis para grãos e frutas.

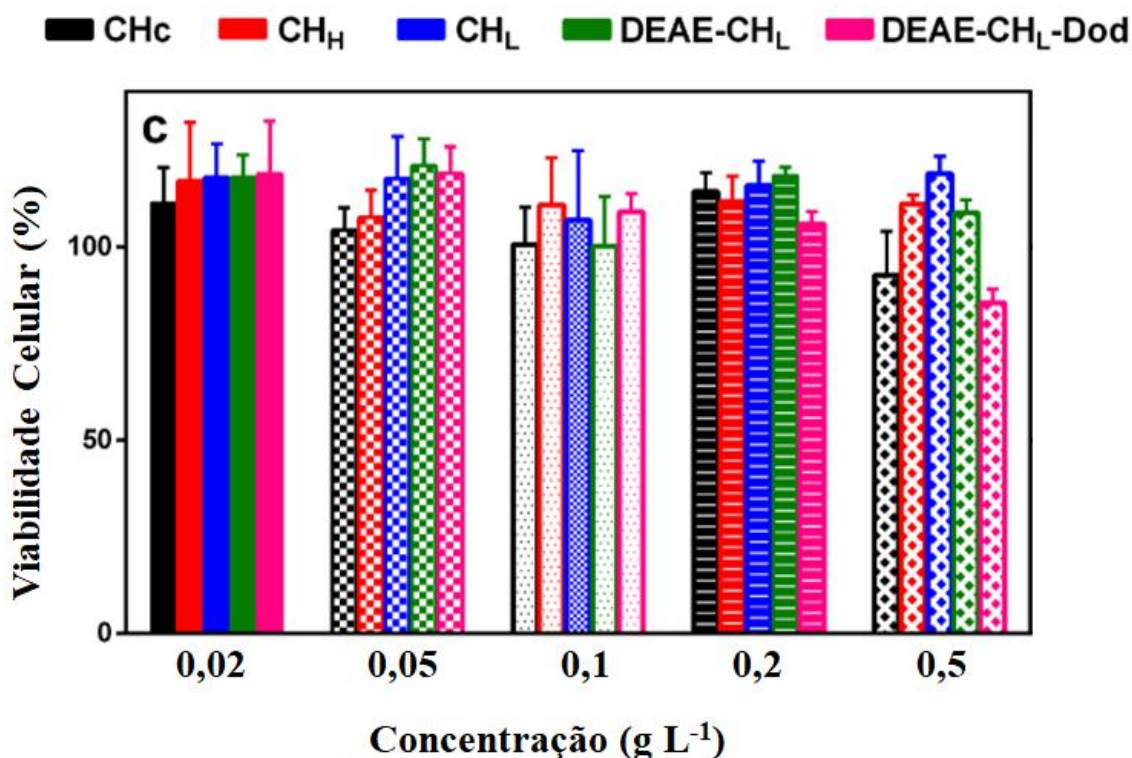
#### 4.4 ESTUDO DA VIABILIDADE CELULAR: CITOTOXICIDADE DOS POLÍMEROS

O potencial de aplicação da quitosana e seus derivados como revestimento é baseado em sua natureza atóxica. A própria quitosana é considerada um polissacarídeo não tóxico e essa característica pode ser comprovada por meio de muitos estudos que utilizam quitosana de diferentes massas moleculares e graus de desacetilação, bem como para alguns de seus derivados (HUANG, KHOR, LIM, 2004). No entanto, sabe-se que alguns grupos podem conferir algum grau de toxicidade a quitosana e esse assunto foi revisado adequadamente por KEAN e THANOU (2010). A citotoxicidade da quitosana e seus derivados têm sido extensivamente estudada e, dependendo do grau de substituição, os grupos catiônicos podem conferir toxicidade a quitosana.

No presente trabalho, as modificações químicas realizadas por meio da modificação química com grupos DEAE e dodecila, podem comprometer o caráter não tóxico da quitosana e, levando em consideração a aplicação potencial desses derivados, os estudos de citotoxicidade *in vitro* da quitosana e seus derivados foram avaliados em fibroblastos 3T3/NIH com o ensaio MTS e expressos em termos de porcentagem de viabilidade celular. Os fibroblastos sintetizam componentes da matriz extracelular dos tecidos e, devido a sua grande abundância no organismo, são células que têm grandes chances de entrarem em contato com os polímeros.

A viabilidade celular foi avaliada na presença de concentrações crescentes dos polímeros sintetizados no presente estudo, conforme é apresentado na Figura 40. Observa-se que para todos os polímeros estudados, a viabilidade celular se apresentou acima de 80%, independente da concentração. Esses resultados demonstram que mesmo com as modificações químicas realizadas, os derivados mantiveram as características não citotóxicas da quitosana (JAYAKUMAR et al., 2010). Como pode ser visto na Figura 40, em concentrações mais baixas de polímeros, nenhuma diferença significativa foi observada entre os polímeros.

**Figura 40-** Viabilidade celular de células fibroblastos 3T3/NIH, na presença dos polímeros.



\*Resultados expressos em (média ± desvio padrão).

#### 4.5 ANÁLISE QUALITATIVA DAS SOLUÇÕES FILMOGÊNICAS EM FRUTOS

No presente estudo, os frutos foram cobertos com soluções filmogênicas de quitosana e os testes qualitativos reforçam a hipótese que a modificação química na estrutura da quitosana intensifica sua ação no processo de conservação de alimentos. É possível observar nas Figuras 41, 42 e 43, o aspecto visual de tomates, maçãs e banana, após um intervalo de tempo de armazenamento.

**Figura 41** - Aspecto visual após 15 dias de armazenamento à 25 °C. Tomate à esquerda foi revestido com filme PVC e à direita o tomate que foi revestido com derivado anfifílico de quitosana (DEAE-CH<sub>3</sub>-Dod).



Fonte: Autora.

**Figura 42** - Aspecto visual após 15 dias de armazenamento à 25 °C. À esquerda maçã que foi revestida com filme PVC e à direita a maçã que foi revestida com derivado anfifílico de quitosana (DEAE-CH<sub>3</sub>-Dod).



Fonte: Autora.

**Figura 43** - Aspecto visual após 5 dias de armazenamento à 25 °C. À esquerda banana que foi revestida com filme PVC e à direita a banana que foi revestida com derivado anfifílico de quitosana (DEAE-CH<sub>L</sub>-Dod).



Fonte: Autora.

## 5 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no presente estudo demonstraram que uma quitosana com alto grau de desacetilação pode ser obtida de modo eficiente a partir do processo reacional de hidrólise básica, visto que o grau de desacetilação obtido para quitosana comercial foi de 77% e após a reação de desacetilação o valor obtido foi de 97%, conforme a caracterização realizada por RMN  $^1\text{H}$ . Esta técnica também foi utilizada para avaliar os efeitos dos demais processos reacionais realizados e permitiu concluir que os procedimentos de sínteses utilizados, tanto com grupos DEAE quanto com grupos dodecila são viáveis para a obtenção de derivados de quitosana. Os dados de CPG mostraram a variação da massa molecular dos polímeros que foram submetidos à reação de desacetilação e a despolimerização da cadeia polimérica por oxidação em meio ácido. Os resultados dos ensaios microbiológicos em solução demonstraram que a modificação hidrofóbica na cadeia polimérica da quitosana aumentou consideravelmente a atividade antifúngica.

As modificações químicas na estrutura da quitosana resultaram em grandes alterações na coloração dos filmes. Os derivados DEAE-CH<sub>L</sub> e DEAE-CH<sub>L</sub>-Dod combinam propriedades interessantes que resultaram da modificação com grupos amina terciários. Primeiramente, forneceu à quitosana uma densidade de carga positiva em uma faixa mais ampla de pH e permitiu maior solubilidade, o que significa bom potencial para aplicação como um filme comestível. Além disso, a solubilidade pode ser ajustada pela composição com os plastificantes. A presença dos grupos DEAE e dodecila diminui a permeabilidade ao vapor de água e a espessura dos filmes, proporcionando uma atividade antifúngica significativa contra todos os fungos testados e, ao mesmo tempo, não conferindo toxicidade a quitosana. As propriedades mecânicas podem ser melhoradas com a adição de plastificantes e, portanto, o ajuste apropriado da composição química e da massa molecular pode melhorar outras propriedades, expandindo as aplicações potenciais desses filmes para revestimentos. No geral, a modificação com os grupos DEAE e dodecila proporcionou aos filmes atividades antifúngicas melhoradas contra alguns fungos comuns, conferindo potencial a esses derivados como revestimentos e filmes comestíveis para grãos e frutas.

## **6 DESTINAÇÃO DOS RESÍDUOS GERADOS NO DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO**

Os resíduos gerados durante o desenvolvimento do presente trabalho foram devidamente tratados antes de serem descartados. As águas de lavagem da quitosana obtidas após o processo de desacetilação, apresentavam elevado pH, logo tiveram seu pH ajustado para aproximadamente 7 com a utilização de descartes de HCl, antes de serem descartadas na rede pública de esgoto. Os resíduos gerados durante a realização dos ensaios microbiológicos foram autoclavados a 121 °C por 20 minutos antes de serem descartados. Os demais resíduos cujo tratamento não pode ser realizado foram corretamente armazenados, identificados e encaminhados ao entreposto de resíduos do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE/UNESP).

## 7 REFERÊNCIAS

ACEVEDO-FANI, A. et al. Edible films from essential-oil-loaded nanoemulsions: Physicochemical characterization and antimicrobial properties. **Food Hydrocolloids**, v. 47, p. 168-177, 2015.

ASTM International. ASTM D882-12, **Standard Test Method for Tensile Properties of Thin Plastic Sheeting**, 2012.

ASTM International. ASTM E96/96-16: **Standard test methods for water vapor transmission of materials**, 2016.

AZEREDO, H. M. C. Encapsulação: aplicação à tecnologia de alimentos. **Alimentos e Nutrição**, v. 16, p. 89- 97, 2005.

AZEVEDO,V. V. C. et al. Quitina e Quitosana: aplicações como biomateriais. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 23, p. 27-34, 2007.

BADAWY, M.E.; RABEA, E.I. Synthesis and Structure-Activity Relationship of N-(Cinnamyl) Chitosan Analogs as Antimicrobial Agents. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 57, p. 185-192, 2013.

BAJIĆ, M. et al. Chitosan-Based Films with Incorporated Supercritical CO<sub>2</sub> Hop Extract: Structural, Physicochemical, and Antibacterial Properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 219, p. 261-268, 2019.

BEATRIZ, A.; ARAÚJO, Y. J. K.; LIMA, D. P. Glicerol: Um Breve Histórico e Aplicação em Sínteses Estereosseletivas. **Química Nova**, v. 34, p. 306-319, 2011.

CAMPANA-FILHO, S. P. et al. Extração estruturas e propriedades de  $\alpha$ - e  $\beta$ -quitina. **Química Nova**, v. 30, p. 644-650, 2007.

CASARIEGO A. et al. Chitosan/clay films' properties as affected by biopolymer and clay micro/nanoparticles' concentrations. **Food Hydrocolloids**, v. 23, p. 1895–1902, 2009.

CHANGA, W. et al. Zhong Preparation of chitosan films by neutralization for improving their preservation effects on chilled meat. **Food Hydrocolloids**, v. 90, p. 50–61, 2019.

DESBRIERES, J.; MARTINEZ, C.; RINAUDO, M. Hydrophobic derivatives of chitosan: Characterization and rheological behavior. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 19, p. 21-28, 1996

DIAS, A.M. et al. Insights on the Antifungal Activity of Amphiphilic Derivatives of Diethylaminoethyl Chitosan against *Aspergillus Flavus*. **Carbohydrate Polymers**, v. 196, p. 433-444, 2018.

DUTTA, P. K. et al. Perspectives for chitosan based antimicrobial films in food applications. **Food Chemistry**, 114, 1173 - 1182, 2009.

EPURE, V. et al. Structure and properties of glycerol-plasticized chitosan obtained by mechanical kneading. **Carbohydrate Polymers**, v.83, p.947- 952, 2011.

ERKMEN, O.; BARAZI, A.O. General Characteristics of Edible Films. **Journal of Food Biotechnology Research**, v. 2, 1-3, 2018.

ESCAMILLA - GARCÍA, M. et al. Physical, Structural, Barrier, and Antifungal Characterization of Chitosan–Zein Edible Films with Added Essential Oils. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, p. 2370, 2017.

FARIAS, M. G. et al. Caracterização físico-química de filmes comestíveis de amido adicionado de acerola. **Química Nova**, v. 35, p. 546-552, 2012.

FIAMINGO, A.; CAMPANA-FILHO, S. P. Structure, morphology and properties of genipin-crosslinked carboxymethylchitosan porous membranes. **Carbohydrate Polymers**, v. 143, p. 155 - 163, 2016.

FIORI, A.P.S.M.; GABIRABA, V.P. Preparação e caracterização de nanocompósitos poliméricos baseados em quitosana e argilo minerais. **Polímeros**, v. 24, p. 628-635, 2014.

FLORES - HERNÁNDEZ, C.G. et al. All Green Composites from Fully Renewable Biopolymers: Chitosan-Starch Reinforced with Keratin from Feathers. **Polymers**, v. 6, p. 686-705, 2014.

Frases de Madre Tereza de Calcutá. **O Segredo**, 2019. Disponível em: <<https://osegredo.com.br/frases-de-madre-tereza-de-calcuta/>>. Acesso em: 06 de agosto de 2019.

GABRIEL, J. D. S.; TIERA, M. J.; DE OLIVEIRA TIERA, V. A. Synthesis, Characterization, and Antifungal Activities of Amphiphilic Derivatives of Diethylaminoethyl Chitosan against *Aspergillus flavus*. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, p. 5725-5731, 2015.

GARCIA, C. E. G. et al. Biomaterials Based on Electrospun Chitosan. Relation between Processing Conditions and Mechanical Properties. **Polymers**, v. 10, p. 1-19, 2018.

GAUDIN, S. et al. Antiplasticisation and Oxygen Permeability of Starch-Sorbitol Films. **Carbohydrate Polymers**, v. 43, p. 33- 37, 2000.

GOY, R. C.; BRITTO, D.; ASSIS, O. B. G. A review of the antimicrobial activity of chitosan. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 19, p. 241-247, 2009.

GUO, Z. et al. Comparative Study of the Influence of Active Groups of Chitosan Derivatives on Antifungal Activity. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 127, p. 2553-2556, 2013.

HAMDI, M. et al. Acetylation Degree, a Key Parameter Modulating Chitosan Rheological, Thermal and Film-Forming Properties. **Food Hydrocolloids**, v. 87, 48-60, 2019.

HANANI, Z.A.N. et al. Development and Characterization of Biodegradable Composite Films Based on Gelatin Derived from Beef, Pork and Fish Sources. **Foods**, v. 2, p. 1-17, 2013.

HUANG, M.; KHOR, E.; LIM, L. Uptake and Cytotoxicity of Chitosan Molecules and Nanoparticles: Effects of Molecular Weight and Degree of Deacetylation. **Pharmaceutical Research**, v. 21, n, p. 344-353, 2004.

HUNTERLAB. Disponível em: <<https://www.hunterlab.com/>>. Acesso em: 17/07/2018

IL'INAA, A. V. et al. In vitro Antifungal Activity of Metal Complexes of a Quaternized Chitosan Derivative with Copper Ions. **Microbiology**, v. 86, p. 590-595, 2017.

JAYAKUMAR, R. et al. Chitosan conjugated DNA nanoparticles in gene therapy. **Carbohydrate Polymers**, n. 79, p. 1-8, 2010.

JUNIOR, I. D. S. et al. General traits of action, treatment and fungal resistance to fluconazol. **Scientia Medica**, v. 15, p. 189-197, 2005

KAYA, M. et al. Production and characterization of chitosan based edible films from Berberis crataegina's fruit extract and seed oil. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 45, p. 287-297, 2018.

KEAN, T.; THANOU, M. Biodegradation, Biodistribution and Toxicity of Chitosan. **Advanced Drug Delivery reviews**, v. 62, p. 3-11, 2010.

KIM, C. H.; CHUN, H. J. A Synthesis of O-diethylaminoethyl chitosan and its binding ability of cholate and deoxycholate anion in vitro. **Polymer Bulletin**, v. 42, p. 25-32, 1999.

KUMAR RAVI, M. N. V. A Review of Chitin and Chitosan Applications. **Reactive & Functional Polymers**, v.46, p. 1-27, 2000.

LANGVAD, F. A Rapid and Efficient Method for Growth Measurement Of Filamentous Fungi. **Journal of Microbiological Methods**, v. 37, p. 97-100, 1999.

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

LI, Z. et al. Preparation, Characterization and Anti-Aflatoxigenic Activity of Chitosan Packaging Films Incorporated with Turmeric Essential Oil. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 131, p. 420-434, 2019.

Lima, A. M. F. **Estudo de propriedades físico- químicas de alginato de sódio, pectina e blendas em solução e no estado sólido com aplicação em sistema de liberação de fármacos.** Tese (Doutorado)- Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.

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, p. 832- 837, 2007.

LUCERA, A. et al. A. Food applications of natural antimicrobial compounds. **Frontiers Microbiology**, v. 3, p. 1-13, 2012.

LUVIELMO, M. M.; LAMAS, S. V. Revestimentos comestíveis em frutas. **Estudos Tecnológicos em Engenharia**, v. 8, p. 8-15, 2012.

MA, X. et al. Effect of Sorbitol Content on Microstructure and Thermal Properties of Chitosan Films. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 119, p. 1294-1297, 2018.

MARTÍNEZ-CAMACHO, A. P. et al. Chitosan composite films: Thermal, structural, mechanical and antifungal properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 82, p. 305-315, 2010.

MEDEIROS, M. A. et al. Influência da Temperatura e da Natureza do Catalisador na Polimerização do Glicerol. **Polímeros**, v. 20, p. 188- 193, 2010.

MORILLON, V. et al. Factors affecting the moisture permeability of lipid-based edible films: a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 42, p. 67-89, 2002.

MOTHÉ, C. G.; AZEVEDO, A. D. **Análise térmica de materiais**. Ed. Artliber, 2009.

MURPHY, E. F. et al. Characterization of protein adsorption at the phosphorylcholine incorporated polymer water interface. **Macromolecules**, p. 4545 - 4554, 2000.

OLIVEIRA, F. D. P. P. et al. Synthesis and evaluation of diethylethylamine-chitosan for gene delivery: composition effects on the in vitro transfection efficiency. **Nanotechnology**, v. 24, p. 1-11, 2013.

OLIVEIRA JUNIOR, E. N.; MELO, I. S.; FRANCO, T. T. Changes in Hyphal Morphology due to Chitosan Treatment in Some Fungal Species. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 55, p. 637-646, 2012.

OLIVEIRA JR, E.N. et al. Growth of Phytopathogenic Fungi in the Presence of Partially Acetylated Chitooligosaccharides. **Mycopathologia**, v. 166, p. 163-174, 2008.

Oração de São Francisco. **Canção Nova**, 2019. Disponível em: <<https://formacao.cancaonova.com/igreja/santos/oracao-de-sao-francisco/>>. Acesso em: 06 de agosto de 2019.

PARK, S.Y.; MARSH, K.S.; RHIM, J.W. Characteristics of Different Molecular Weight Chitosan Films Affected by the Type of Organic Solvents. **Journal of Food Science**, v. 67, p. 194-197, 2002.

PAVIA, D. L. et al. **Introdução à Espectroscopia**. Ed. Cengage Learning, 2010.

RAAFAT, D.; SAHL, H. G. Chitosan and its antimicrobial potential – a critical literature survey. **Microbial Biotechnology**, v. 2, p. 186-201, 2009.

RHIM, J. W. et al. Chitosan-based nanocomposite films with antimicrobial activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, 2006.

RODRÍGUEZ-NÚÑES, J. et al. Chitosan/Hydrophilic Plasticizer-Based Films: Preparation, Physicochemical and Antimicrobial Properties. **Journal of Polymers Environment**, p. 41-51, 2014.

SARTORI, T.; MENEGALLI, F.C. Development and Characterization of Unripe Banana Starch Films Incorporated with Solid Lipid Microparticles Containing Ascorbic Acid. **Food Hydrocolloids**, v. 55, p. 210-219, 2016.

SILVA-CASTRO, I. et al. Application of Bioactive Coatings Based on Chitosan and Propolis for *Pinus spp.* Protection against *Fusarium circinatum*. **Forests**, v. 9, p. 685, 2018.

SIRIPATRAWAN, U.; VITCHAYAKITTI, W. Improving Functional Properties of Chitosan films as Active Food Packaging by Incorporating with Propolis. **Food Hydrocolloids**, v. 61, p. 695-702, 2016.

SOBRAL, P. J. A. et al. Propriedades funcionais de biofilmes de gelatina em função da espessura. **Ciência e Engenharia**, v. 8, p. 60 – 67, 1999.

SOLOMONS, T. W. G.; FRYHLE, B. **Química Orgânica**, 8 ed. Tradução de Robson Mendes Matos, Revisão Técnica Délio Soares Raslan- Rio de Janeiro: LTC, 2006.

SOUZA, M.P. et al. Development and Characterization of an Active Chitosan-Based Film Containing Quercetin. **Food and Bioprocess Technology**, v. 8, p. 2183-2191, 2015.

SUN, L. et al. Preparation and characterization of chitosan film incorporated with thinned young apple polyphenols as an active packaging material. **Carbohydrate Polymers**, v.163, p.81-91, 2017.

TAKAKI, M. et al. Synthesis, characterization and study of quaternary derivatives of chitosan: in vitro study against *Aspergillus flavus*. **Advances in Chitin Science – Volume XIV**, 2013.

TANADA- PALMU, P. S. et al. Recobrimento de sementes de brócolos e salsa com coberturas e filmes biodegradáveis. **Bragantia**, v. 64, p. 291-297, 2005.

TAVARIA, F.K. et al. A Quitosana como Biomaterial Odontológico: Estado da Arte. **Brazilian Journal of Biomedical Engineering**, v. 29, p. 110-120, 2013.

TIEN, C.L. et al. N-Acylated Chitosan: Hydrophobic Matrices for Controlled Drug Release. **Journal of Controlled Release**, v. 93, p. 1– 13, 2003.

TIERA, M. J. et al. Synthesis and Characterization of Phosphorylcholine-Substituted Chitosans Soluble in Physiological pH Conditions. **Biomacromolecules**, v.7, p. 3151 - 3156, 2006.

TØMMERAAS, K. et al. Preparation and characterisation of oligosaccharides produced by nitrous acid depolymerisation of chitosans. **Carbohydrate Research**, v. 333, p. 137-144, 2001.

VALDERRAMA, N.; ALBARRACÍN, W.; ALGECIRA, N. Physical and Microbiological Evaluation of Chitosan Films: Effect of Essential Oils and Storage. **International Journal of Agricultural and Biological Engineering**, v. 9, p. 262-269, 2015.

VAN DEN BROEK L. A. M. et al. Chitosan films and blends for packaging material. **Carbohydrate Polymers**, v.116, p. 237-242, 2015.

VARNA, A. J.; DESHPANDE, S. V.; KENNEDY, J. F. Metal complexation by chitosan and its derivatives: a review. **Carbohydrates Polymers**, v. 55, p. 77-93, 2003.

VIEGAS DE SOUZA, R. H. F. et al. Hydrophobic effect of amphiphilic derivatives of chitosan on the antifungal activity against *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. **Molecules**, v. 18, p. 4437-4450, 2013.

VERLEE, A.; MINCKE, S.; STEVENS, C.V. Recent Developments in Antibacterial and Antifungal Chitosan and Its Derivatives. **Carbohydrate Polymers**, v. 164, p. 268–283, 2017.

WANG, L. et al. Chitosan Disrupts *Penicillium expansum* and Controls Postharvest Blue mold of Jujube Fruit. **Food Control**, v. 41, p. 56-62, 2014.

WARSIKI, E. Application of chitosan as biomaterial for active packaging of ethylene absorber. **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**, v. 141, 2018.

WILLIAMS, D. F. **The Williams Dictionary of Biomaterials**. Liverpool: Liverpool University Press, 1999.

XING, K. et al. Chitosan antimicrobial and eliciting properties for pest control in agriculture: a review. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 35, p. 569–588, 2015.

XING, A. K. et al. Synthesis and in Vitro Antifungal Efficacy of Oleoyl-Chitosannanoparticles Against Plant Pathogenic Fungi. **International Journal of Biological Macromolecules**, p. 830-836, 2016.

YANG, J. et al. Cellulose - Chitosan Antibacterial Composite Films Prepared from LiBr Solution. **Polymers**, v. 10, p. 1058-65, 2018.

YOUNES, I. et al. M. Influence of Acetylation Degree and Molecular Weight of Homogeneous chitosans on Antibacterial and Antifungal Activities. **International Journal of Food Microbiology**, v. 185, p. 57-63, 2014.

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

## APÊNDICE A - Rendimentos das sínteses

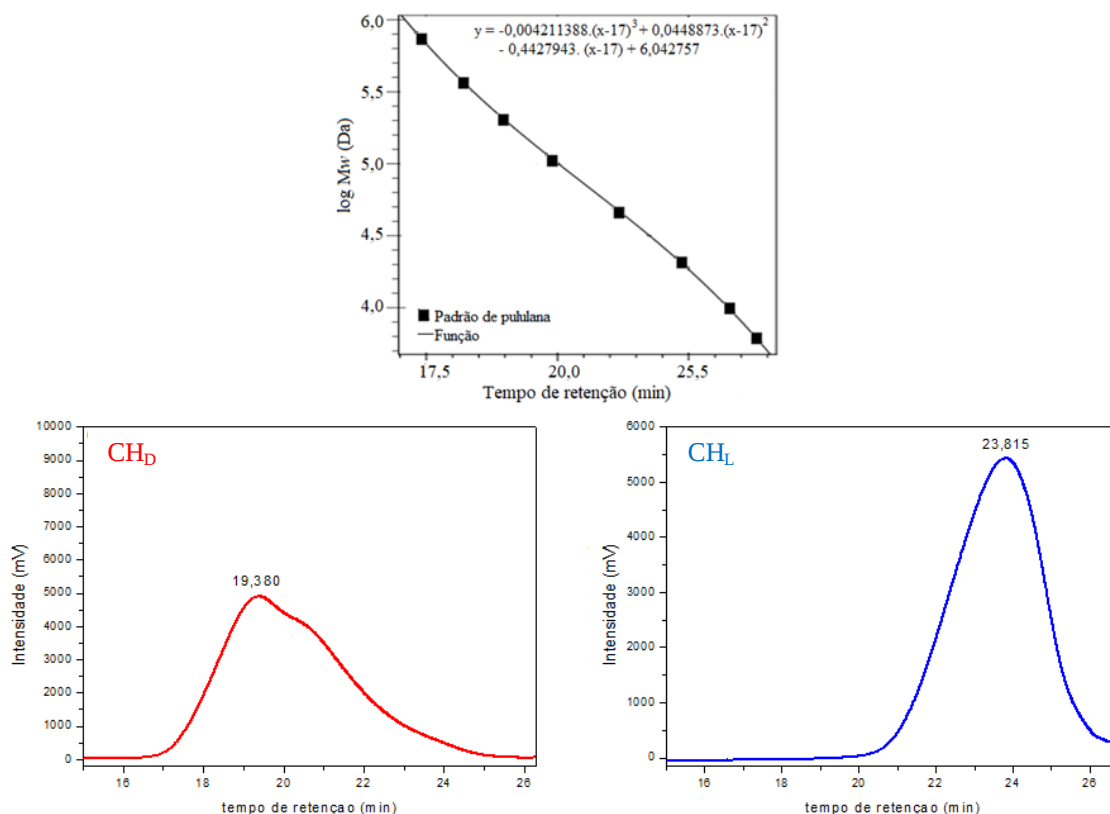
**Figura A1** - Valores dos rendimentos obtidos para cada reação realizada.

| Reação                      | Polímero obtido           | Massa inicial (g) | Massa final (g) | Rendimento (%) |
|-----------------------------|---------------------------|-------------------|-----------------|----------------|
| Desacetilação <sup>1</sup>  | CH <sub>D</sub>           | 20,35             | 14,77           | 72,58          |
| Desacetilação <sup>2</sup>  | CH <sub>D</sub>           | 20,12             | 14,85           | 73,81          |
| Desacetilação <sup>3</sup>  | CH <sub>D</sub>           | 20,10             | 15,92           | 79,20          |
| Desacetilação <sup>4</sup>  | CH <sub>D</sub>           | 20,24             | 14,60           | 72,13          |
| Desacetilação <sup>5</sup>  | CH <sub>D</sub>           | 20,03             | 14,89           | 74,34          |
| Desacetilação <sup>6</sup>  | CH <sub>D</sub>           | 40,22             | 30,07           | 74,76          |
| Desacetilação <sup>7</sup>  | CH <sub>D</sub>           | 50,23             | 37,07           | 73,80          |
| Desacetilação <sup>8</sup>  | CH <sub>D</sub>           | 50,00             | 35,55           | 71,10          |
| Desacetilação <sup>9</sup>  | CH <sub>D</sub>           | 60,28             | 44,09           | 73,14          |
| Desacetilação <sup>10</sup> | CH <sub>D</sub>           | 60,18             | 44,28           | 73,58          |
| Desacetilação <sup>11</sup> | CH <sub>D</sub>           | 60,31             | 45,14           | 74,85          |
| Desacetilação <sup>12</sup> | CH <sub>D</sub>           | 60,14             | 43,93           | 73,05          |
| Desacetilação <sup>13</sup> | CH <sub>D</sub>           | 60,46             | 45,38           | 75,06          |
| Despolimerização            | CH <sub>L</sub>           | 320,15            | 272,28          | 85,05          |
| Reação com DEAE             | DEAE-CH <sub>L</sub>      | 210,13            | 170,24          | 81,02          |
| Reação com dodecil          | DEAE-CH <sub>L</sub> -Dod | 100,02            | 71,25           | 71,24          |

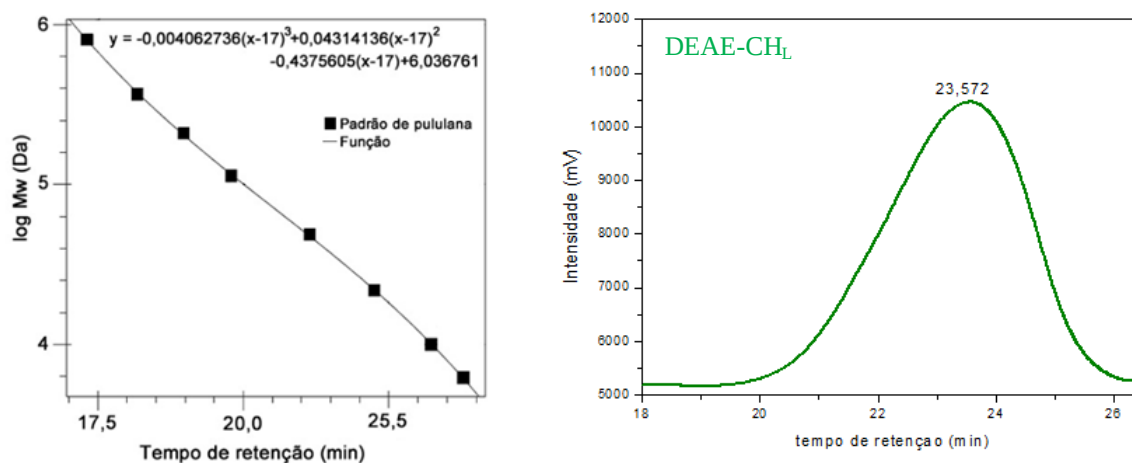
## APÊNDICE B - Curva analítica e cromatogramas de CPG

As curvas analíticas e os cromatogramas de CPG são mostrados nas figuras B1 e B2. Cada figura representa a análise de um conjunto aleatório de 1 ou 2 amostras poliméricas, mais a curva analítica.

**Figura B1-** Curva analítica com a pululana e cromatogramas do polímero CH<sub>D</sub> e CH<sub>L</sub>.

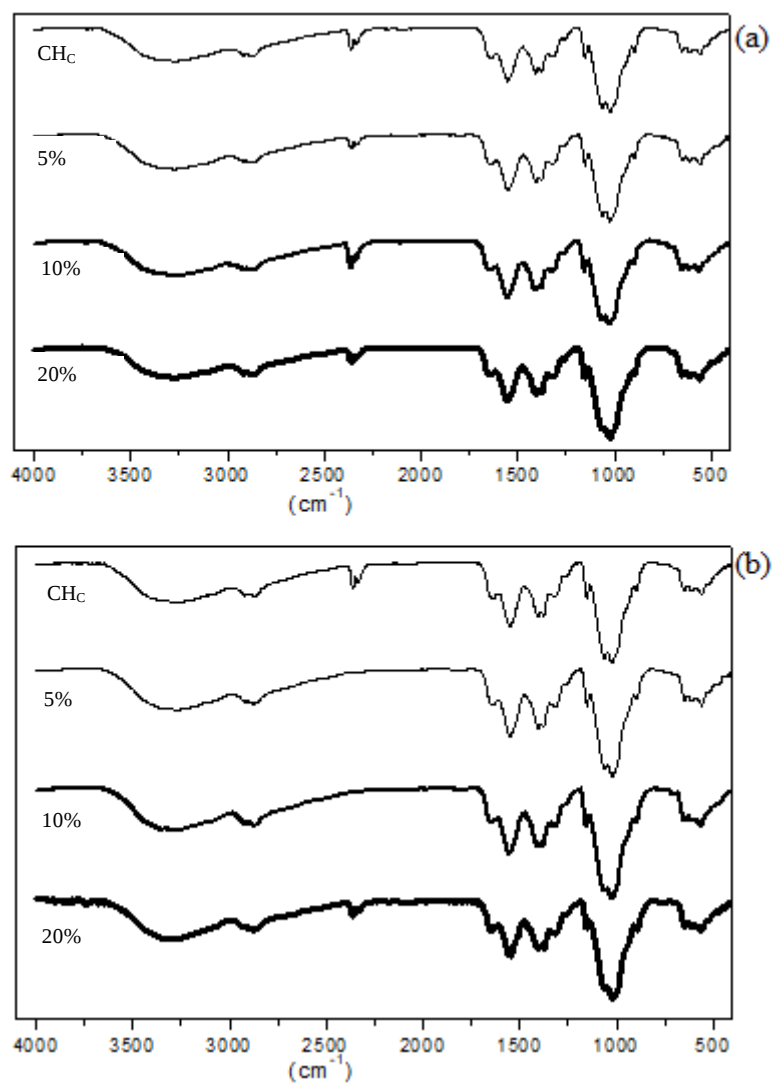


**Figura B2 -** Curva analítica com a pululana e cromatograma do polímero DEAE-CH<sub>L</sub>.

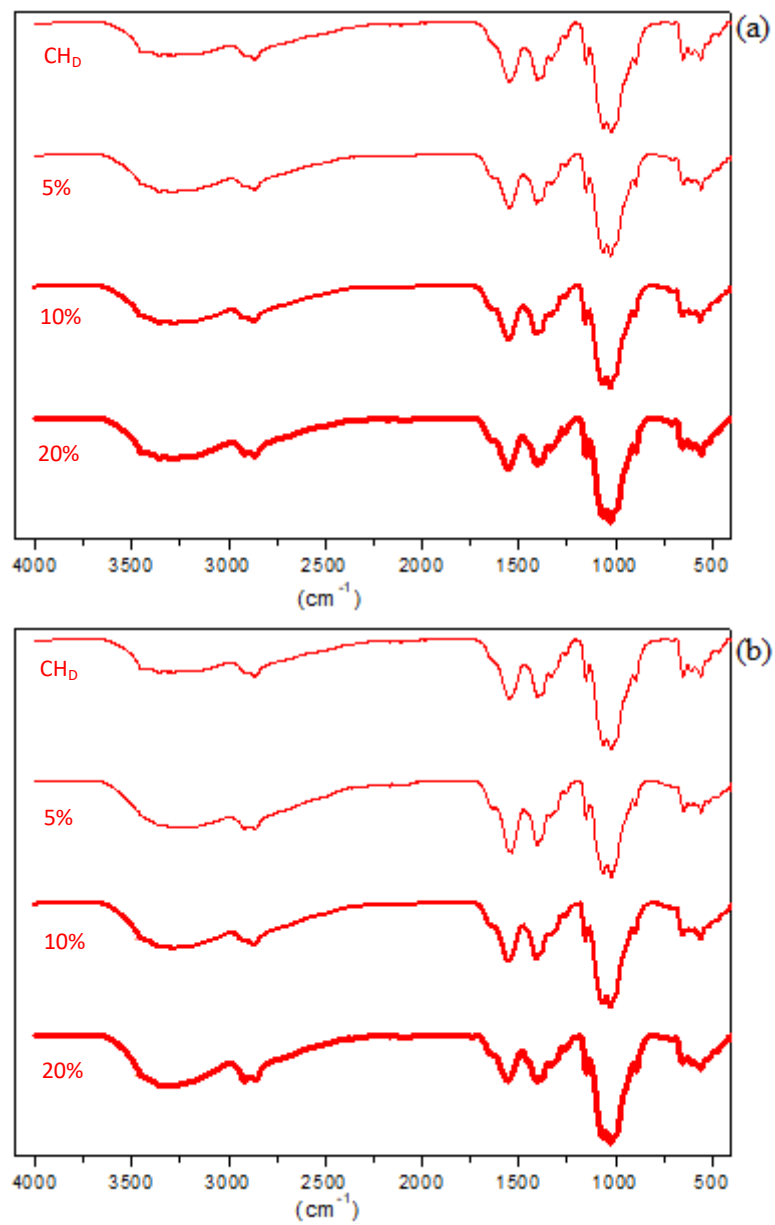


## APÊNDICE C- Espectros na região do infravermelho para os filmes

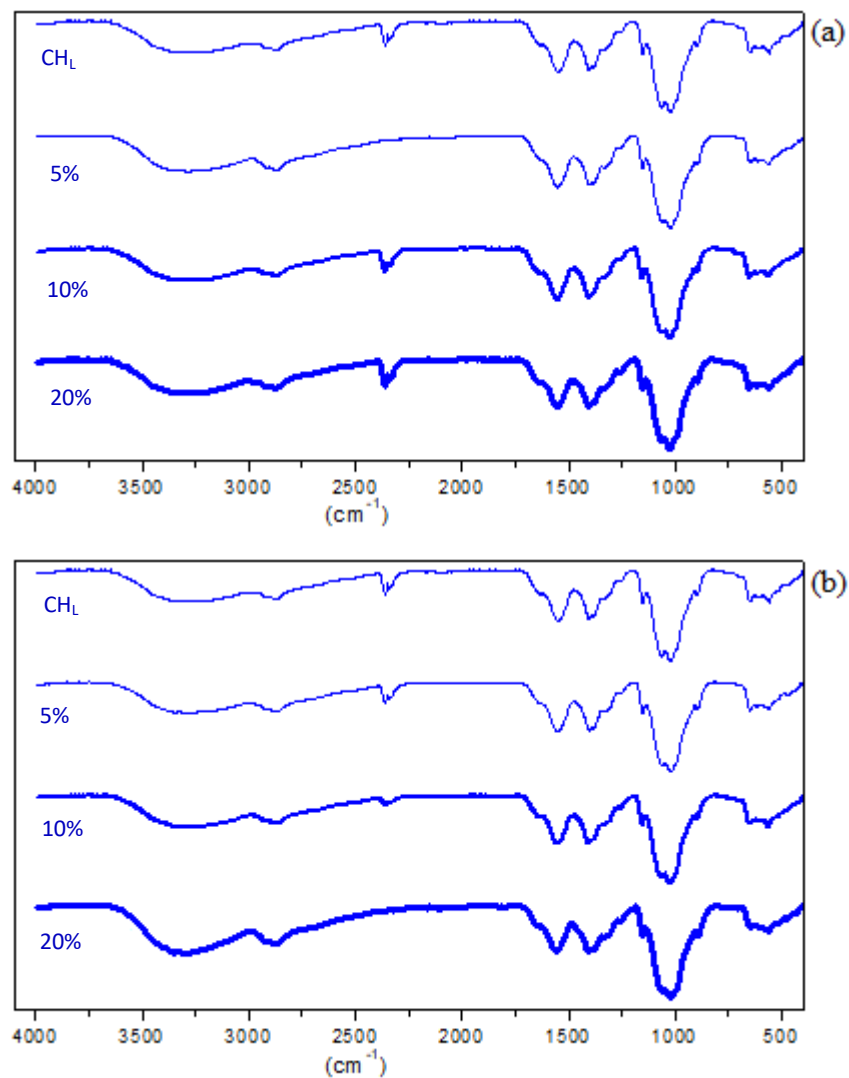
**Figura C1** - Espectros na região do infravermelho para os filmes de quitosana comercial (CH<sub>C</sub>) com concentrações crescentes de glicerol (a) e sorbitol (b).



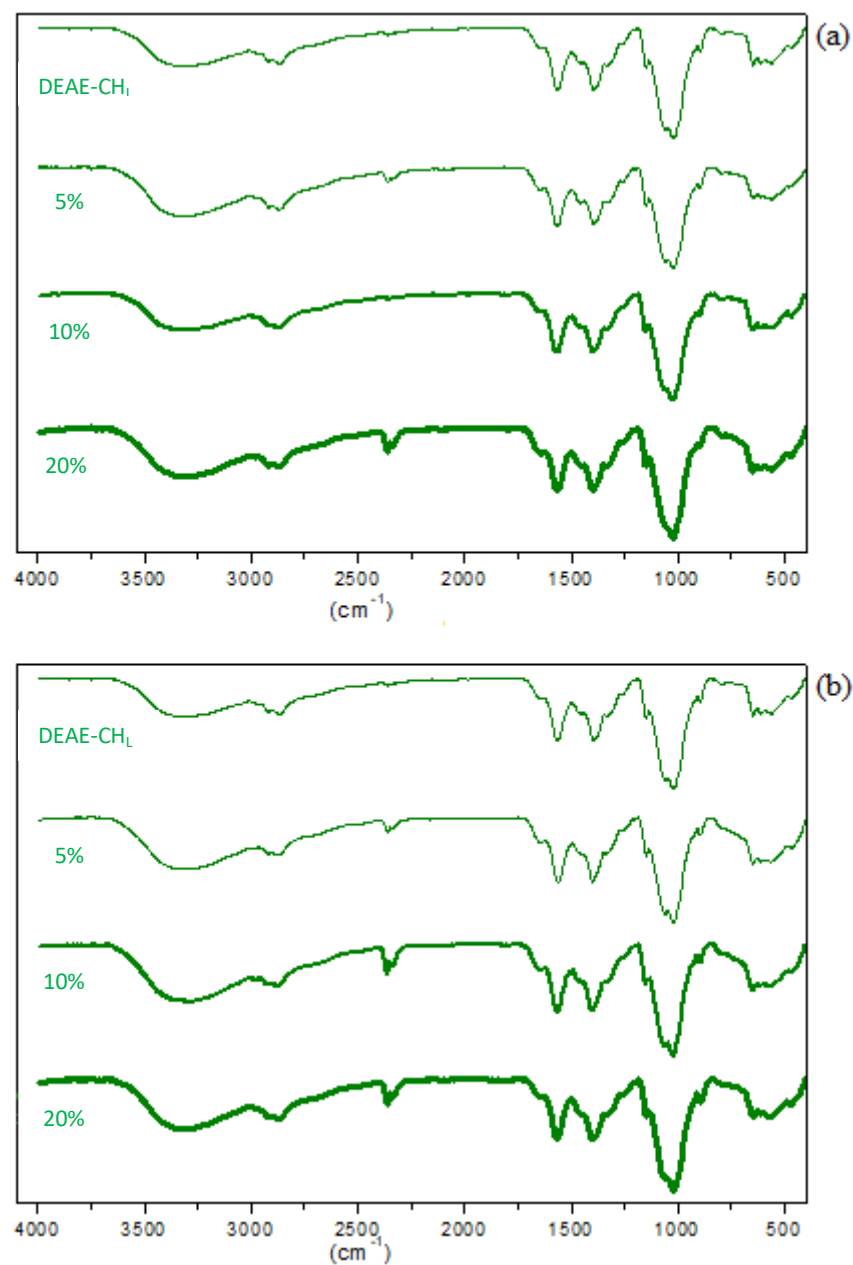
**Figura C2** - Espectros na região do infravermelho para os filmes de quitosana desacetilada (CH<sub>D</sub>) com concentrações crescentes de glicerol (a) e sorbitol (b).



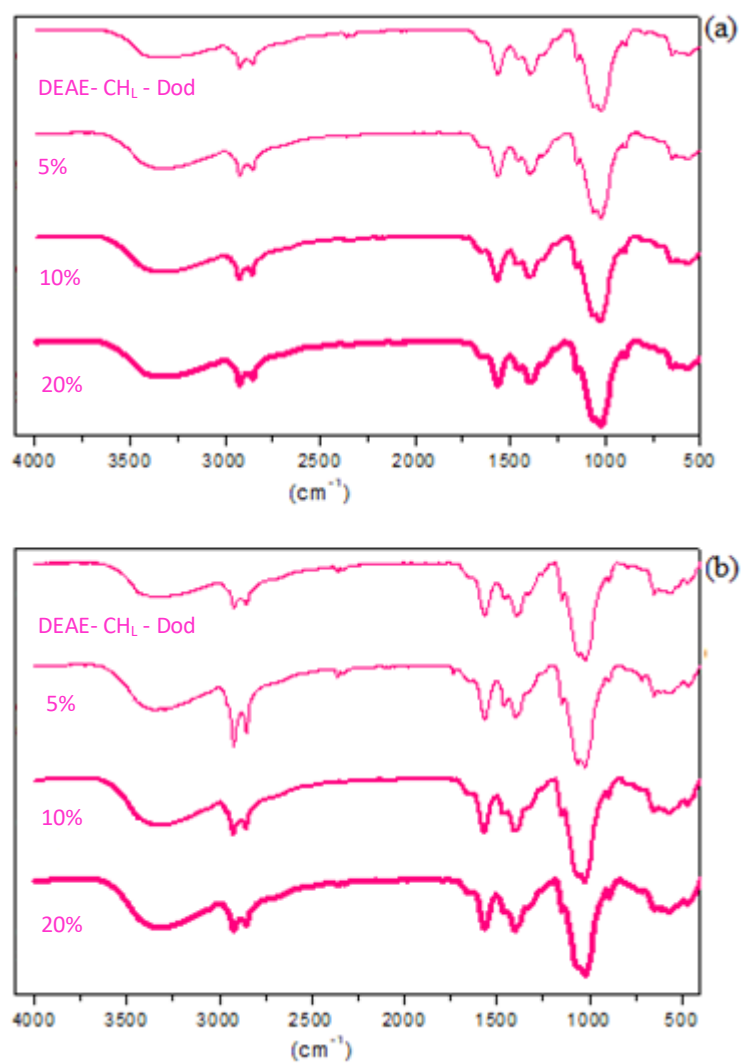
**Figura C3** - Espectros na região do infravermelho para os filmes de quitosana despolimerizada ( $\text{CH}_L$ ) com concentrações crescentes de glicerol (a) e sorbitol (b).



**Figura C4** - Espectros na região do infravermelho para os filmes do derivado hidrofílico (DEAE-CH<sub>L</sub>) com concentrações crescentes de glicerol (a) e sorbitol (b).



**Figura C5** - Espectros na região do infravermelho para os filmes do derivado anfifílico (DEAE-CH<sub>L</sub>-Dod) com concentrações crescentes de glicerol (a) e sorbitol (b).



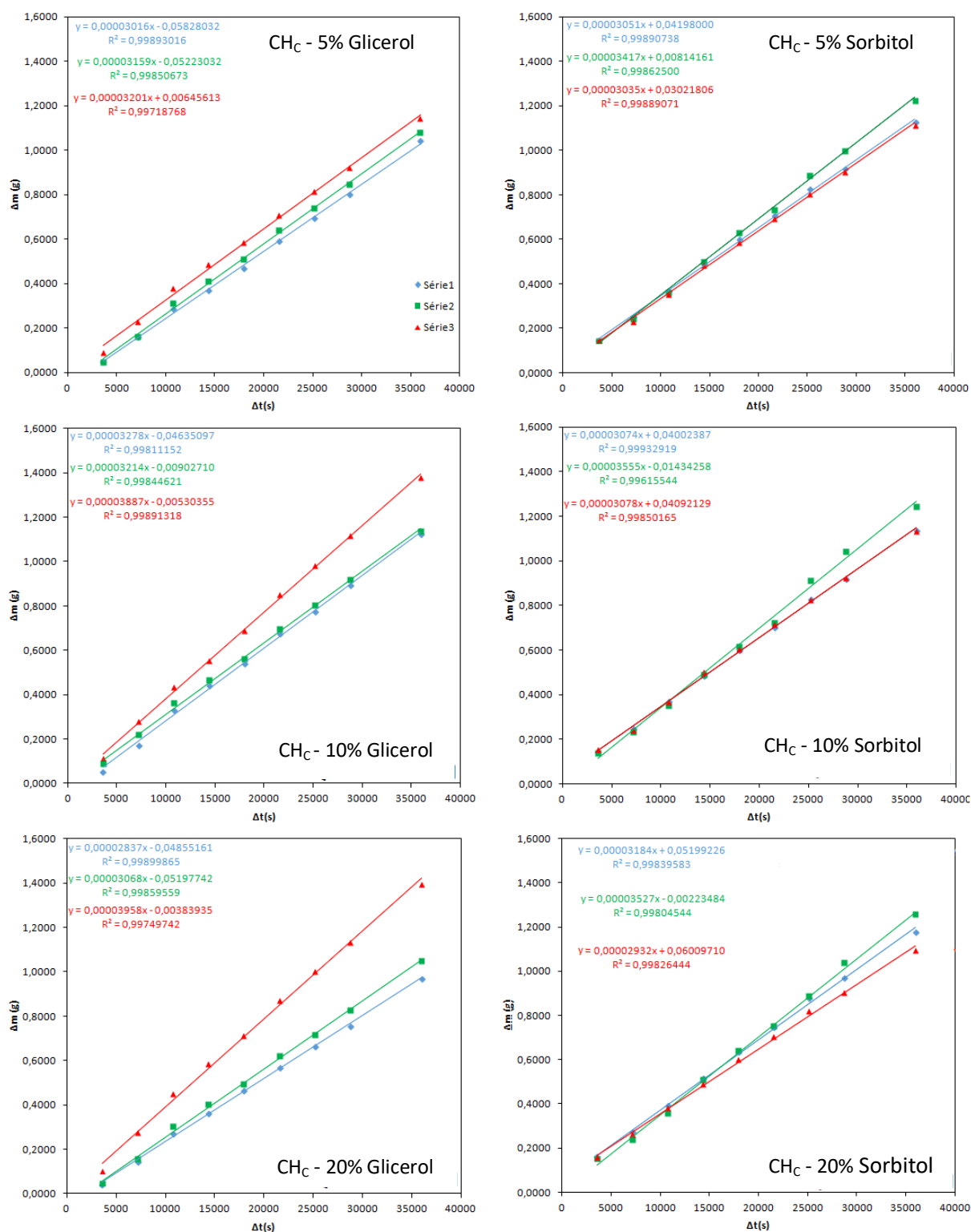
## APÊNDICE D – Solubilidade em água dos filmes

**Tabela D1** - Solubilidade dos filmes na ausência e presença dos plastificantes glicerol e sorbitol

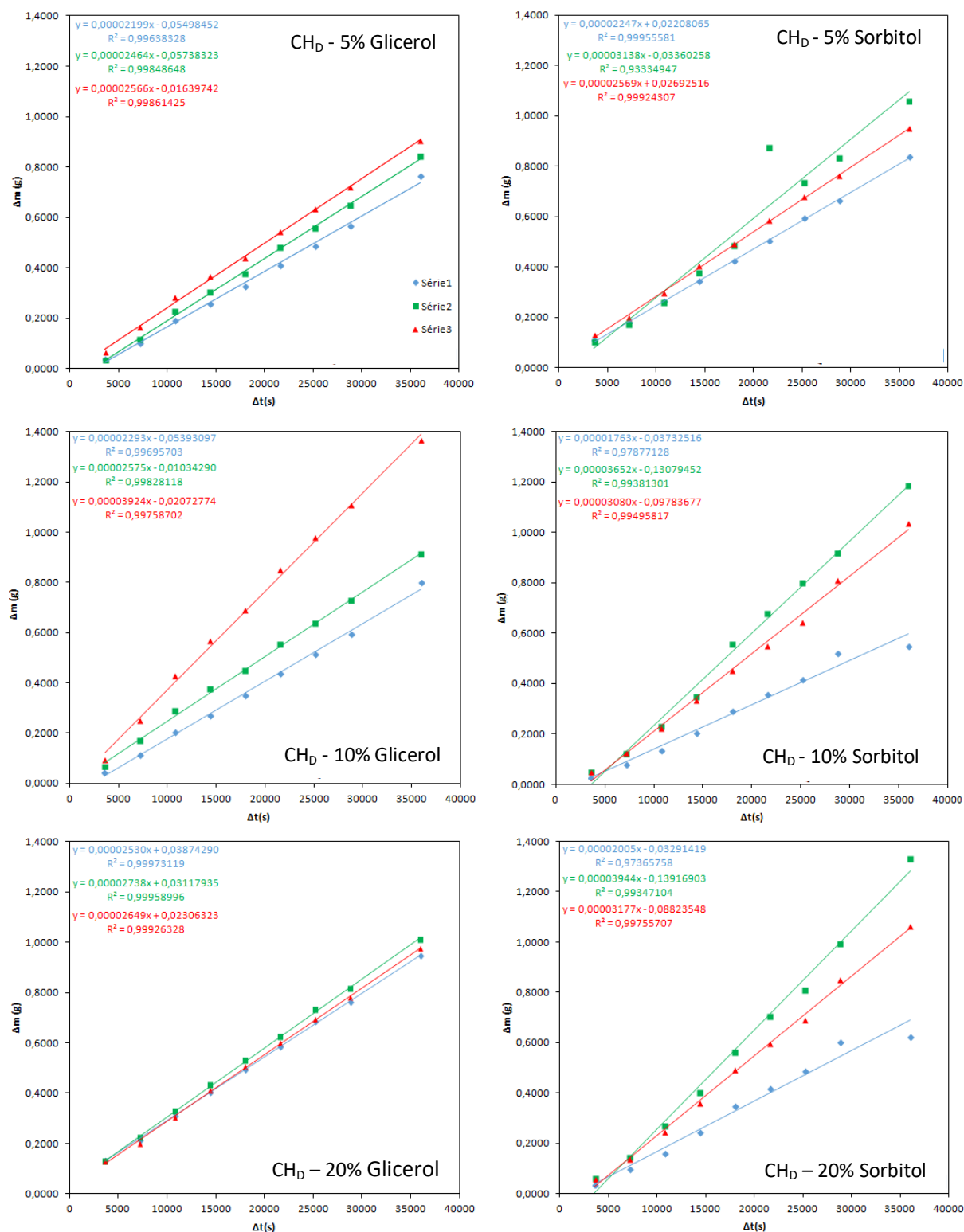
| Filme                          | Plastificante |          | Solubilidade (%)            |
|--------------------------------|---------------|----------|-----------------------------|
| <b>CH<sub>C</sub></b>          | ---           |          | 6,10 ± 0,50 <sup>D</sup>    |
|                                | 5 %           | Glicerol | 8,18 ± 0,72 <sup>C,D</sup>  |
|                                |               | Sorbitol | 9,48 ± 0,38 <sup>B,C</sup>  |
|                                | 10 %          | Glicerol | 8,90 ± 1,01 <sup>B,C</sup>  |
|                                |               | Sorbitol | 11,00 ± 0,65 <sup>B</sup>   |
|                                | 20 %          | Glicerol | 8,51 ± 1,17 <sup>C</sup>    |
|                                |               | Sorbitol | 15,53 ± 0,97 <sup>A</sup>   |
| <b>CH<sub>D</sub></b>          | ---           |          | 9,22 ± 1,27 <sup>C</sup>    |
|                                | 5 %           | Glicerol | 8,08 ± 0,07 <sup>C</sup>    |
|                                |               | Sorbitol | 24,24 ± 2,72 <sup>A</sup>   |
|                                | 10 %          | Glicerol | 10,84 ± 1,71 <sup>C</sup>   |
|                                |               | Sorbitol | 17,39 ± 2,14 <sup>B</sup>   |
|                                | 20 %          | Glicerol | 6,69 ± 0,28 <sup>C</sup>    |
|                                |               | Sorbitol | 21,81 ± 1,35 <sup>A,B</sup> |
| <b>CH<sub>L</sub></b>          | ---           |          | 37,98 ± 1,15 <sup>C</sup>   |
|                                | 5 %           | Glicerol | 100,00 ± 0,00 <sup>A</sup>  |
|                                |               | Sorbitol | 100,00 ± 0,00 <sup>A</sup>  |
|                                | 10 %          | Glicerol | 100,00 ± 0,00 <sup>A</sup>  |
|                                |               | Sorbitol | 21,53 ± 0,58 <sup>D</sup>   |
|                                | 20 %          | Glicerol | 78,87 ± 2,49 <sup>B</sup>   |
|                                |               | Sorbitol | 23,90 ± 0,53 <sup>D</sup>   |
| <b>DEAE-CH<sub>L</sub></b>     | ---           |          | 100,00 ± 0,00 <sup>A</sup>  |
|                                | 5 %           | Glicerol | 38,34 ± 0,31 <sup>C</sup>   |
|                                |               | Sorbitol | 86,67 ± 0,93 <sup>B</sup>   |
|                                | 10 %          | Glicerol | 100,00 ± 0,00 <sup>A</sup>  |
|                                |               | Sorbitol | 100,00 ± 0,00 <sup>A</sup>  |
|                                | 20 %          | Glicerol | 29,55 ± 0,57 <sup>D</sup>   |
|                                |               | Sorbitol | 37,36 ± 2,07 <sup>C</sup>   |
| <b>DEAE-CH<sub>L</sub>-Dod</b> | ---           |          | 100,00 ± 0,00 <sup>A</sup>  |
|                                | 5 %           | Glicerol | 100,00 ± 0,00 <sup>A</sup>  |
|                                |               | Sorbitol | 100,00 ± 0,00 <sup>A</sup>  |
|                                | 10 %          | Glicerol | 100,00 ± 0,00 <sup>A</sup>  |
|                                |               | Sorbitol | 100,00 ± 0,00 <sup>A</sup>  |
|                                | 20 %          | Glicerol | 93,97 ± 1,78 <sup>B</sup>   |
|                                |               | Sorbitol | 100,00 ± 0,00 <sup>A</sup>  |

## APÊNDICE E - Ganho de massa em função do tempo

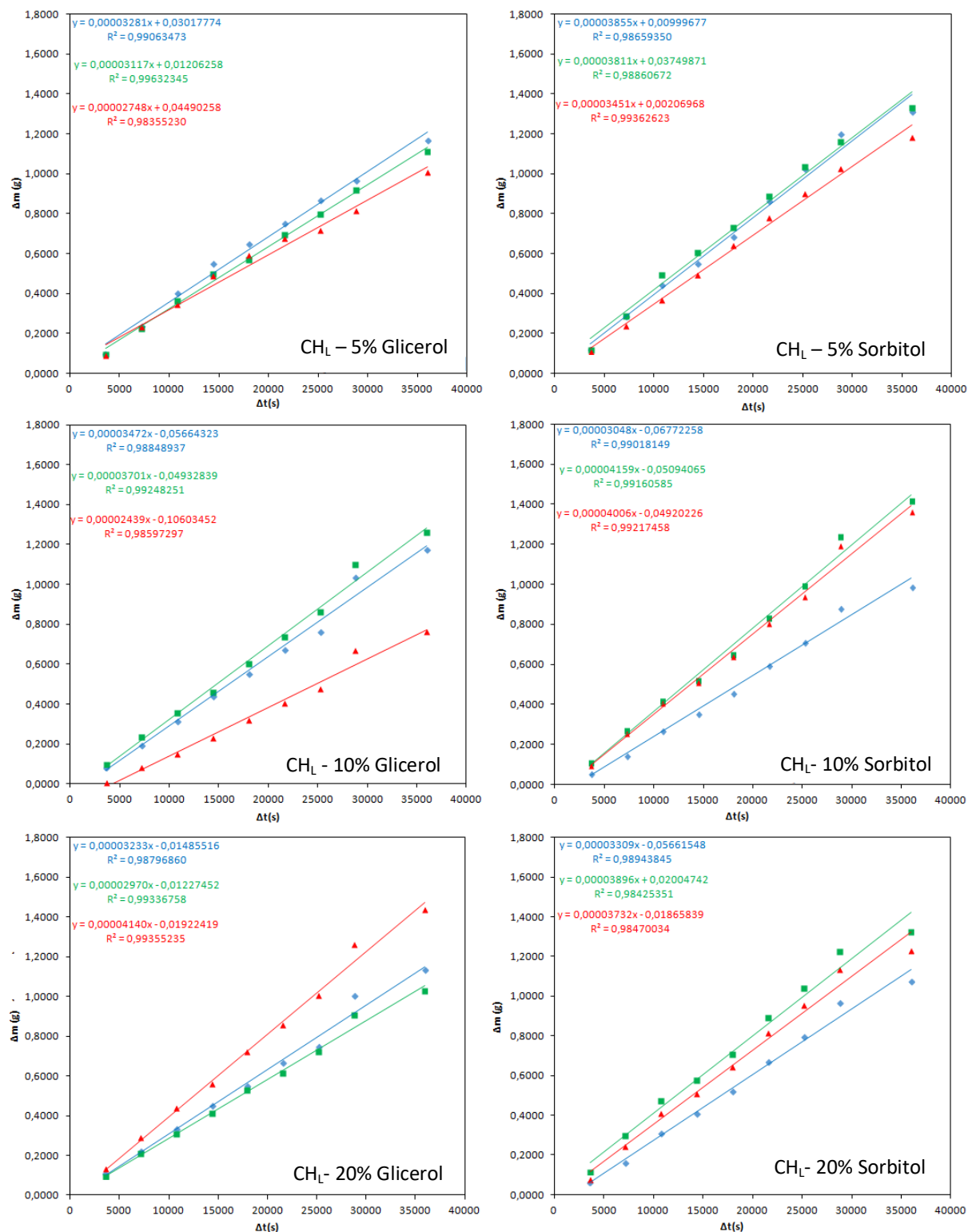
**Figura E1** – Curvas representativas do ganho de massa para filmes de CH<sub>C</sub> com variações de concentrações de glicerol e sorbitol.



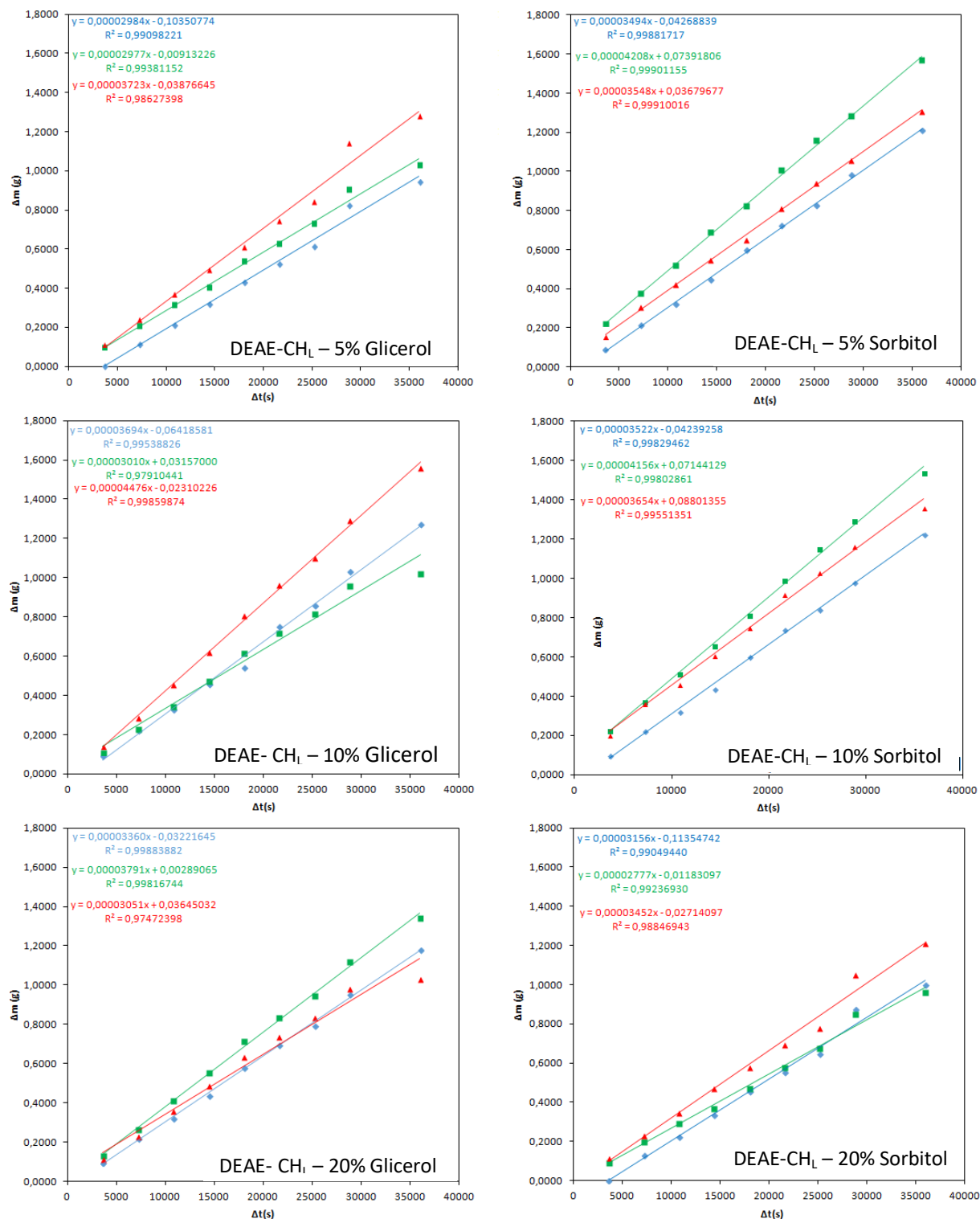
**Figura E2** - Curvas representativas do ganho de massa para filmes de  $\text{CH}_D$  com variações de concentrações de glicerol e sorbitol.



**Figura E3** - Curvas representativas do ganho de massa para filmes de  $\text{CH}_\text{L}$  com variações de concentrações de glicerol e sorbitol.



**Figura E4** - Curvas representativas do ganho de massa para filmes de DEAE-CH<sub>L</sub> com variações de concentrações de glicerol e sorbitol.



**Figura E5** - Curvas representativas do ganho de massa para filmes de DEAE-CH<sub>L</sub>-Dod com variações de concentrações de glicerol e sorbitol.

