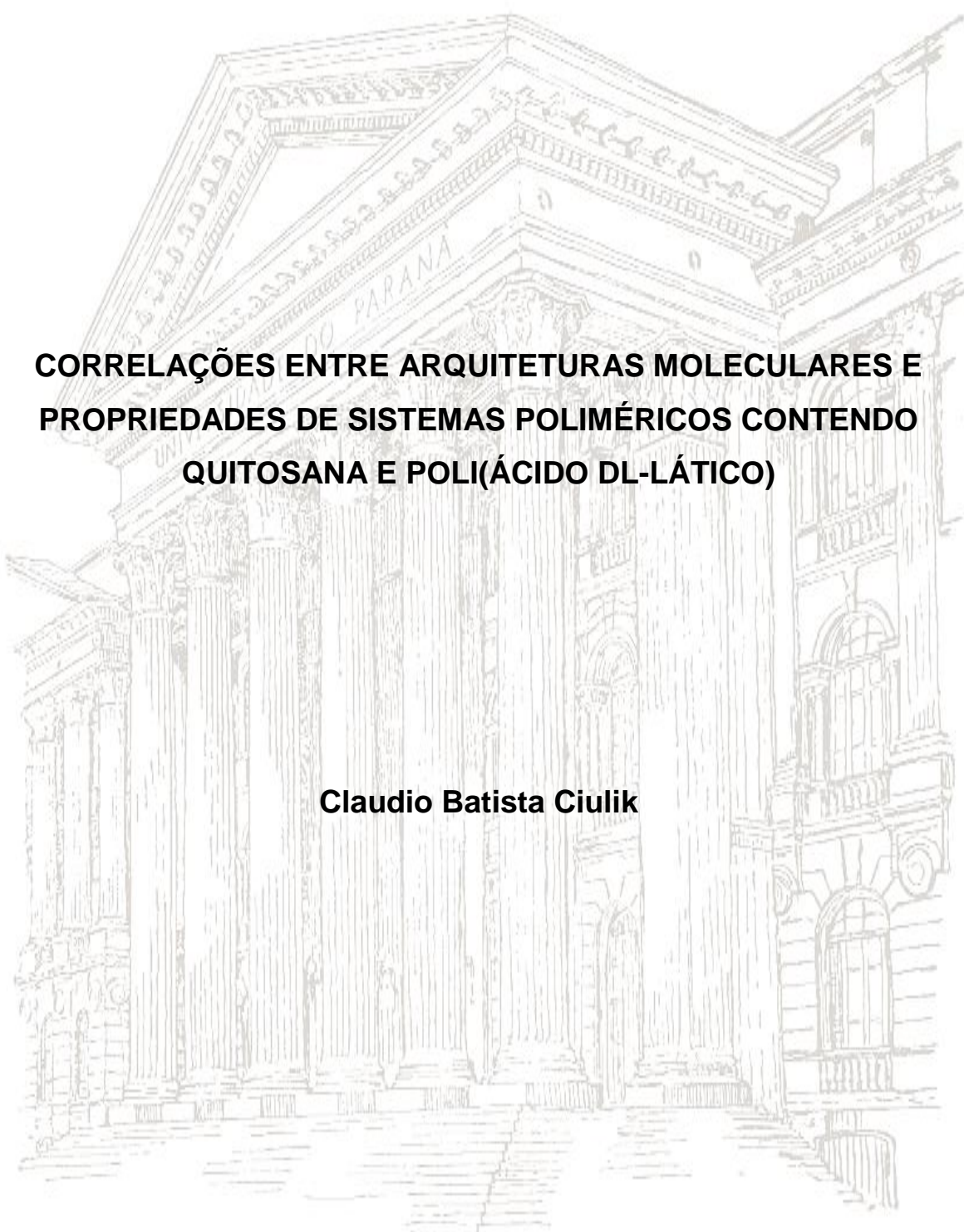




**Universidade Federal do Paraná**  
**Departamento de Química**  
**Curso de Pós-Graduação em Química**

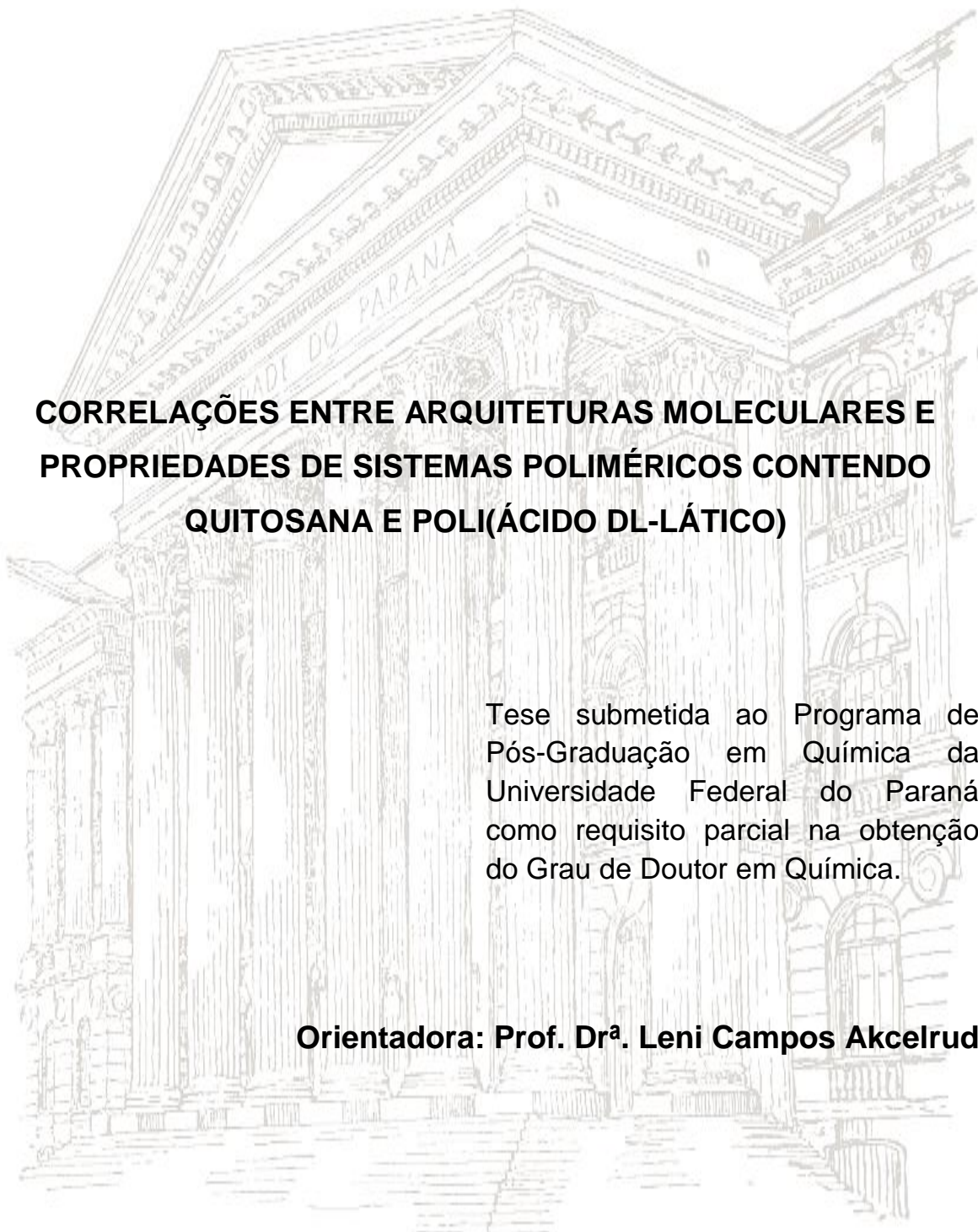


**CORRELAÇÕES ENTRE ARQUITETURAS MOLECULARES E  
PROPRIEDADES DE SISTEMAS POLIMÉRICOS CONTENDO  
QUITOSANA E POLI(ÁCIDO DL-LÁTICO)**

**Claudio Batista Ciulik**

**Curitiba, Julho de 2014**

**Claudio Batista Ciulik**



**CORRELAÇÕES ENTRE ARQUITETURAS MOLECULARES E  
PROPRIEDADES DE SISTEMAS POLIMÉRICOS CONTENDO  
QUITOSANA E POLI(ÁCIDO DL-LÁTICO)**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Paraná como requisito parcial na obtenção do Grau de Doutor em Química.

**Orientadora: Prof. Dr<sup>a</sup>. Leni Campos Akcelrud**

**Curitiba, Julho de 2014**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Professora Dr<sup>a</sup> Leni Akcelrud, pela orientação, pela transferência de conhecimento e pelo exemplo de profissionalismo.

À Dr<sup>a</sup> Débora Balogh pela realização das medidas de DMA e à Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Paula Rodrigues pela ajuda na discussão.

Como um bom trabalho sempre é realizado com boas colaborações, agradeço ao Professor Dr Eduardo Ribeiro de Azevedo e ao doutorando Oigres Bernardinelli pelas medidas de RMN no estado sólido e contribuições na discussão dos resultados.

Agradeço ao Professor Dr Arion Zandoná pelas medidas de GPC.

Agradeço ao Dr Arquimedes Santana pela medida de <sup>1</sup>HRMN.

Agradeço ao Dr Leonardo Berlim pelas imagens de MEV.

Agradeço ao Professor Dr Claudiney Soares Cordeiro e à Professora Maria Aparecida Ferreira César-Oliveira pelas contribuições dadas no relatório de qualificação.

Aos colegas do LaPPS, em especial aos doutorandos Bruno, Cristiano e Denis pela amizade, pelas discussões (científicas, políticas e esportivas) e contribuições dadas a esse trabalho.

Agradeço a Professora Dr<sup>a</sup> Lucy Ono por estar levando este trabalho a diante através estudo biológico dos materiais obtidos.

Agradeço com carinho à doutoranda Franciele, pelo companheirismo, pelas revisões e pelo apoio incondicional.

"Sonho com o dia em que todos levantar-se-ão e compreenderão que foram feitos  
para viverem como irmãos."

Nelson Mandela

## RESUMO

Visando ampliar o leque de aplicações biológicas da quitosana, aumentando a flexibilidade do polímero, cuja rigidez restringe muito a sua aplicação como material biológico, foram preparadas três séries de materiais contendo quitosana e poli(DL-ácido láctico). Cada série caracterizou-se por uma arquitetura macromolecular específica onde a razão entre os dois componentes variou sistematicamente. As séries foram constituídas por blendas poliméricas, copolímeros graftizados com ramos do poli (ácido DL-láctico) inseridos, e redes entrecruzadas onde o poli (ácido DL-láctico) formou segmentos conectando as cadeias de quitosana. Em todos os materiais preparados foi medido o grau de inserção ou a densidade de ligações cruzadas, e o grau de polimerização dos segmentos do poliácido, como grupamento pendente ou elemento de conexão intercadeias. As técnicas de caracterização incluíram métodos químicos, espectroscópicos, notadamente FTIR e RMN no estado sólido e térmicas, notadamente DMTA. As propriedades térmicas e mecânicas resultantes foram marcadamente diferentes para as três séries estudadas, permitindo uma visão da influência da arquitetura macromolecular nas propriedades físicas dos sistemas estudados. O estudo abriu uma nova avenida para a obtenção de biomateriais com propriedades pré-desenhadas.

## ABSTRACT

Aiming to broaden the spectrum of chitosan properties, which rigidity hinders in a great deal its application as a biomaterial, three approaches have been envisaged to impart flexibility to the original material, through the combination with poly(DL lactic acid): the preparation of blends, grafted copolymers and networks. In each series the amount of the poly(DL lactic acid) in relation to chitosan was varied systematically. In all prepared materials the degree of insertion or the degree of crosslinking, along with the degree of polymerization of the segments of the polyacid, as a pendant group or as the connection element among chains, were measured. The characterization techniques included chemical methods, spectroscopy notably FTIR and NMR in the solid state, and thermal ones notably DMTA. The thermal and mechanical properties observed were dramatically different for materials with the same composition but belonging to different series allowing an evaluation of the remarkable influence of the macromolecular architecture upon the physical properties. The study opened a new avenue to the obtainment of biomaterials with pre designed performances.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura da celulose, quitina e quitosana, (a), (b) e (c) respectivamente. ....	5
Figura 2 - A estrutura da quitosana com numeração atribuída aos átomos de carbono. ....	7
Figura 3 - Estrutura química do ácido láctico. ....	9
Figura 4 - Rotas mais utilizadas na obtenção do poli(ácido láctico) [51]. ....	10
Figura 5 - Estrutura geral para um polímero grafitizado. ....	13
Figura 6 - Exemplo de uma rede polimérica onde as cadeias de "poli(A)" são ligadas por cadeias de "poli(B)", ("poli(B)" é o agente de ligação cruzada). ....	15
Figura 7 - Relação entre tempo de reação e massa molar. ....	26
Figura 8 - Fotomicrografias das blendas 90/10 obtidas utilizando PLA de 1000 g.mol <sup>-1</sup> . ....	28
Figura 9 - Fotomicrografias das blendas 90/10 obtidas utilizando PLA de 4200 g.mol <sup>-1</sup> . ....	29
Figura 10 - Fotomicrografias das blendas 90/10 obtidas utilizando PLA de 17000 g.mol <sup>-1</sup> . ....	30
Figura 11 - Fotomicrografias das blendas 90/10 obtidas utilizando PLA de 42000 g.mol <sup>-1</sup> . ....	31
Figura 12 - Estrutura proposta para a quitosana-g-oligo(ácido DL-láctico). ....	33
Figura 13 - Esquema de formação da ligação amida proposto para reação de obtenção da quitosana grafitizada. ....	34
Figura 14 - Mecanismo de policondensação proposto para reação de polimerização do ácido DL-láctico. ....	35
Figura 15 - Imagens do filme de quitosana-g-poli(ácido DL-láctico) em contato com a pele. ....	36
Figura 16 - Espectro de FTIR dos precursores e das amostras CG01 e CG06. ...	38
Figura 17 - a) Estrutura química genérica dos copolímeros grafitizados. b) Espectro de 13C CPMAS para a quitosana pura. c) Espectro de 13C CPMAS para o OLA puro. d) Espectro de 13C CPMAS para a composição CG01. e) Espectro de 13C SPEMAS para a composição CG01. ....	40

Figura 18 - a) Espectros de $^{13}\text{C}$ CPMAS e b) Espectros de $^{13}\text{C}$ SPEMAS das composições graftizadas. Em ambos os casos as quantidades de OLA aumentam de baixo para cima. ....	42
Figura 19 - Exemplos de deconvolução espectral dos espectros de $^{13}\text{C}$ SPEMAS das amostras CG01, CG03 e CG06. ....	43
Figura 20 - Esquema reacional de formação do <i>N</i> -salicidenoquitosana. ....	44
Figura 21 - Curvas termogravimétricas para as amostras graftizadas. ....	48
Figura 22 - Região em evidência da primeira derivada das curvas termogravimétricas para as composições graftizadas. Inserido no gráfico, o resultado completo da derivada mostrando o pico de degradação pertencente à quitosana. ....	50
Figura 23 - Curvas $\tan \delta$ em função da temperatura para amostras de OLA. ....	52
Figura 24 - Curvas $\tan \delta$ em função da temperatura para as amostras de quitosana graftizada em diferentes proporções. ....	53
Figura 25 - Variação nas propriedades mecânicas estudadas dos copolímeros graftizados em relação as composições obtidas. ....	56
Figura 26 - Variação da temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ) ( $\blacktriangle$ ) com o grau de substituição (GS) % e a razão entre a proporção dos materiais de partida (mol/mol) ( $\blacksquare$ ) para todos os copolímeros sintetizados. ....	57
Figura 27 - Comportamento da elongação de amostra graftizada (CG 06), antes e durante a elongação. ....	58
Figura 28 - Mecanismo proposto para a formação da <i>N</i> -succinilquitosana. ....	59
Figura 29 - Espectros de infravermelho da quitosana e quitosana substituída com anidrido succínico ( <i>N</i> -succinilquitosana). ....	60
Figura 30 - Espectro de RMN $^1\text{H}$ da <i>N</i> -succinilquitosana. ....	62
Figura 31 - Representação esquemática de uma rede polimérica. ....	65
Figura 32 - Mecanismo proposto para a reação entre a <i>N</i> -succinilquitosana e o ácido láctico. ....	66
Figura 33 - Filme de uma rede polimérica em contato com a pele. ....	67
Figura 34 - Espectros de FTIR dos precursores e das amostras CR01 e CR06. .	69
Figura 35 - Estrutura proposta para a rede polimérica com os carbonos numerados de acordo a atribuição dos sinais obtidos por RMN. ....	70



Figura 36 - Comparação entre espectros MultiCP das amostras CR01 e CR06 ; Para melhorar a visualização da região de interesse, a região de 110 a 160 ppm foi removida.....	71
Figura 37 - Espectros MultiCP de todas as amostras CR. ....	72
Figura 38 - Porcentagem de ligações cruzadas <i>versus</i> concentração de OLA na amostra. ....	74
Figura 39 - Curvas termogravimétricas para as redes poliméricas. ....	75
Figura 40 - Primeira derivada das curvas termogravimétricas para as composições reticuladas. ....	76
Figura 41 - Curvas $\tan \delta$ em função da temperatura para as amostras de redes poliméricas em diferentes proporções de OLA adicionado. ....	79
Figura 42 - Variação nas propriedades mecânicas estudadas das redes poliméricas relacionado a cada amostra obtida. ....	81
Figura 43 - Correlações entre as propriedades mecânicas e a massa de OLA incorporada para os copolímeros graftizados e as redes poliméricas.....	83
Figura 44 - Correlações entre a temperatura de transição vítrea e a massa de OLA incorporada para os copolímeros graftizados e as redes poliméricas.....	84

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 - Massas molares dos PLA's sintetizados obtidos por GPC correspondentes ao tempo de reação. ....	25
Tabela 2 - Quantidades utilizadas nas reações de obtenção de copolímeros graftizados contendo quitosana e poli(ácido DL-lático). ....	34
Tabela 3 - GP dos copolímeros graftizados obtido via RMN do estado sólido <sup>a)</sup> ...	43
Tabela 4 - Massas utilizadas na análise e resultados obtidos após o tempo determinado de reação para a quitosana e para os copolímeros graftizados. ....	46
Tabela 5 - Massas dos copolímeros graftizados antes e depois da extração soxhlet. ....	46
Tabela 6 - GP dos copolímeros graftizados obtido via reação química com salicilaldeído e GP obtido via RMN do estado sólido e massa molar teórica. ....	47
Tabela 7- Valores de energia de ligações covalente. ....	49
Tabela 8 - Relação entre as razões molares utilizadas e as temperaturas de transição vítrea obtidas. ....	54
Tabela 9 - Relação da numeração atribuída aos hidrogênios da <i>N</i> -succinilquitosana com os respectivos sinais obtidos por <sup>1</sup> H RMN. ....	61
Tabela 10 - Quantidades utilizadas nas reações de obtenção das redes poliméricas. ....	64
Tabela 11 - Temperaturas de transição vítrea obtidas para as redes poliméricas. ....	77

**LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS**

FDA - US Food and Drug Administration	FTIR - Infravermelho com transformada de Fourier
GD - Grau de desacetilação	MEV - Microscopia eletrônica de varredura
GP - Grau de polimerização	DMA - Análise dinâmico-mecânica
GS - Grau de substituição	TGA - Análise termogravimétrica
PLLA - Poli(ácido L-lático)	UV- Vis - Espectroscopia na região do ultravioleta-vísivel
PDLA - Poli(ácido D-lático)	DTG - Derivatização da curva termogravimétrica
PDLLA - Poli(ácido DL-lático)	RMN - Ressonância magnética nuclear
PLA - Poli(ácido DL-lático)	tan $\delta$ - Fator de amortecimento
OLA - Oligo(ácido DL-lático)	$L_0$ - Tamanho inicial das amostras submetidas ao esforço.
$T_m$ - Temperatura de fusão	$^{13}\text{C}$ CPMAS - $^{13}\text{C}$ Cross-Polarization under Magic Angle Spinning
$T_g$ - Temperatura de transição vítrea	$^{13}\text{C}$ SPEMAS - $^{13}\text{C}$ Single Pulse Excitation Magic Angle Spinning
$M_w$ - Massa molar ponderal média	$^{13}\text{C}$ MultiCP - $^{13}\text{C}$ Multiple Cross Polarization under Magic Angle Spinning
GPC - Cromatografia de permeação em gel	CG - Composição grafitizada
THF - Tetraidrofurano	CR - Composição reticulada
PEG - Poli(etileno glicol)	
PVAI - Poli(álcool vinílico)	
PHEMA - Poli(2-hidroxietil metacrilato)	
PAA - Poli(ácido acrílico)	
PMA - Poli(acrilato de metila)	
PAM - Poliacrilamida	

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	2
1.1 Relevância e justificativa .....	2
1.2 Revisão Bibliográfica .....	4
1.2.1 Quitosana.....	4
1.2.1 Propriedades da quitosana.....	6
1.2.2 Modificações químicas da quitosana .....	6
1.2.3 Aplicações.....	7
1.2.4 Poli(ácido lático).....	8
1.2.5 Síntese do poli(ácido lático).....	9
1.2.6 Propriedades do poli(ácido lático).....	11
1.2.7 Blendas .....	12
1.2.8 Copolímeros enxertados (copolímeros graftizados).....	12
1.2.9 Redes poliméricas .....	13
2 OBJETIVOS.....	17
2.1 Objetivo geral .....	17
2.1.1 Objetivos específicos.....	17
3 MATERIAIS E MÉTODOS .....	18
3.1 Materiais.....	18
3.2 Metodologia.....	18
3.2.1 Síntese do poli(ácido DL-lático) de baixa massa molar.....	18
3.2.2 Preparação das blendas de quitosana e PLA.....	18
3.2.3 Síntese de copolímeros graftizados entre quitosana e poli(ácido DL-lático). ....	19
3.2.4 Síntese da N-succinilquitosana.....	19
3.2.5 Síntese de redes poliméricas a partir de quitosana, N-succinilquitosana e poli(ácido DL-lático).....	20
3.3 Equipamentos utilizados na caracterização dos produtos.....	20
3.3.1 Cromatografia de permeação em gel - GPC.....	20
3.3.2 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier - FTIR.....	21
3.3.3 Microscopia eletrônica de varredura - MEV.....	21
3.3.4 Análise Mecânico-dinâmica - DMA .....	21
3.3.5 Determinação do grau de acetilação da quitosana e do grau de substituição dos copolímeros graftizados via reação química com salicilaldeído .....	21

3.3.6 Espectroscopia UV-Vis.....	22
3.3.7 Ressonância magnética nuclear.....	22
3.3.8 Análise termogravimétrica.....	23
3.3.9 Ensaios mecânicos.....	23
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	24
4.1 Síntese do poli(ácido DL-lático) de baixa massa molar.....	24
4.2 Preparação das blendas de quitosana e PLA.....	26
4.3 Síntese dos copolímeros graftizados com diversos graus de inserção. ....	32
4.3.1 Infravermelho com transformada de Fourier.....	37
4.3.2 Ressonância magnética nuclear no estado sólido.....	39
4.3.3 Determinação do grau de acetilação e do grau de substituição das aminas livres da quitosana via reação química com salicilaldeído.....	44
4.3.4 Análise termogravimétrica (TGA).....	48
4.3.5 Análise dinâmico-mecânica.....	51
4.4 Síntese da N-succinilquitosana.....	58
4.4.1 Infravermelho com transformada de Fourier.....	59
4.4.2 Ressonância magnética nuclear de $^1H$ .....	60
4.5 Síntese de redes poliméricas contendo quitosana, N-succinilquitosana e poli(DL-ácido lático).....	63
4.5.1 Infravermelho com transformada de Fourier.....	67
4.5.2 Ressonância magnética nuclear no estado sólido.....	70
4.5.3 Análise termogravimétrica.....	74
4.5.4 Análise dinâmico-mecânica.....	76
4.5.5 Ensaios mecânicos.....	80
4.6 Correlações entre os materiais obtidos.....	82
5. CONCLUSÕES.....	85
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	87

# 1 INTRODUÇÃO

---

## 1.1 Relevância e justificativa

Biomaterial pode ser definido como todo material, de origem natural ou sintética, empregado em contato com um sistema biológico. Em conexão com o corpo humano, seja de forma provisória ou ininterrupta, os biomateriais tem por finalidade reconstituir, tratar ou até mesmo substituir funções do corpo humano, assim como órgãos e tecidos [1,2].

A especificidade presente no desempenho de suas funções, ao interagir com o meio biológico, define atualmente os biomateriais como uma classe especial de materiais, sejam estes de origem sintética (polímeros, cerâmicos, metálicos) ou natural (polissacarídeos, fibras protéicas, colágenos purificados) [3-5].

A grande relevância destes materiais deve-se principalmente ao sucesso que vêm conferindo às respostas terapêuticas. Embora estejam sendo amplamente empregados, ainda precisam ser aperfeiçoados para fins terapêuticos [6-9]. Isto se torna evidente quando se faz um paralelo entre o desempenho dos biomateriais com o dos órgãos ou partes do corpo que eles devem substituir [10].

O desenvolvimento de materiais biocompatíveis, destinados à regeneração da pele, são importantes para aprimorar o tratamento de pacientes no mundo todo. A pele, o maior órgão do corpo humano, chega a apresentar dois metros quadrados de área e é responsável em desempenhar o papel de barreira ao ambiente externo, regulando a temperatura corpórea, excretando substâncias e protegendo o organismo contra agentes potencialmente agressivos provenientes do exterior. O trauma à pele pode ser causado por agentes químicos, físicos, energia térmica, elétrica, nuclear, entre outras. Doenças como diabetes, que diminuem a circulação sanguínea, também causam sérias lesões ao tegumento. Cerca de 2,6 milhões de pacientes, anualmente, são acometidos por lesões da pele com difícil cicatrização somente nos Estados Unidos. Cerca de 1,5 milhões de lesões são relacionadas a queimaduras [11].

No Brasil, dentre as diversas causas de agravo à saúde da população, os acidentes envolvendo queimados assumem um relevante perfil, entretanto, as estatísticas publicadas são escassas e desatualizadas. Estima-se que no Brasil, aconteçam cerca de 1.000.000 acidentes por queimadura ao ano.

Embora existam materiais eficazes destinados ao tratamento de queimaduras disponíveis no mercado, normalmente o custo do tratamento é bastante elevado, principalmente devido ao custo dos curativos e à necessidade de sua frequente troca [12-14]. Assim, um dos grandes desafios da pesquisa na área de regeneração de pele consiste no desenvolvimento de biomateriais a partir de matérias-primas de baixo custo, fácil acesso e com características adequadas para a função destinada. Neste aspecto, se destaca a quitosana, conforme descrito a seguir.

Dentre os trabalhos mais expressivos relacionados ao emprego deste polímero, destacam-se os de Muzzarelli *et. al* que apresenta uma revisão sobre a utilização da quitosana associada ao ácido hialurônico e ao sulfato de condroitina na regeneração de cartilagem. Os autores ressaltam que embora a associação desses compostos seja considerado um grande avanço na engenharia de tecidos, os materiais apresentam propriedades mecânicas e elasticidade muito pobres, uma grande limitação para essa área [15]; o trabalho de Busilacchi *et. al* revisou o estudo da imobilização de colágeno ou fibronectina sobre quitosana na forma de nanopartículas com a constatação da melhora significativa no processo de adesão (crescimento) de diversos tipos de células. Por outro lado, o autor levanta a questão de que curativos a base de quitosana para o tratamento de pequenas feridas não têm o devido destaque em grande parte pelas propriedades mecânicas ainda pouco atraentes, mas por outro lado é evidente que os fabricantes que controlam esse mercado não demonstram interesse em promover pesquisas de novos materiais [16].

A literatura atual contém dezenas de trabalhos que usam a quitosana como protagonista na regeneração óssea e celular [17-22] e muito embora sua resposta biológica tenha apresentado resultados extraordinários o grande desafio que perdura é encontrar formas de utilização como materiais que apresentem respostas físicas e mecânicas e biológicas adequadas ao tratamento, otimizando sua utilização com as atividades do paciente, promovendo eficácia, segurança, saúde e bem-estar. Considerando os resultados reportados torna-se evidente que

a combinação das importantes propriedades biológicas da quitosana com melhores características mecânicas constitui um desafio importante, e esta foi a motivação do presente trabalho. A estratégia adotada foi a combinação da quitosana com poli(DL-ácido láctico), de modo que as novas propriedades mecânicas não sejam obtidas às custas das biopropriedades do material de partida. Segue-se uma breve apresentação sobre estes dois polímeros.

## **1.2 Revisão Bibliográfica**

### *1.2.1 Quitosana*

A descoberta da quitosana remonta ao século 19 quando Rouget discutiu as formas de desacetilação da quitina em 1859 [23]. Nos últimos 20 anos, uma substancial quantidade de trabalhos focalizou a quitosana e seu alto potencial para modificações químicas e bioaplicações [24].

Tanto a quitosana quanto a quitina, seu precursor, são poli aminosacarídeos de origem natural, sendo a quitina um dos recursos orgânicos renováveis mais abundantes do mundo, ocupando o segundo lugar depois da celulose. É um dos principais constituintes das conchas de crustáceos, dos exoesqueletos de insetos e da parede celular de fungos onde fornece resistência e estabilidade [24].



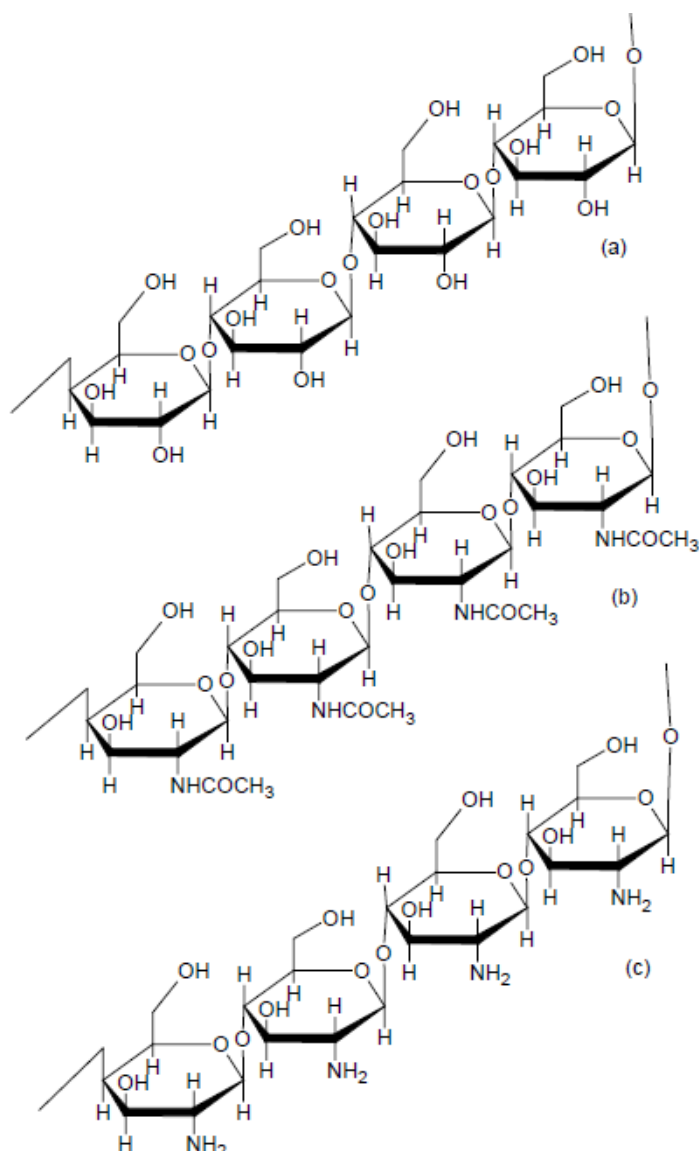


Figura 1 - Estrutura da celulose, quitina e quitosana, (a), (b) e (c) respectivamente.

Quimicamente, a quitosana é semelhante à celulose (Figura 1a) substituindo-se os grupos OH do carbono 2 de cada unidade glucosídica da celulose por grupos amino (NH<sub>2</sub>). Logo a quitosana é um polissacarídeo contendo cadeias de  $\beta$ -(1-4)-2-amino-2-deoxi-D-glucose, formando uma cadeia polimérica linear (Figura 1c) [24].

A quitosana (Figura 1c) é o principal derivado da quitina (Figura 1b), e é obtida por *N*-desacetilação em uma extensão variável, que é caracterizada pelo grau médio de desacetilação (GD), que representa o percentual de grupos NH<sub>2</sub> livres, sendo geralmente representado como um copolímero de 2-amino-2-deoxi-D-glucose e 2-acetamido-2-deoxi-D-glucose. Quando o grau de desacetilação

(GD) da quitina alcança em torno de 50% (dependendo da origem do polímero) ela se torna solúvel em meio aquoso ácido e o material resultante é chamado quitosana. A solubilização ocorre pela protonação da função  $-NH_2$  no carbono 2 da unidade repetitiva D-glucosamina. O polissacarídeo é então convertido em um polieletrólito em meio ácido. Entretanto, a solubilidade depende de vários parâmetros, entre os quais se destacam GD, massa molar, concentrações do ácido e do polímero e da força iônica do meio [24].

### *1.2.1 Propriedades da quitosana*

A presença de grupamentos amino e hidroxilas lábeis, tornam a quitosana especialmente interessante para diversos tipos de modificações químicas. Adicionalmente, os grupos amino tornam a quitosana um dos únicos polieletrólitos catiônicos encontrados na natureza, esta condição confere propriedades singulares ao polímero [25]. A quitosana é solúvel em meios aquosos ácidos de  $pH < 6,5$  e quando dissolvida possui carga positiva localizada nos grupos  $-NH_3^+$ ; adere a superfícies carregadas negativamente, agrega-se com compostos polianiônicos, e funciona como agente quelante de íons de metais pesados [26]. Tanto a solubilidade em soluções ácidas quanto a agregação com poliânions atribuem excelentes propriedades à quitosana na forma de gel [27]. Estas propriedades, aliadas às características biológicas que incluem biocompatibilidade e biodegradabilidade justificam o uso da quitosana em produtos não tóxicos, fisiologicamente inertes, de afinidade notável a proteínas, tendo ainda propriedades hemostáticas, fungistáticas, antitumorais e anticolesterolêmicas [28,25,29]. A quitosana, oferece um potencial extraordinário numa larga faixa de aplicações que tendem a crescer rapidamente à medida que sua produção industrial aumente. De maneira importante, como biopolímeros e materiais biodegradáveis, a quitosana é um material seguro para os seres humanos e para o ambiente natural [30-32].

### *1.2.2 Modificações químicas da quitosana*

A estrutura da quitosana (Figura 2) é de grande utilidade na síntese orgânica, principalmente no que diz respeito à modificação química seletiva,

devido ao distinto grau de reatividade do grupamento amino, de maior nucleofilicidade, ligado no carbono 2 (C2), do que hidroxilas primárias e secundárias ligadas respectivamente nas posições C6 e C3 do anel glucosamínico da cadeia polimérica; sendo ainda que a hidroxila secundária necessita de um agente desprotonante para ficar disponível às reações [24]. Desta forma, os grupamentos químicos da quitosana obedecem a seguinte ordem decrescente de reatividade:  $C2 > C6 > C3$ . Portanto, não é surpreendente que um elevado número de investigações tenham reportado estratégias sintéticas em que a modificação seletiva dos grupamentos químicos da quitosana foi estudada [33-37].

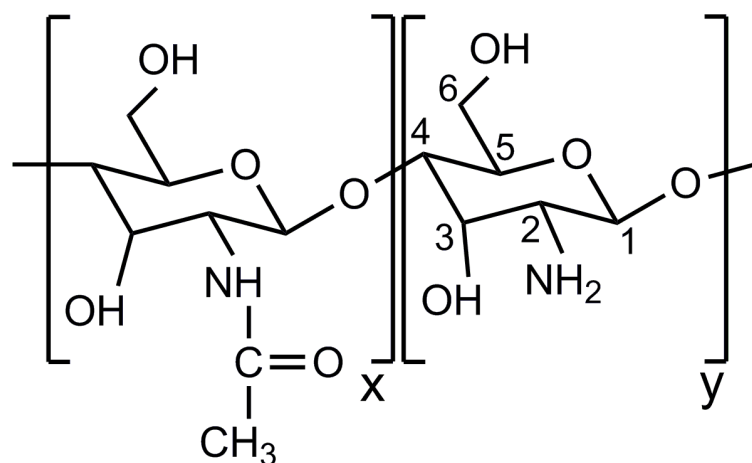


Figura 2 - A estrutura da quitosana com numeração atribuída aos átomos de carbono.

### 1.2.3 Aplicações

O desenvolvimento do conhecimento e aprofundamento científico sobre a quitosana e suas aplicações nos últimos 20 anos, podem resumidamente ser relacionados à:

- i) uso da quitosana como um suplemento dietético e de preservação de alimentos (produtos dietéticos anticolesterolêmicos, revestimentos antimicrobiais para grãos e de frutas exóticas) [38-40];
- ii) avanços tecnológicos (corantes, adsorventes de espécie solúveis e ingredientes funcionais em cosméticos) [41,39];
- iii) inibição de biossíntese (inseticidas) [42];
- iv) enzimologia (isolamento e caracterização das enzimas que tem interação com a quitosana, de sua biologia molecular e de biossíntese) [43];

v) combinações de quitosana com os polímeros naturais e sintéticos (enxertos, complexação de polieletrólitos; misturas, revestimentos) [44,45,42,46];

vi) significância bioquímica (coagulação do sangue, restauração de lesões, regeneração óssea, atividade imunoadjuvante)[46-48].

#### *1.2.4 Poli(ácido lático)*

O Poli(ácido lático) foi sintetizado pela primeira vez em 1932 por Wallace Carothers (DuPont) produzindo um produto de baixa massa molar pelo aquecimento do ácido lático sob vácuo [49]. Em 1954 a DuPont produziu e patenteou um polímero com alta massa molar.

O Poli(ácido lático) tem como expectativa amplas aplicações, não somente como plástico biodegradável, mas também como material biomédico, por ser altamente hidrolisável no corpo humano. Por estas razões, vem sendo usado desde 1970 para aplicações biomédicas e farmacêuticas tais como suturas e dispositivos de liberação controlada de fármacos [50,51], os quais devem ser biocompatíveis, atóxicos e ainda devem apresentar propriedades mecânicas adequadas para possibilitar a implantação no corpo humano.

O Poli(ácido lático) possui dois estereoisômeros: poli(L-ácido lático) (PLLA) e o poli(D-ácido lático) (PDLA) e sua mistura racêmica gera o poli(DL-ácido lático) (PDLLA). O PDLA e PLLA (isômeros destrorrotatórios e levorrotatórios) são enantiômeros, ambos opticamente puros e semicristalinos, enquanto o PDLLA é racêmico, amorfo e opticamente inativo [52]. O PLLA apresenta boa resistência mecânica, plasticidade térmica, processabilidade e pode sofrer hidrólise no corpo humano resultando em oligômeros e por fim unidades monoméricas de ácido lático, que são inteiramente reabsorvíveis como um intermediário natural no metabolismo [51]. Polímeros baseados em ácido lático tiveram sucesso inicialmente como suturas absorvíveis e depois disso um grande número de dispositivos protéticos foram desenvolvidos [53-55]. Atualmente resinas de PLA são aprovadas pela US Food and Drug Administration (FDA) e órgãos de regulamentação da Europa, para qualquer aplicação alimentícia, algumas aplicações cirúrgicas e na liberação controlada de fármacos [56,57]. Embora o PLLA tenha recebido grande atenção devido às suas excelentes propriedades e biocompatibilidade, seu longo tempo de degradação juntamente com sua alta

cristalinidade acabam causando reações inflamatórias no corpo. Em resposta a esse problema o uso de diferentes concentrações do monômeros opticamente puros demonstraram rápida degradação sem a formação de fragmentos cristalinos durante o processo [58,57].

### 1.2.5 Síntese do poli(ácido lático)

A unidade monomérica do Poli(ácido lático) é o ácido lático (ácido 2-hidroxi propanóico), foi isolado pela primeira vez em 1780 pelo químico sueco Scheele, a partir do soro de leite e produzido comercialmente apenas em 1881 [51]. Aplicações relacionadas a alimentos são o destino de quase toda produção do ácido lático nos Estados Unidos consumindo para este fim quase 85% de sua produção. É comumente usado como agente de tamponamento, aromatizante, acidulante, e inibidor bacteriano em muitos alimentos processados. O ácido lático pode ser fabricado por fermentação de carboidratos ou síntese química, embora a fermentação predomine [51,59]. O ácido lático é bifuncional, como mostrado na Figura 3, possui uma função álcool e uma função ácido carboxílico podendo ser convertido em polímero através de inúmeros procedimentos, sendo os dois principais a policondensação direta de ácido lático; e polimerização obtida via abertura do anel do lactídeo, que é o dímero cíclico do ácido lático [51].

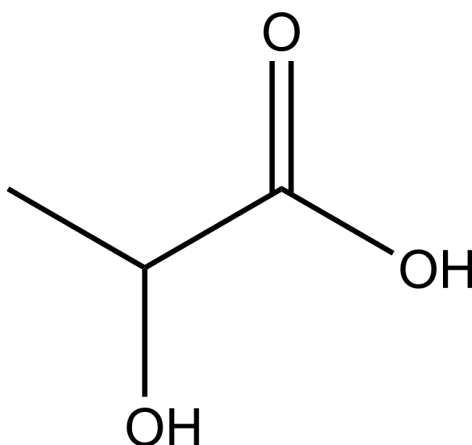


Figura 3 - Estrutura química do ácido lático.

A policondensação direta do ácido lático é a mais simples, porém, resulta em polímeros com baixa massa molar. Esta característica é interessante quando aplicada para a preparação de dispositivos de liberação controlada de

medicamentos. Para se obter maior grau de polimerização deve-se usar como monômero de partida o lactídeo [51]. As principais formas de obtenção do PLA são mostradas na Figura 4.

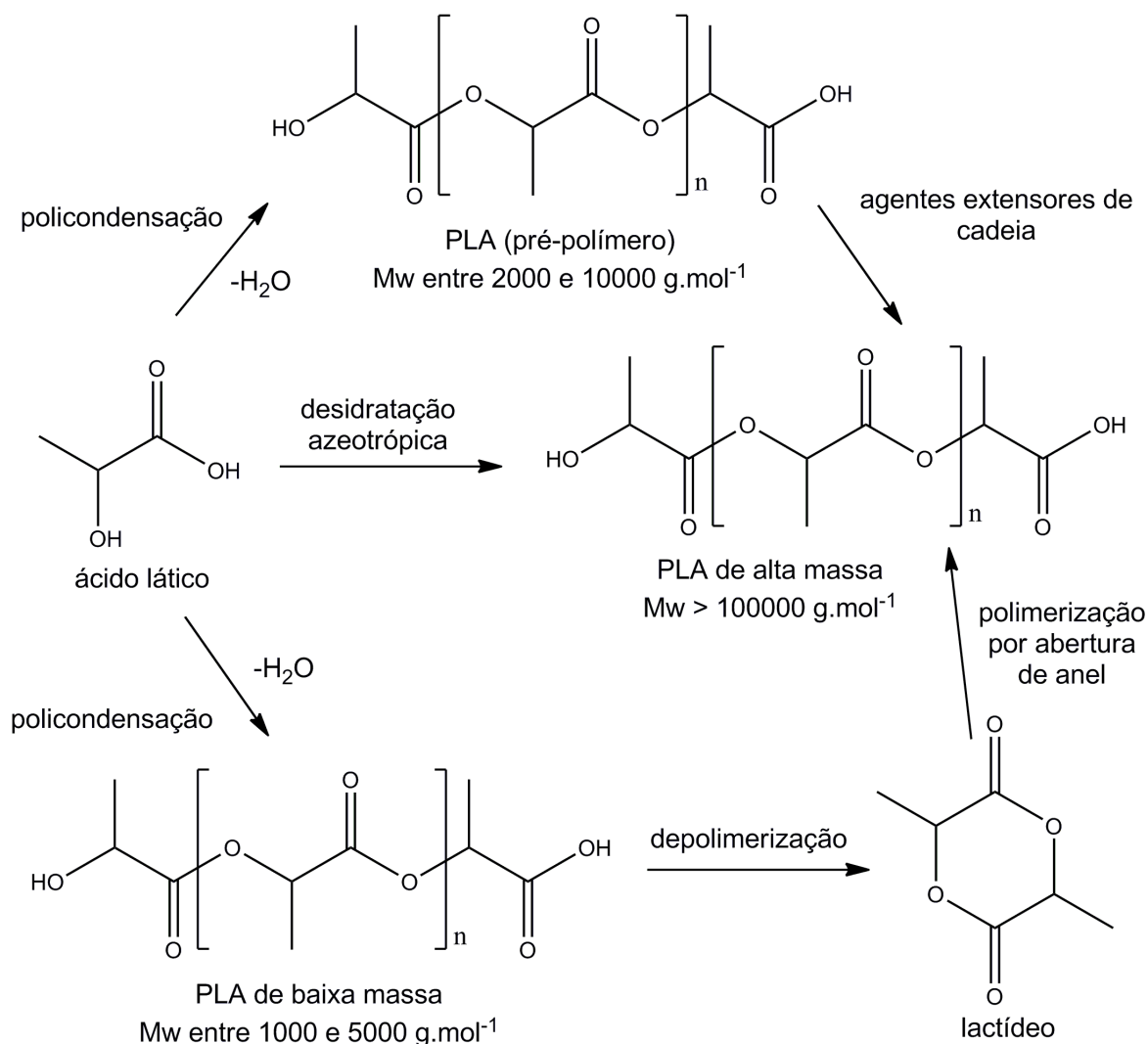


Figura 4 - Rotas mais utilizadas na obtenção do poli(ácido láctico) [51].

A reação de polimerização por abertura de anel do lactídeo pode ser conduzida no estado fundido ou em solução, sendo necessário o uso de um iniciador. Dependendo do iniciador, a reação pode seguir três diferentes mecanismos de reação: catiônico, aniônico ou complexação seguido por inserção. Os catalisadores mais utilizados são complexantes, tais como: compostos de alumínio, bismuto, zinco e estanho [60].

A nomenclatura dos polímeros gerados são baseados em sua origem monomérica. Quando parte-se do monômero de ácido láctico, o polímero é denominado poli(ácido láctico), enquanto que se o monômero de partida for o

lactídeo, o polímero obtido na síntese será chamado de poli(lactídeo). O poli(L-ácido láctico) e o poli(L-lactídeo) apresentam a mesma fórmula estrutural e estes dois nomes distintos se referem exclusivamente ao monômero de partida usado na síntese. Na literatura é usual o emprego da sigla PLLA sendo conveniente o uso da letra "D" quando se tratar de molécula dextrorrotatória.

#### *1.2.6 Propriedades do poli(ácido láctico)*

As propriedades do poli(ácido láctico), tais como o ponto de fusão, a resistência mecânica, e cristalinidade, são determinadas pela estrutura do polímero (determinada por proporções diferentes de L, de D, ou de meso-lactídeo) e pela massa molar [61]. A estereoquímica e a história térmica tem influencia direta na cristalinidade, e, por conseguinte, em suas propriedades em geral. O poli(ácido láctico) composto por mais de 90% de PLLA tende a ser cristalino, enquanto a mistura racêmica é amorfa. A temperatura de fusão ( $T_m$ ) e a temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ) do poli(ácido láctico) diminuem quanto menores forem as concentrações de PLLA. Características físicas como densidade, capacidade calorífica e propriedades mecânicas e reológicas do poli(ácido láctico) são dependentes de suas temperaturas de transição [62]. Para o poli(ácido láctico) amorfo a temperatura de transição vítrea é um dos mais importantes parâmetros gerando mudanças na mobilidade da cadeia que predizem o comportamento do polímero [63].

A cristalinidade dos polímeros também influencia seu uso. O PDLLA possui característica amorfa, é usado em aplicações de liberação controlada de medicamentos, as quais requerem a dispersão uniforme da espécie. Em contrapartida, o PLLA e o PDLA (que possuem característica cristalina) podem ser encontrados em dispositivos ortopédicos que requerem força e resistência mecânica elevada [64].

O poli(ácido láctico) pode ser processado por injeção, moldagem por sopro ou extrusão [61]. Além dessas propriedades características, tecnologias têm sido desenvolvidas para flexibilizar o uso do PLA como recurso de base renovável[65]. Neste trabalho será utilizado o poli(ácido láctico) racêmico, denominado simplesmente PLA ou OLA quando tratado como oligômero.

### 1.2.7 *Blendas*

As blendas de polissacarídeos naturais e polímeros sintéticos são sistemas de grande importância para a criação de novos materiais poliméricos. Estas blendas são materiais interessantes para a produção de filmes ou compósitos poliméricos, esponjas, hidrogéis, resinas trocadoras de íons, agentes complexantes, membranas, curativos, encapsuladores de medicamentos, suturas, etc. As propriedades físico-químicas e mecânicas das blendas são determinadas pelo tipo de interação que há entre os seus componentes, sua compatibilidade, e as características da estrutura supramolecular formada [66-69].

O crescente interesse em quitina e quitosana nas últimas décadas resultou na publicação de muitos estudos sobre a produção e investigação das propriedades das blendas desses polissacarídeos com outros polímeros naturais e sintéticos [70]. Como as propriedades físicas e mecânicas da quitina e da quitosana são relativamente fracas (ausência de maleabilidade, inflexibilidade, elevada higroscopicidade etc), a sua utilização na obtenção de blendas com polímeros sintéticos e/ou naturais tem grande importância.

### 1.2.8 *Copolímeros enxertados (copolímeros graftizados)*

Um copolímero enxertado ou "graftizado" é uma cadeia polimérica com uma ou mais espécies poliméricas ligadas à cadeia principal na forma de cadeias laterais [71,72]. Assim, pode ser descrita como a estrutura geral apresentada na Figura 5, em que a cadeia principal do polímero "poli(A)", possui ramos do polímero "poli(B)" que emana a partir de diferentes pontos ao longo do seu comprimento.



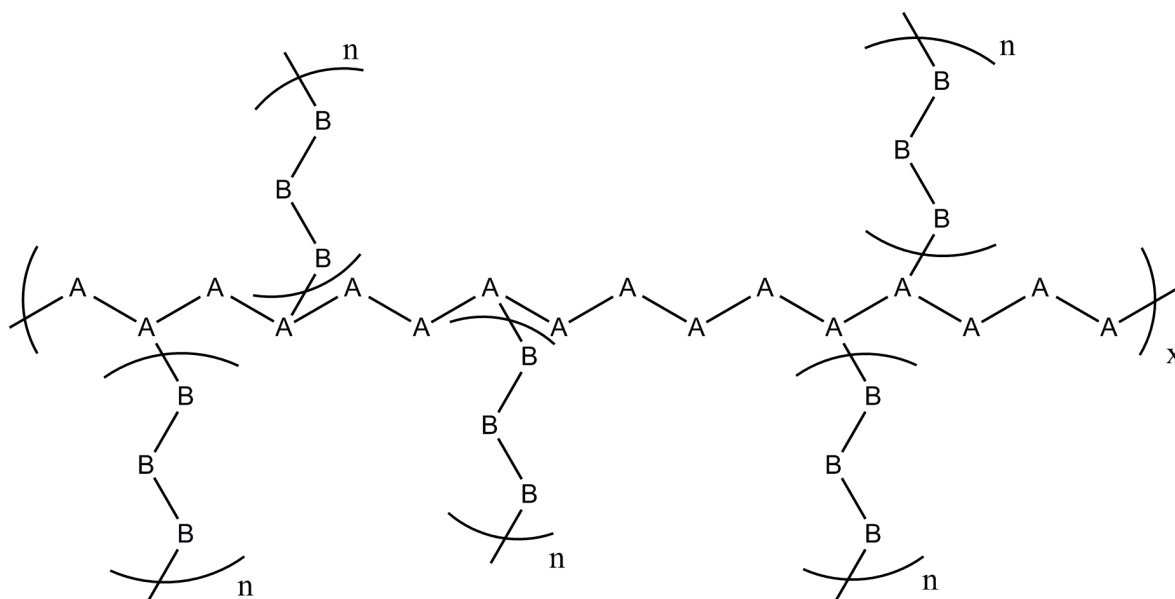


Figura 5 - Estrutura geral para um polímero grafitizado.

A nomenclatura comumente usada para descrever tais estruturas, sendo que poli(A) é grafitizado com poli(B), é poli(A)- copolímeros grafitizado-poli(B) [73], podendo ser ainda mais abreviado como poli(A)-g-poli(B). A grafitização de um polímero sintético é um método conveniente para adicionar novas propriedades à um polímero natural, com perda mínima das propriedades iniciais do substrato. A quitosana possui referidas propriedades que os tornam materiais de partida interessantes para a síntese de copolímeros grafitizados. Nos últimos anos, várias pesquisas têm-se centrado notavelmente na copolimerização via grafitização como um método versátil de modificação da quitosana [74,25,75,76,47,77]. Esta técnica pode ser considerada como uma importante via de obtenção de novos materiais com propriedades melhoradas e, conseqüentemente, combinando as vantagens destes biopolímeros com polímeros de origem sintética e/ou natural.

### 1.2.9 Redes poliméricas

A utilização de redes poliméricas tem seus primeiros relatos em 1960, quando Wichterle e Lim introduziram o uso de hidrogéis a base de poli(2-hidroxietil metacrilato) na fabricação de lentes de contato [78].

Na literatura são encontradas diversas definições para redes poliméricas. Frequentemente, a mais aceita é a definição dada por Peppas e colaboradores

[79]. De acordo com sua definição, redes poliméricas tem habilidade de inchar em água; são estruturas poliméricas contendo: 1 - Ligações covalentes produzidas pela reação de um ou mais monômeros (Figura 6), 2 - Ligações cruzadas fisicamente devido a emaranhamentos das cadeias, 3 - Ligações intermoleculares como ligações de hidrogênio e interações de van der Waals entre as cadeias, ou 4 - cristalitos que possam conter duas ou mais cadeias macromoleculares.

Redes poliméricas podem ser classificadas em diferentes categorias dependendo de vários parâmetros incluindo método de preparação, a carga global e as características estruturais e mecânicas. Com base no método de preparação, redes homopoliméricas ou copoliméricas podem ser obtidas. Também podem ser classificadas como aniônica, catiônica ou neutra dependendo das cargas dos blocos constituintes. E ainda, podem ser classificadas de acordo com sua estrutura física: amorfo, semicristalina, estruturada por ligações de hidrogênio, supramolecular ou helicoidal.

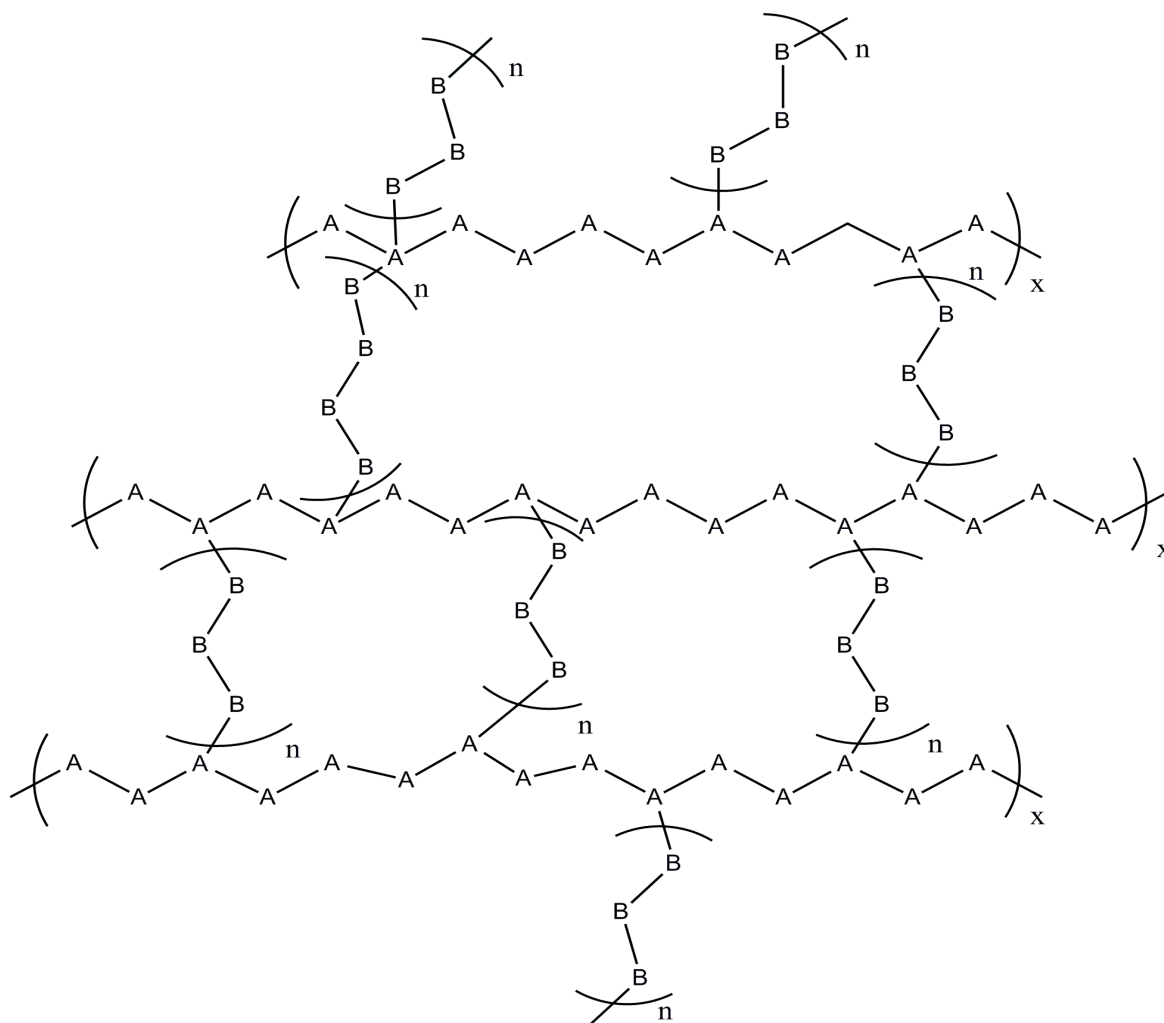


Figura 6 - Exemplo de uma rede polimérica onde as cadeias de "poli(A)" são ligadas por cadeias de "poli(B)", ("poli(B)" é o agente de ligação cruzada).

A utilização de redes poliméricas na forma de hidrogel (os hidrogéis caracterizam-se por apresentar forte afinidade pela água devido à presença de grupos hidrofílicos, tais como: -OH, -COOH, -CONH<sub>2</sub>, -SO<sub>3</sub>H, entre outros) é extremamente adequado para uma variedade de aplicações na área farmacêutica e médica. Estas aplicações se devem a capacidade de reter grandes quantidades de água e devido a sua consistência macia e emborrachada, fatores que assemelham a tecidos vivos [79].

O desenvolvimento de hidrogéis a partir de uma variedade de materiais sintéticos tem proporcionado uma grande flexibilidade em suas características; poli(etileno glicol) PEG [80], poli(álcool vinílico) PVAI [81], poli(2-hidroxietil metacrilato) PHEMA [82], poli(ácido acrílico) PAA [83], poli(acrilato de metila) PMA [84] e poli(acrilamida) PAM [85] já foram todos usados na forma de hidrogéis

com uma variada gama de propriedades mecânicas e respostas biológicas.

Polímeros naturais, como polissacarídeos e proteínas, também podem ser usados para estruturar redes poliméricas bem como hidrogéis. Neste caso há um grande interesse principalmente pelas propriedades intrínsecas deste materiais incluindo biocompatibilidade, baixa toxicidade e suscetibilidade à degradação enzimática [86-88].

Reações de polimerização secundária tem o propósito de eliminar o uso de moléculas formadoras de reticulação, funcionalizando a cadeia polimérica com outros grupos funcionais à partir dos grupos funcionais já existentes, gerando a importante possibilidade de se obter redes poliméricas ligadas covalentemente *in situ*. Vários tipos de ligações covalentes podem ser formadas, dependendo da velocidade desejada de reticulação, da seleção e segmentação dos grupos funcionais reativos. As propriedades das redes poliméricas vão depender principalmente da densidade de reticulação e da razão molar empregada entre os polímeros [79].

Embora a quitosana seja mundialmente reconhecida por suas propriedades singulares, este biopolímero apresenta alguns problemas intrínsecos à suas características físicas, tais como: a baixa resistência mecânica e ausência de maleabilidade. Sua associação ao poli(ácido DL-lático) mostra-se promissora, visto que este polímero de origem sintética apresenta propriedades semelhantes à quitosana, como biodegradabilidade e biocompatibilidade, além de outras propriedades inerentes à este material. Assim, espera-se que o desenvolvimento de novas arquiteturas moleculares possibilitem a manutenção das propriedades mais promissoras destes polímeros, além de se gerar novas propriedades que contribuam para as aplicações cada vez mais específicas que o mundo moderno exige.

## 2 OBJETIVOS

---

### 2.1 Objetivo geral

A proposta deste trabalho tem como objetivo geral a obtenção de materiais à partir de quitosana, com boas propriedades mecânicas, notadamente flexibilidade, sem perder as biopropriedades do polímero original, de modo a ampliar seu espectro de aplicações. Sistemas contendo poli(ácido láctico) com diversas arquiteturas macromoleculares com variação sistemática na composição, e as correlações entre suas propriedades constituem o caminho proposto.

#### 2.1.1 Objetivos específicos

- Síntese do poli(DL-ácido láctico);
- Preparação das blendas com diversas proporções entre os componentes;
- Síntese dos copolímeros graftizados com diversos graus de inserção;
- Síntese da *N*-succinilquitosana;
- Síntese das redes poliméricas com diferentes densidades de reticulação;
- Caracterização química dos sistemas preparados e estudo de suas propriedades térmicas e mecânicas;
- Correlação dos parâmetros estruturais e morfológicos e suas propriedades físicas.

# 3 MATERIAIS E MÉTODOS

---

## 3.1 Materiais

Quitosana de alto peso molecular, grau de desacetilação 75-85%, salicilaldeído 99% e anidrido succínico 99% foram adquiridos junto à Sigma-Aldrich. Ácido DL- lático 90% foi adquirido pela Fluka Analitica. Poli(ácido DL- lático) foi obtido, primeiramente, através de síntese com variação sistemática no tempo de reação e também foram gentilmente cedidos pela Purac Biomaterials Holanda (disponível através de representante em São Paulo) amostras de poli(ácido DL-lático) PURASORB PDL02 E PURASORB PDL04 com Mw de 17000 e 43000 g.mol<sup>-1</sup>, respectivamente. Ácido acético glacial foi adquirido da Vetec. Álcool metílico, álcool etílico, dioxano e acetona foram obtidos pela Synth e clorofórmio obtido pela BIOTEC. Todos os solventes adquiridos possuem grau P.A. e todos os materiais citados foram utilizados sem tratamento prévio.

## 3.2 Metodologia

### 3.2.1 Síntese do poli(ácido DL-lático) de baixa massa molar

As polimerizações do ácido DL-lático (10 mL, 134,2 mmol) foram realizadas em um balão de 50 mL, tri tubulado, alocado em banho-maria de óleo de soja e acoplado a uma coluna de refluxo, um condensador e um balão para recolher o subproduto. A temperatura do sistema foi ajustada em uma placa de aquecimento para manter-se entre 140 e 143 °C com agitação magnética constante do meio reacional. A reação ocorreu sob atmosfera de argônio à uma vazão constante de 3 a 4 litros.min<sup>-1</sup> acoplado a uma das entradas do balão.

### 3.2.2 Preparação das blendas de quitosana e PLA

Tanto a quitosana quanto o PLA foram solubilizadas separadamente em solventes diferentes e miscíveis antes da mistura. A quitosana (2 % em m/v) foi

dissolvida em ácido acético  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  e os PLA's de massa molar 1000, 4200, 17000 e 43000  $\text{g mol}^{-1}$  (2 % em m/v) foram dissolvidos em dioxano. As duas soluções foram misturadas sob agitação vigorosa e constante até que as soluções obtivessem uma aparência uniforme. As blendas foram obtidas em uma estufa, submetidas à temperatura de  $40 \text{ }^\circ\text{C}$  por 4 h, com posterior aplicação de vácuo por mais 8 h. As composições finais de (quitosana/PLA) foram de: 90/10, 70/30, 50/50, 30/70 e 10/90 (m/m).

### 3.2.3 Síntese de copolímeros graftizados entre quitosana e poli(ácido DL-lático).

Cada amostra foi preparada fazendo a dispersão de 1 g (6,21 mmol) de quitosana em um balão de 100 mL, mono tubular, contendo 40 mL de água destilada e então foram adicionadas quantidades pré-determinadas de ácido DL-lático sob agitação magnética, em temperatura ambiente, até a completa solubilização da quitosana. A formação da quitosana graftizada com poli(ácido DL-lático) se dá após o meio reacional ser transferido para placas de Petri colocadas em estufa a  $90 \text{ }^\circ\text{C}$  por 2 h em seguida fechadas sob vácuo por 6h. Para a remoção dos oligômeros e homopolímeros formados paralelamente durante a reação de graftização, todas as amostras foram purificadas via extração soxhlet com clorofórmio por 4 h.

### 3.2.4 Síntese da N-succinilquitosana

Baseado no trabalho de Yamaguchi e colaboradores [89], com algumas modificações, 1g (6,21 mmol) de quitosana foram dissolvidos em 200 mL de uma solução aquosa de ácido acético  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  em um balão tri tubulado de 500 mL sob agitação magnética (esta solução foi chamada de solução A). 1,38 g (14 mmol) de anidrido succínico foi adicionado em um funil de adição contendo 30 mL de acetona e agitado suavemente até a completa dissolução do anidrido (esta solução foi chamada de solução B). Dando continuidade ao procedimento, o funil de adição contendo a solução B foi acoplado a uma das entradas do balão tri tubulado contendo a solução A, regulando a abertura do funil de tal forma que a solução B fosse adicionada gota à gota a solução A, tudo realizado a temperatura ambiente e sob agitação magnética constante. Completada a adição, a

temperatura foi elevada para 40 °C e a reação ocorreu por 4 h. Após o tempo determinado, o meio reacional foi resfriado e precipitado em um excesso de acetona, filtrado para remoção de solvente e então lavado com solução aquosa de acetona 70 % seguida de uma segunda lavagem com acetona pura. Por fim, o produto foi secado à 40 °C sob vácuo por 24 h. A *N*-succinilquitosana foi obtida na forma de um pó branco com rendimento de 2,21 g.

### *3.2.5 Síntese de redes poliméricas a partir de quitosana, N-succinilquitosana e poli(ácido DL-lático)*

0,5 g (1,90 mmol) de *N*-succinilquitosana em pó foram dissolvidas em um balão mono tubular de 50 mL contendo 20 mL de água destilada sob agitação magnética e reservado (esta solução foi chamada de solução A). 0,5 g (3,10 mmol) de quitosana foi dispersa em um balão tri tubular de 100 mL contendo 20 mL de água destilada e então adicionado quantidades pré-determinadas de ácido DL-lático. A solução ficou sob agitação magnética até a completa dissolução da quitosana (solução B). A solução A foi transferida para um funil de adição, acoplado ao balão e gotejada lentamente na solução B sob agitação magnética, após o fim do gotejamento, a solução final foi mantida sob agitação magnética e a temperatura foi elevada, permanecendo entre 60 e 63 °C por 8 h. A formação das redes poliméricas entre quitosana, *N*-succinilquitosana e poli(ácido DL-lático) se dá após o meio reacional ser transferido para placas de Petri colocadas em uma estufa a 90 °C por 2 h, em seguida mantida sob vácuo por 8h. Todas as amostras foram purificadas via extração soxhlet com clorofórmio por 4 h.

## *3.3 Equipamentos utilizados na caracterização dos produtos*

### *3.3.1 Cromatografia de permeação em gel - GPC*

As massas molares dos oligômeros preparados (OLA)s foram determinadas com um cromatógrafo de permeação em gel Agilent modelo 1100, usando THF como eluente e amostras de poliestireno monodisperso como padrões de calibração. (Departamento de Química/UFPR)



### 3.3.2 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier - FTIR

Medidas de refletância total atenuada foram feitas utilizando o espectrômetro Nicolet Nexus 670 com acessório de refletância feito de zinco e selênio, com índice de refração de 2,4 e ângulo de incidência de 45°. O intervalo usado foi de 4000 a 650  $\text{cm}^{-1}$  com resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$ . Os filmes foram colocados em contato direto com o cristal e uma média de 100 varreduras foi tomada para cada superfície. (Instituto de Física de São Carlos/USP-São Carlos)

### 3.3.3 Microscopia eletrônica de varredura - MEV

As composições foram colocadas em um suporte específico e submetidos à metalização com ouro, utilizando o aparelho BALTEC SCD 005 - Sputter Coater. As amostras foram visualizadas ao microscópio eletrônico de varredura Phenom - FEI, com faixa de magnificação de 20 a 24000 vezes, nas condições de 15kV e aumentos de 1540 até 10200 vezes. (Departamento de Física /UFPR)

### 3.3.4 Análise Mecânico-dinâmica - DMA

Os materiais foram estudados realizando a análise mecânico dinâmica em um equipamento Netzsch DMA 242C com uma amplitude de 10  $\mu\text{m}$ , de -150 °C até 300 °C com uma taxa de aquecimento de 3  $\text{K}\cdot\text{min}^{-1}$  na frequência de 1Hz utilizando o acessório "single cantilever bending" com suporte apropriado. (Instituto de Física de São Carlos/USP-São Carlos)

### 3.3.5 Determinação do grau de acetilação da quitosana e do grau de substituição dos copolímeros graftizados via reação química com salicilaldeído

O grau de acetilação e o grau de substituição dos grupamentos amina da quitosana foi determinado pela formação do *N*-salicidenoquitosana pela reação do salicilaldeído com as aminas livres da quitosana pura e após as reações de graftização. Os materiais foram exaustivamente macerados até a obtenção de um pó muito fino, então, amostras precisamente pesadas foram imersas por 48 h em 90 mL de uma solução aquosa 0,1  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  de ácido acético e metanol na

proporção 20:80, contendo  $0,02 \text{ mol.L}^{-1}$  de salicilaldeído. Após 48h, uma porção do filtrado foi diluída 1000 vezes e a absorvância foi medida no comprimento de onda de 255 nm para determinar a concentração residual de salicilaldeído pela comparação com a solução inicial (Laboratório de Polímeros Paulo Scarpa - LaPPS).

### 3.3.6 Espectroscopia UV-Vis

As medidas de absorção foram feitas no espectrômetro Shimadzu UV 2401 PC, feixe duplo no comprimento de onda de 255 nm. (Departamento de Química /UFPR)

### 3.3.7 Ressonância magnética nuclear

#### 3.3.7.1 Espectros de RMN de $^1\text{H}$

Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  foram adquiridos diretamente pela solubilização da *N*-succinilquitosana em  $\text{D}_2\text{O}$  e analisados no espectrômetro de RMN Bruker AVANCE 400, operando a 9,4 Tesla, observando o núcleo de hidrogênio a 400,13 MHz, equipado com uma sonda multinuclear de observação direta de 5 mm. (Departamento de Bioquímica /UFPR)

#### 3.3.7.2 Espectros de RMN no estado sólido

Os experimentos de RMN no estado sólido foram realizados em um espectrômetro VARIAN INOVA 400, cujas frequências de ressonância do carbono e hidrogênio foram, respectivamente, 88,02 e 350,50 MHz, utilizando uma sonda VARIAN de 7 mm, equipada de um sistema de rotação da amostra em torno do ângulo mágico (MAS), com estabilidade de  $\pm 2$  Hz. Pulso típico de  $4.0 \mu\text{s}$  foi aplicado tanto para o  $^{13}\text{C}$  quanto  $^1\text{H}$ . O campo de desacoplamento de proton foi de 60 kHz utilizando a sequência TPPM (Time proportional phase modulated) [90,91], e foi utilizado em todos os experimentos. Polarização cruzada sob rotação do ângulo mágico CPMAS (Cross-Polarization under Magic Angle Spinning) com

rampa de radiofrequência, foi obtida usando um tempo de polarização cruzada de 1 ms e tempo de repetição entre as sequências de 2 s.

Experimentos quantitativos de  $^{13}\text{C}$  utilizando excitação de pulso único, também sob rotação em torno do ângulo mágico e TPPM de desacoplamento  $^1\text{H}$  de alta potência, SPEMAS (Single Pulse Excitation Magic Angle Spinning), foram realizadas com um tempo de repetição entre as sequências de 20 s para as amostras graftizadas.

Experimentos MultiCP ( $^{13}\text{C}$  Multiple Cross Polarization under MAS) foram utilizados na quantificação das amostras de redes. Os experimentos foram obtidos usando nove períodos de polarização cruzada com o tempo de 1 ms espaçado pelo período de repolarização  $t_z$  igual a 0,9 s menos o último período que foi de 0,8 ms.

Os atrasos de reciclagem foram 2 s. MultiCP é um método recentemente proposto que pode fornecer espectros de ressonância magnética nuclear  $^{13}\text{C}$  quantitativo com elevadas razões de sinal-para-ruído de um curto período de tempo em comparação com o polarização direta quantitativa padrão. Mais detalhes sobre o método, juntamente com a sequência de pulsos pode ser encontrado na referência [92]. (Instituto de Física de São Carlos/USP-São Carlos)

### 3.3.8 *Análise termogravimétrica*

O ensaio de termogravimetria foi realizado em equipamento de análise térmica simultânea, STA 449 NETZSCH, onde cerca de 16 mg de amostra foram aquecidos a partir de 0 °C, em atmosfera de nitrogênio, a uma taxa de 10 °C.min<sup>-1</sup> até 600 °C. (LACTEC/UFPR)

### 3.3.9 *Ensaio mecânicos*

Os ensaios de tração foram realizados com amostras em forma de gravatas, na velocidade de 10 mm.min<sup>-1</sup>, em equipamento INSTRON modelo 4467 com célula de carga 100 Kgf e  $L_0$  de 10 mm. (LACTEC/UFPR)

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

---

### 4.1 Síntese do poli(ácido DL-lático) de baixa massa molar

A síntese do PLA por policondensação do ácido DL-lático foi realizada sem adição de solventes e/ou catalisadores. Buscando obter um melhor entendimento sobre a obtenção deste poliéster, seu aspecto e comportamento em diferentes massas molares, a estratégia sintética foi elaborada levando em conta parâmetros que favorecessem a formação do produto e uma maior taxa de conversão da policondensação do ácido DL-lático.

A reação foi executada sob agitação moderada e constante facilitando a remoção da água (o subproduto da reação) e possivelmente retirando oligômeros em crescimento, cujo ponto de ebulição esteja abaixo da temperatura do meio reacional. A temperatura, que em reações preliminares chegou a 200 °C, foi continuamente ajustada até ser fixada em 140 °C podendo chegar até 143 °C.

A aplicação de pressão reduzida a 300 mbar nas reações iniciais resultou em refluxo rápido da água livre acompanhado com grandes quantidades de ácido DL -lático. Esse procedimento influenciou de forma negativa a taxa de conversão do material e o rendimento da reação. A fim de aperfeiçoar o procedimento acima, a redução controlada de pressão foi descontinuada.

Para evitar reações de oxidação, um fluxo de gás argônio foi aplicado através do sistema e permaneceu contínuo durante todo período reacional. Levando em consideração o perfil de temperatura do vapor durante a reação de policondensação observada, relata-se que a destilação inicia com a água (~100 °C), continua com ácido láctico (~120 °C) e, finalmente, alguns são oligômeros retirados do meio ( $\geq 145$  °C). Para evitar que o produto e o reagente fossem extraídos foi ajustado o tamanho da coluna de Vigreux; com uma coluna um pouco maior, foi observado que apenas o subproduto estava sendo extraído do meio reacional.

O polímero obtido a partir do procedimento acima, foi caracterizado por GPC para medir sua massa molar e mostra de forma significativa valores mais elevados de massa molar em comparação com outras amostras produzidas neste

trabalho com diferentes variáveis. Depois de encontrar o equilíbrio sob os parâmetros acima discutidos, a variável restante foi o tempo de reação. Arbitrariamente foi estipulado que as reações de síntese do PLA seriam realizadas com uma variação de 3 horas, os valores de massas molares ponderais médias estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1 - Massas molares dos PLA's sintetizados obtidos por GPC correspondentes ao tempo de reação.

Tempo de reação	Massa molar ponderal média - Mw (g.mol <sup>-1</sup> )
3 h	700
6 h	750
9 h	850
12 h	1000
15 h	1300
18 h	2500
21 h	3500
24 h	4200

Na Figura 7 pode-se observar a evolução da massa molar do PLA frente à variação de tempo e dois comportamentos distintos chamam a atenção.

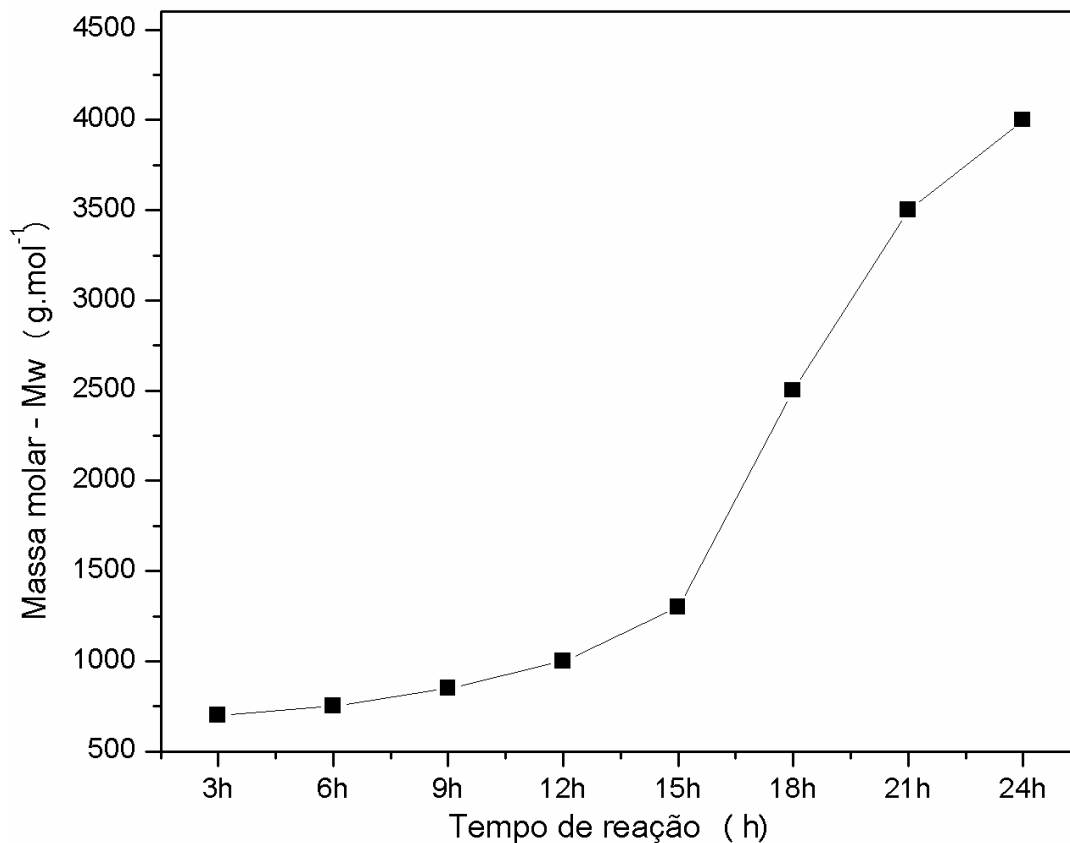


Figura 7 - Relação entre tempo de reação e massa molar.

Na faixa de tempo que vai de 3 a 15h, há um acríve pouco evidente no aumento da massa molar. De 15 horas de reação em diante esta variação é bem mais efetiva e pode estar relacionado com a formação de oligômeros, que na ausência de monômeros, reagem entre si causando um aumento pronunciado na curva e, conseqüentemente, massas molares maiores.

O PLA ainda foi caracterizado por FTIR e DMA, os resultados serão encontrados ao longo da discussão onde complementam os resultados dos materiais obtidos.

#### 4.2 Preparação das blendas de quitosana e PLA

Blendas de quitosana com PLA foram preparadas baseando-se em alguns métodos da literatura [93-95] com diversas modificações. Polissacarídeos contendo grupamentos polares podem formar ligações de hidrogênio com os grupos funcionais complementares de polímeros sintéticos que, por sua vez, leva a maior compatibilidade entre os componentes. Os polímeros sintéticos capazes

de formação de ligação de hidrogênio incluem poliamidas, poliésteres, alguns polímeros vinílicos, entre outros. No entanto, a tendência desses componentes para a auto-associação muitas vezes é maior que a interação e a compatibilidade de polissacarídeos com um componente da classe sintética [96].

O desafio básico da preparação das blendas neste trabalho foi encontrar um solvente que tenha propriedade de dissolver tanto a quitosana quanto o OLA, sem a ocorrência de reações paralelas e/ou processos de decomposição. Neste caso, não foi possível satisfazer esta necessidade sem, por exemplo, uma prévia compatibilização de um dos componentes, seja por modificação química de um dos precursores a ser misturado ou adição de um agente compatibilizante. Estas possibilidades não foram tentadas para não se alterar as características dos componentes, dificultando a comparação com as outras arquiteturas moleculares (copolímeros graftizados e redes poliméricas).

Embora a solução se mostrasse homogênea após a agitação e antes da secagem, o que se observava decorrido o tempo necessário para secagem era um material quebradiço e de coloração opaca.

A segregação dos materiais sugerida pelo aspecto das blendas obtidas foi avaliada a nível microscópico pela técnica de MEV. Devido a similaridade entre as amostras, as composições 90/10 (quitosana/PLA) analisadas, pois se uma pequena quantidade de PLA formasse estrutura heterogênea, com as composições de maior proporção de PLA também o fariam. foram escolhidas para a análise.

As imagens, em todas as blendas analisadas, apresentaram estruturas heterogêneas como era sugerido pela observação a olho nu. Há ainda uma discrepância interessante observada entre os PLA's sintetizados de 1000 e 4200 g.mol<sup>-1</sup> e os PLA's de 17000 e 42000 g.mol<sup>-1</sup> adquiridos comercialmente cujas fotomicrografias são apresentadas respectivamente nas Figuras 8, 9, 10 e 11.

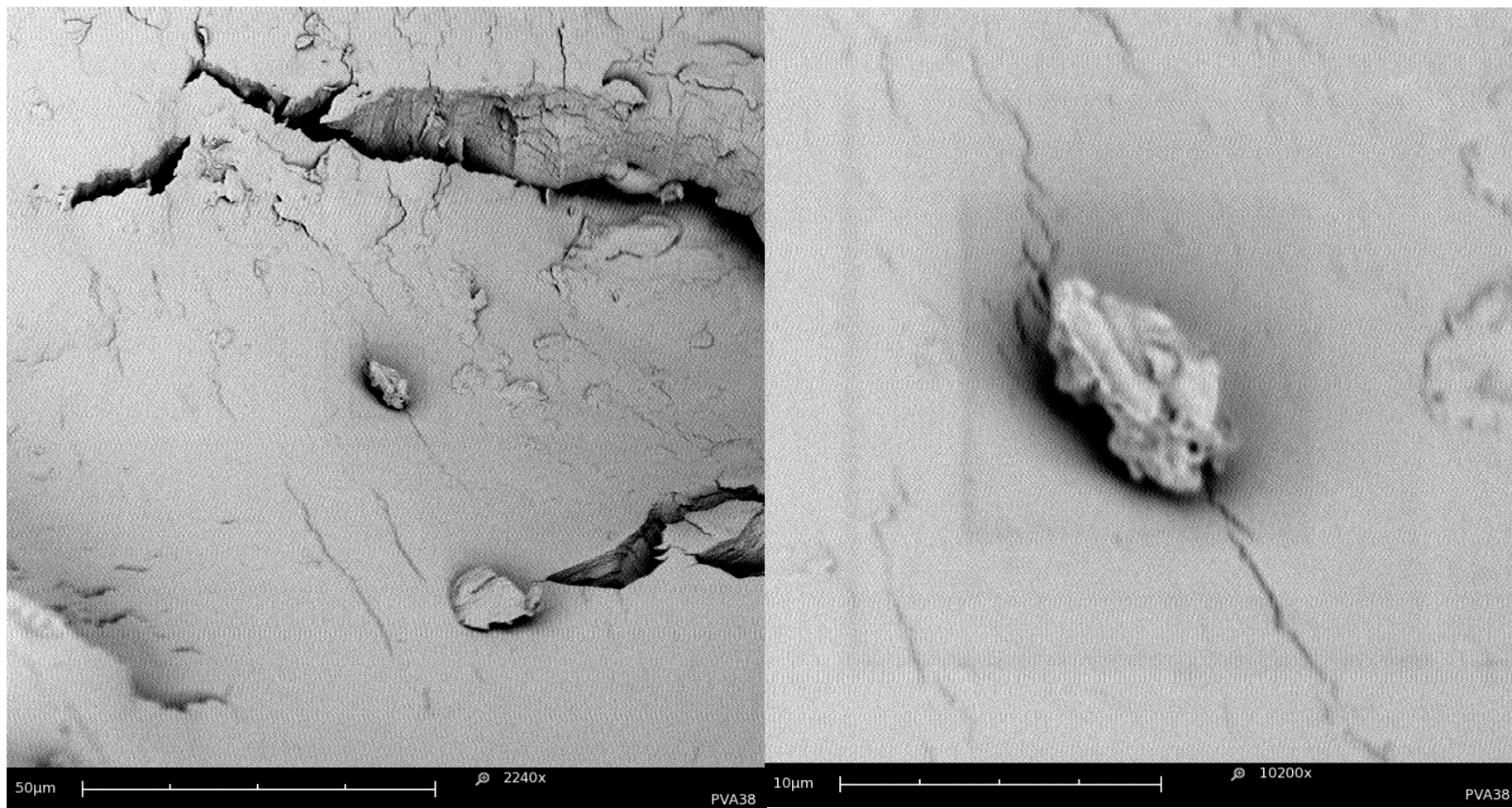


Figura 8 - Fotomicrografias das blendas 90/10 obtidas utilizando PLA de  $1000 \text{ g.mol}^{-1}$ .



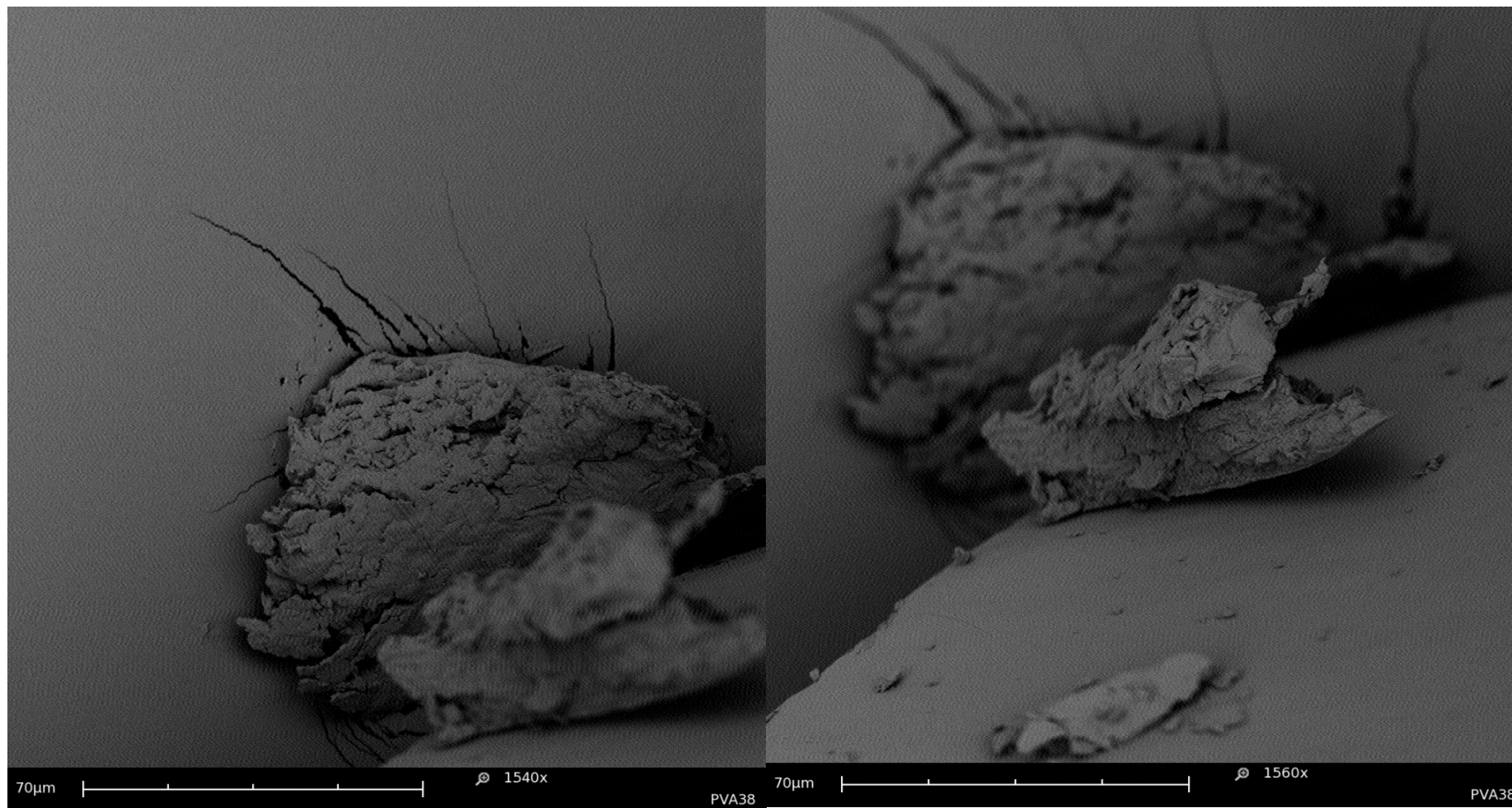


Figura 9 - Fotomicrografias das blendas 90/10 obtidas utilizando PLA de  $4200 \text{ g.mol}^{-1}$ .

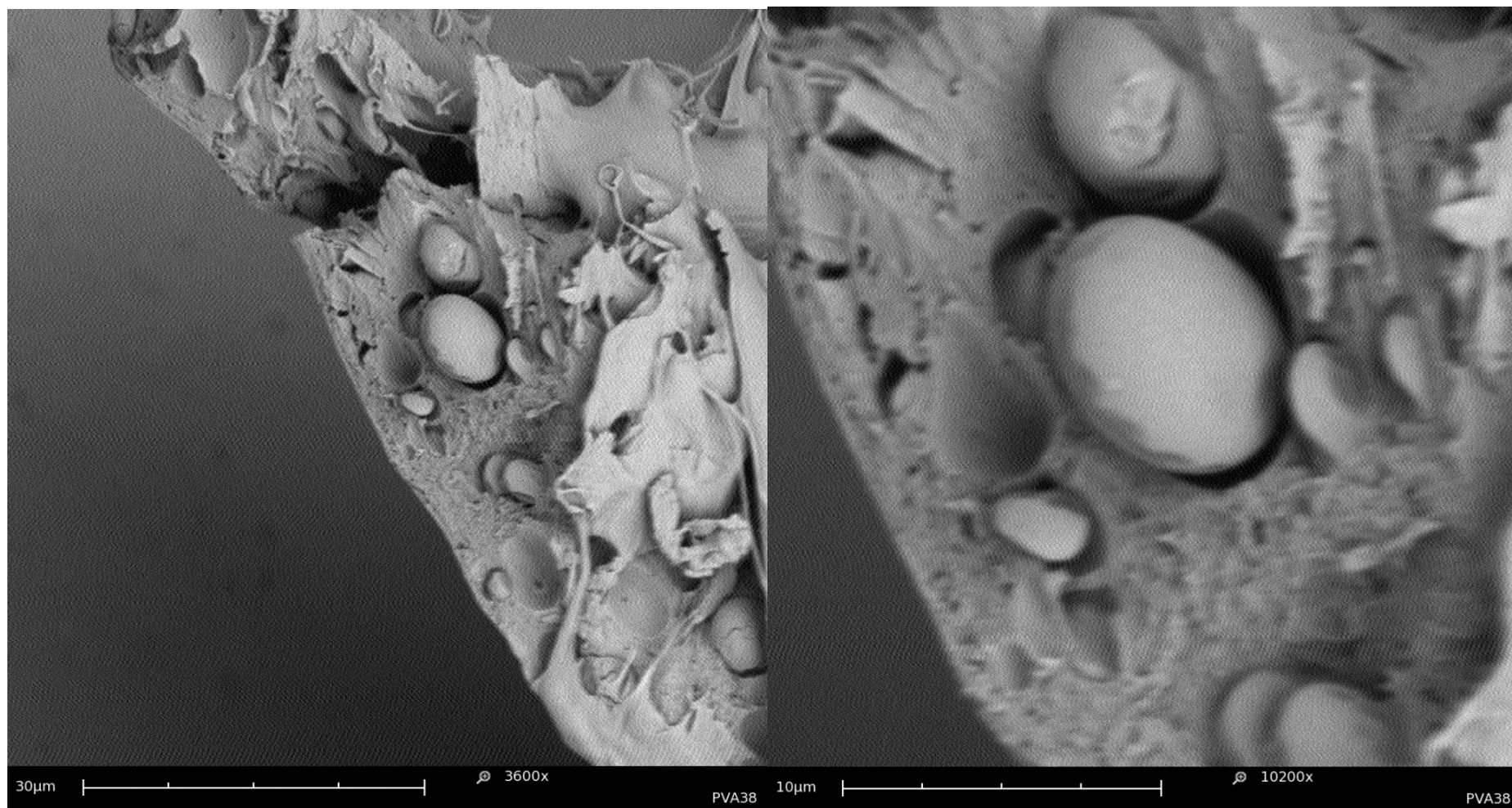


Figura 10 - Fotomicrografias das blendas 90/10 obtidas utilizando PLA de  $17000 \text{ g.mol}^{-1}$ .

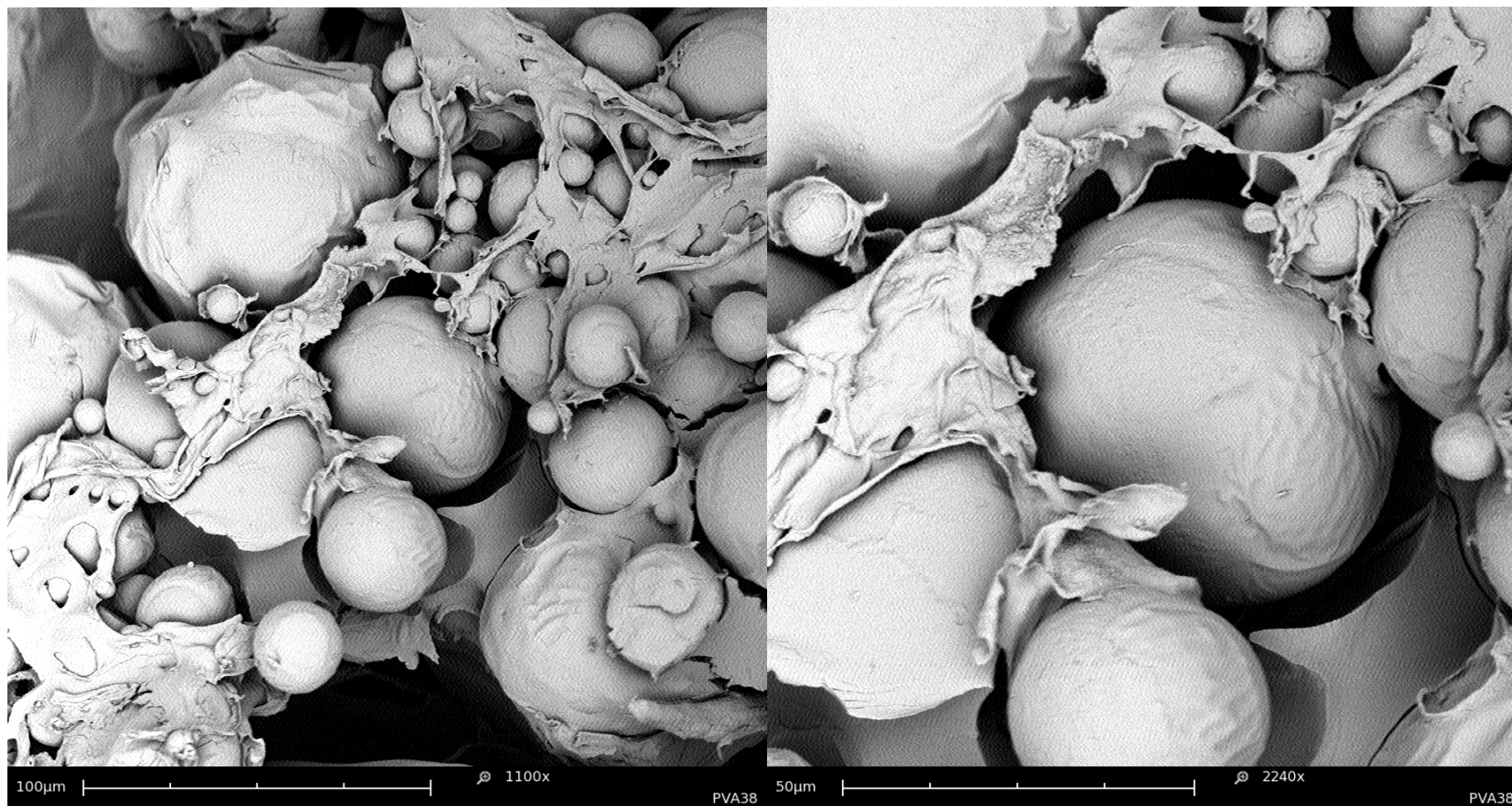


Figura 11 - Fotomicrografias das blendas 90/10 obtidas utilizando PLA de  $42000 \text{ g.mol}^{-1}$ .

Nas duas primeiras, as porções de PLA dispersas na matriz são sempre partículas amorfas e não apresentam nenhum tipo de regularidade quanto à sua distribuição, já as últimas duas que se referem aos PLA's de maior massa molar, observa-se somente a fase dispersa em formato esférico, de tamanhos variados.

Os comportamentos discutidos até aqui foram observados em todas as composições estudadas e devido à proposta deste trabalho a pesquisa relacionada às blendas foi descontinuada.

#### **4.3 Síntese dos copolímeros graftizados com diversos graus de inserção.**

Para a síntese da quitosana-g-oligo(ácido DL-lático) (Figura 12), denominado CG, o mecanismo provável envolve a formação de um intermediário na forma de sal de lactato de quitosana, que se forma através da protonação do grupamento amina durante a solubilização e, em seguida, a ligação covalente entre quitosana e o ácido láctico é estabelecida pela evaporação do solvente (H<sub>2</sub>O) e consequente desidratação do sal resultante (tal fenômeno é observado na síntese de amidas simples e de poliamidas, a partir de ácido + amina [97-100]). As etapas de formação da ligação amida na obtenção do copolímero são mostradas na Figura 13. Acredita-se que a formação das cadeias laterais de oligo(ácido DL-lático) ocorram simultaneamente através da policondensação do ácido DL-lático presente em excesso no meio reacional, o mecanismo está representado na (Figura 14) [100]. Os parâmetros de reação estão resumidos na Tabela 2.

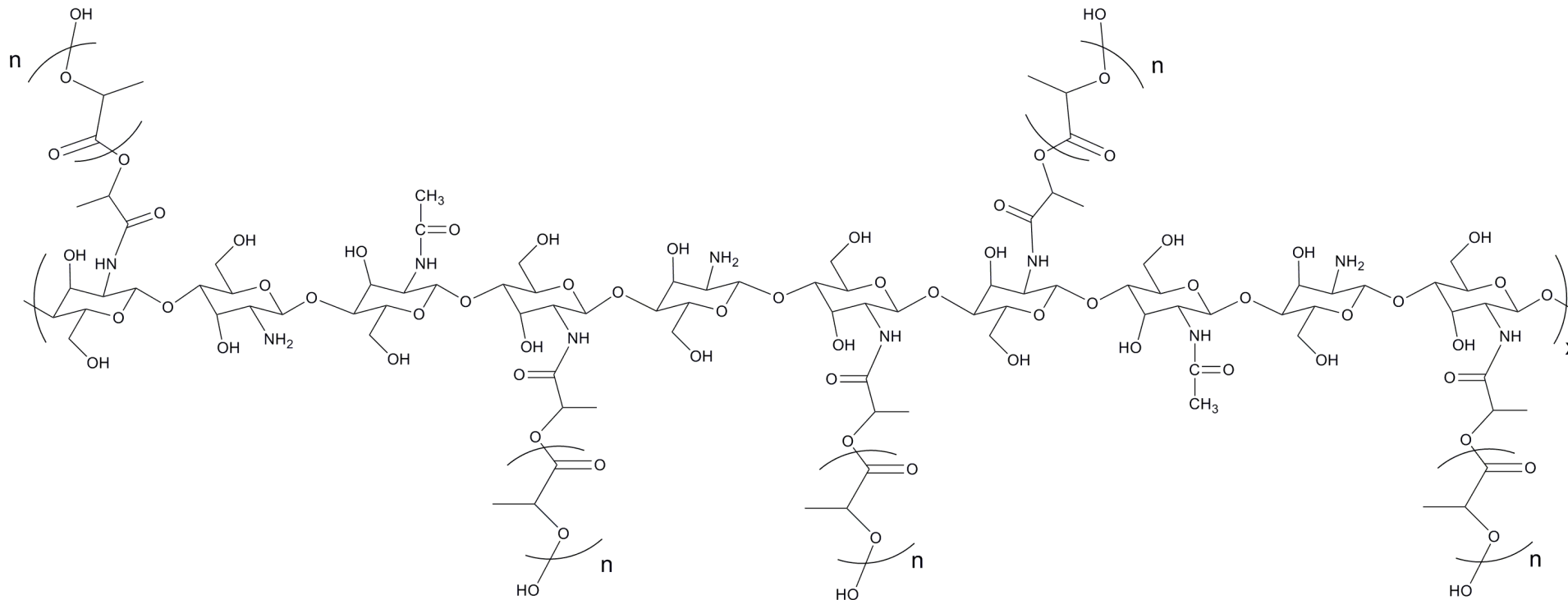


Figura 12 - Estrutura proposta para a quitosana-g-oligo(ácido DL-lático).

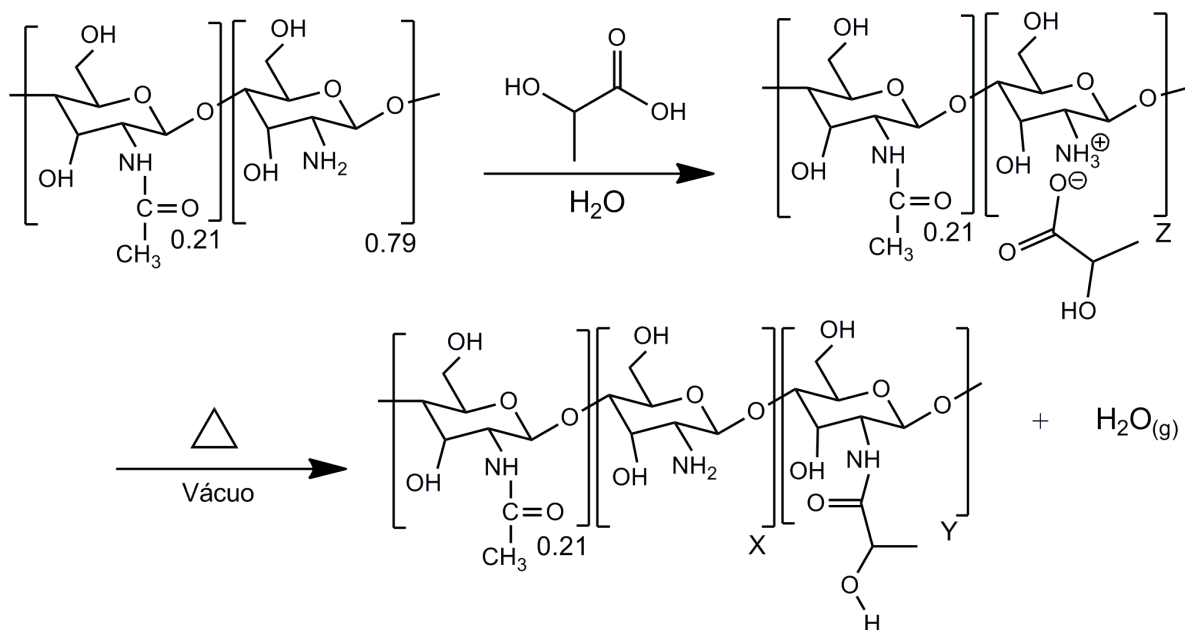
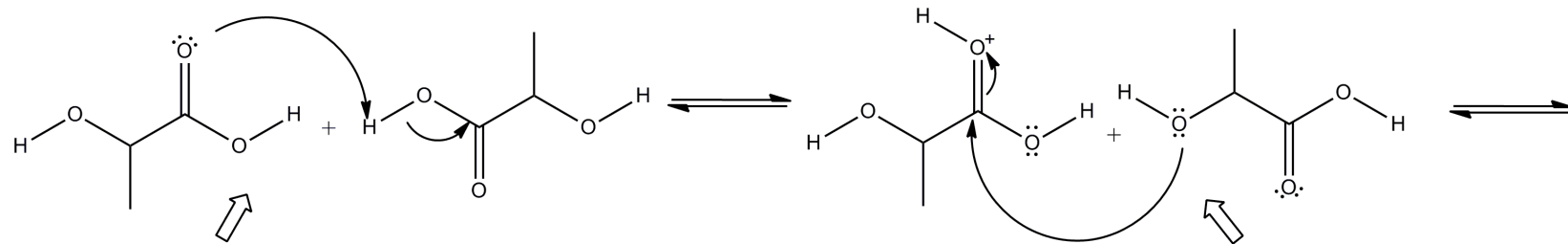


Figura 13 - Esquema de formação da ligação amida proposto para reação de obtenção da quitosana grafitada.

Tabela 2 - Quantidades utilizadas nas reações de obtenção de copolímeros grafitados contendo quitosana e poli(ácido DL-lático).

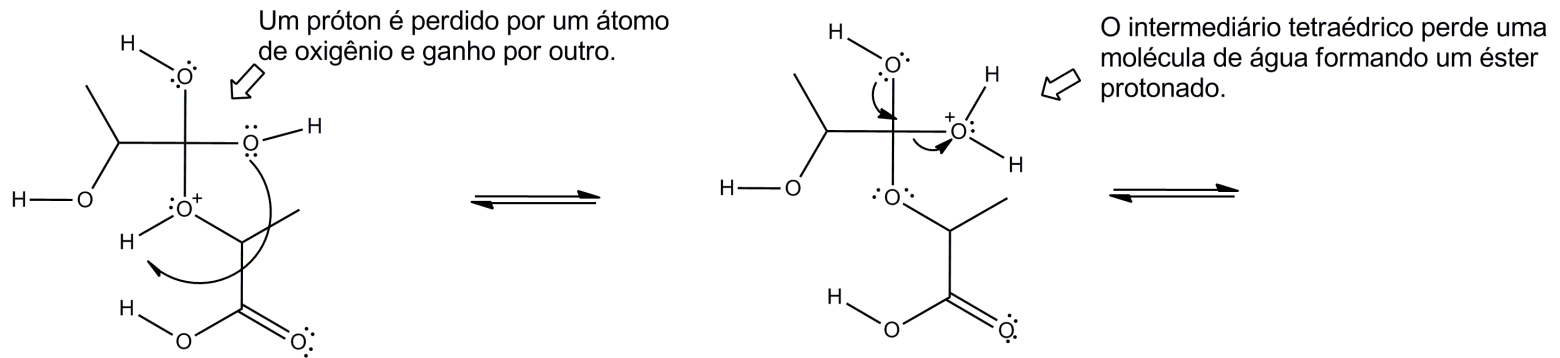
Código da amostra	Quantidade quitosana massa (g)/n (mmol)	Quantidade ácido DL-lático massa (g)/n (mmol)	AL:R-NH <sub>2</sub> <sup>(a)</sup> mol/mol
CG01	1/6,21	0,5/5,55	0,89
CG02	1/6,21	1/11,1	1,79
CG03	1/6,21	2/22,2	3,57
CG04	1/6,21	3/33,3	5,36
CG05	1/6,21	4/44,4	7,15
CG06	1/6,21	5/55,5	8,94

(a) AL:R-NH<sub>2</sub> proporção molar entre ácido DL- lático e grupos funcionais amina, no meio reacional.



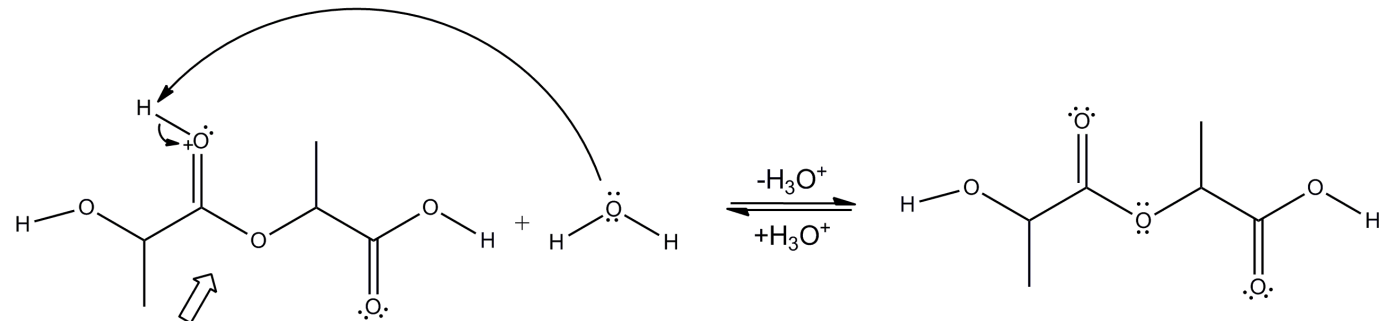
A carboxila de uma molécula aceita o próton de outra.

O álcool de outra molécula ataca a carboxila protonada para formar um intermediário tetraédrico.



Um próton é perdido por um átomo de oxigênio e ganho por outro.

O intermediário tetraédrico perde uma molécula de água formando um éster protonado.



A transferência do próton para uma base mais forte completa a reação.

Figura 14 - Mecanismo de policondensação proposto para reação de polimerização do ácido DL-lático.

Embora a polimerização do OLA sobre as cadeias de quitosana pudesse ser realizada com rendimentos mais elevados usando catalisadores durante a policondensação do ácido DL-lático [51,101], cadeias laterais de PLA com elevado grau de polimerização (GP) levariam a obtenção de filmes quebradiços e que provavelmente não apresentariam maleabilidade e flexibilidade (características intrínseca do PLA com elevada massa molar [102]), além disso, a hidrofobicidade do PLA é diretamente proporcional ao GP [103], o que contribuiria na diminuição da afinidade entre o PLA e a quitosana e possivelmente geraria um comportamento semelhante ao observado nas blendas.

Decorrido o tempo de reação, os filmes obtidos apresentaram transparência e uma leve coloração marrom, provavelmente pela presença da quitosana uma vez que o PLA é incolor. Mesmo com a etapa final de preparo ocorrer sob vácuo por 6 h notou-se a ausência de bolhas. Os filmes de quitosana-g-oligo(ácido DL-lático) (Figura 15) mantiveram sua integridade quando retirado da placa de petri, demonstrando robustez, maleabilidade, flexibilidade e adesividade quando manuseados. Todas essas características relatadas se mantiveram antes e depois do tratamento de purificação, exceto a adesividade, que tornou-se sensivelmente mais branda, provavelmente pela ausência dos oligômeros de PLA que não reagiram e estavam presentes na amostra antes da purificação.



Figura 15 - Imagens do filme de quitosana-g-poli(ácido DL-lático) em contato com a pele.



#### 4.3.1 Infravermelho com transformada de Fourier

A Figura 16 mostra os espectros de FTIR para a quitosana, o PLA e as amostras CG01 e CG06. Os demais espectros foram omitidos para facilitar a visualização, uma vez que todos apresentam perfis similares. Esta técnica foi utilizada buscando informações que pudessem confirmar a obtenção da estrutura desejada e neste raciocínio, chama-se a atenção para duas bandas em 1655 e 1574  $\text{cm}^{-1}$ , atribuídas ao grupamento *N*-acilamida residual da quitina (devido ao estiramento da carbonila de amida) e grupos amino (devido à flexão da ligação N-H) da quitosana, respectivamente [104-107]. Comparado com a quitosana, os CG's possuem uma banda em torno de 1730  $\text{cm}^{-1}$  que é atribuída ao estiramento da carbonila de éster proveniente da formação da cadeia lateral de OLA. A intensidade da banda registrada em 1655  $\text{cm}^{-1}$ , originalmente correspondente à banda de *N*-acilamida da quitina aumenta devido ao acréscimo gradativo de carbonilas de amida proveniente da reação entre quitosana e o ácido DL-lático [108], indicando que a estrutura desejada foi obtida.

Observa-se ainda que a banda em 3400  $\text{cm}^{-1}$  (estiramento da ligação O-H [106,107]) não sofreu alteração e isto era esperado pois se trata de uma região de absorção da função hidroxila indicando que a reação de substituição não afetou as hidroxilas da quitosana.

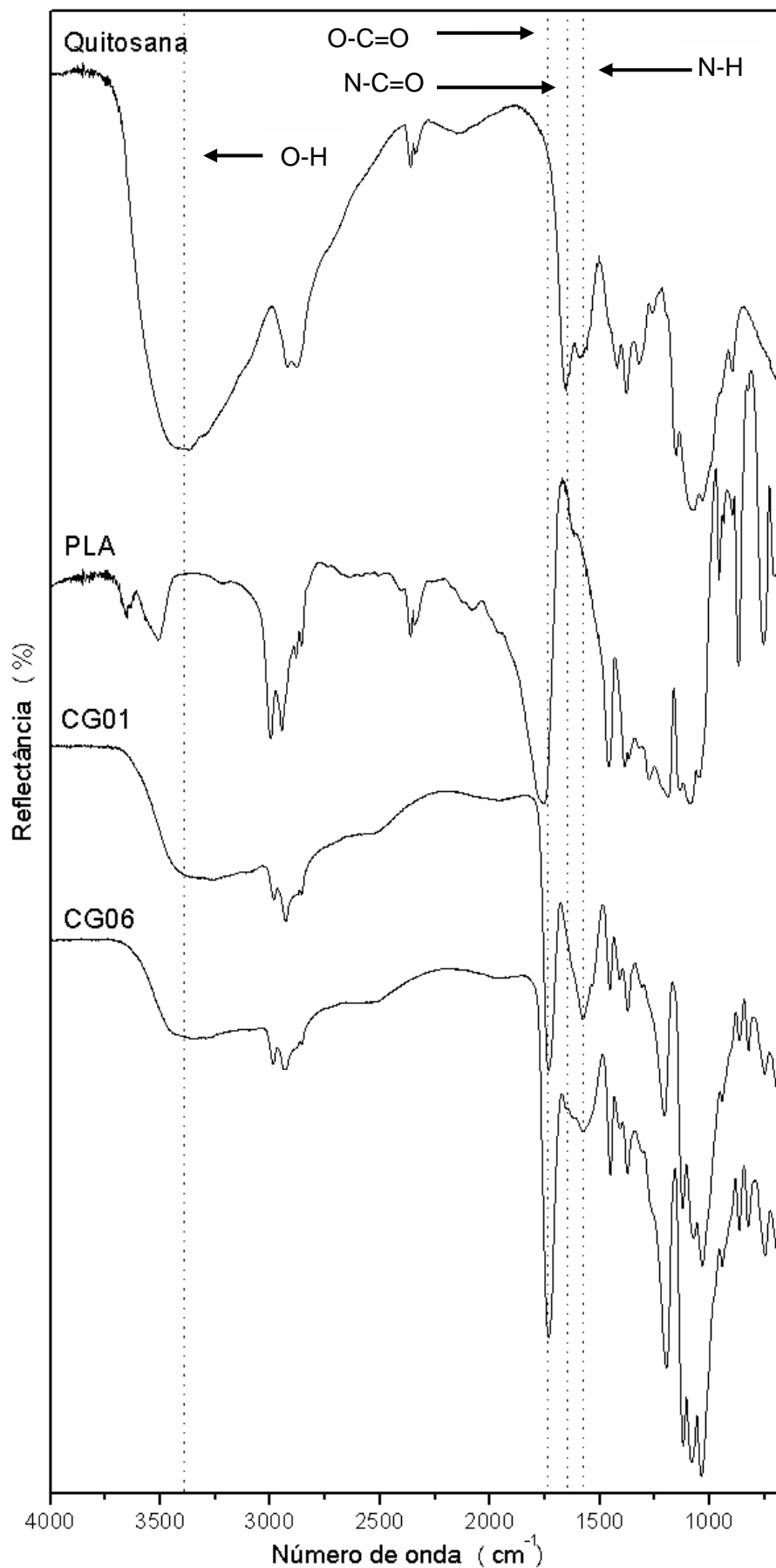


Figura 16 - Espectro de FTIR dos precursores e das amostras CG01 e CG06.

#### 4.3.2 Ressonância magnética nuclear no estado sólido

Com o objetivo de confirmar os dados obtidos por infravermelho, as amostras foram analisadas através da ressonância magnética nuclear no estado sólido. A estrutura química genérica dos copolímeros graftizados com os átomos de carbono numerados está representada na Figura 17 a). Sabendo que existem algumas unidades acetiladas bem como a presença de amins livres, o termo R foi usado para representar os dois grupamentos.

As Figuras 17 b) e 17 c) mostram o espectro de  $^{13}\text{C}$  CPMAS de amostras puras da quitosana e do OLA. A atribuição dos sinais baseado em dados da literatura está de acordo com a numeração descrita na Figura 17 a). O espectro para o OLA mostrou três sinais esperados para sua estrutura. No espectro da quitosana, vários sinais na região que vai de 40 a 120 ppm são atribuídos aos átomos de carbono constituintes do anel glucosídico da quitosana. Os sinais em aproximadamente 20 ppm e 170 ppm no espectro da quitosana pura são tipicamente atribuídos à presença de metila e do grupamento carbonila, o que indica, naturalmente, a presença de uma pequena fração de grupamentos acetilados oriundos de sua fonte primária, a quitina [109].

As Figuras 17 d) e 17 e) mostram, respectivamente, os espectros de  $^{13}\text{C}$  CPMAS e SPEMAS para amostra CG01. Como pode ser observado, ambos espectros são basicamente a composição dos espectros mostrados nas Figuras 17 a) e 17 b). No entanto, existem alguns detalhes específicos que revelam algumas características sobre a constituição química dos copolímeros graftizados. Os sinais atribuídos aos átomos de carbono 3 (C3) e 5 (C5) são separados em ambos espectros de CPMAS e SPEMAS da amostra CG01, enquanto no espectro da amostra de quitosana pura os dois sinais colapsam em um único sinal. Como discutido na literatura [110], a substituição do grupamento amina da quitosana para a obtenção do grupamento amida causa um deslocamento do sinal do carbono C3, portanto a separação do sinal observado pode ser visto como uma evidência da ligação do OLA na função  $\text{NH}_2$  da quitosana. Outra modificação no espectro é o alargamento anisotrópico dos sinais associados aos átomos de carbono C1, C4 e C6 na amostra CG01 quando comparado à quitosana pura. O alargamento anisotrópico de sinais de  $^{13}\text{C}$  RMN em polímeros sólidos são geralmente atribuídos a mudanças na distribuição da conformação das cadeias.

Por conseguinte, o alargamento observado pode ser tomado como prova da mudança da conformação local entre cadeias poliméricas de quitosana devido a introdução do OLA [111].

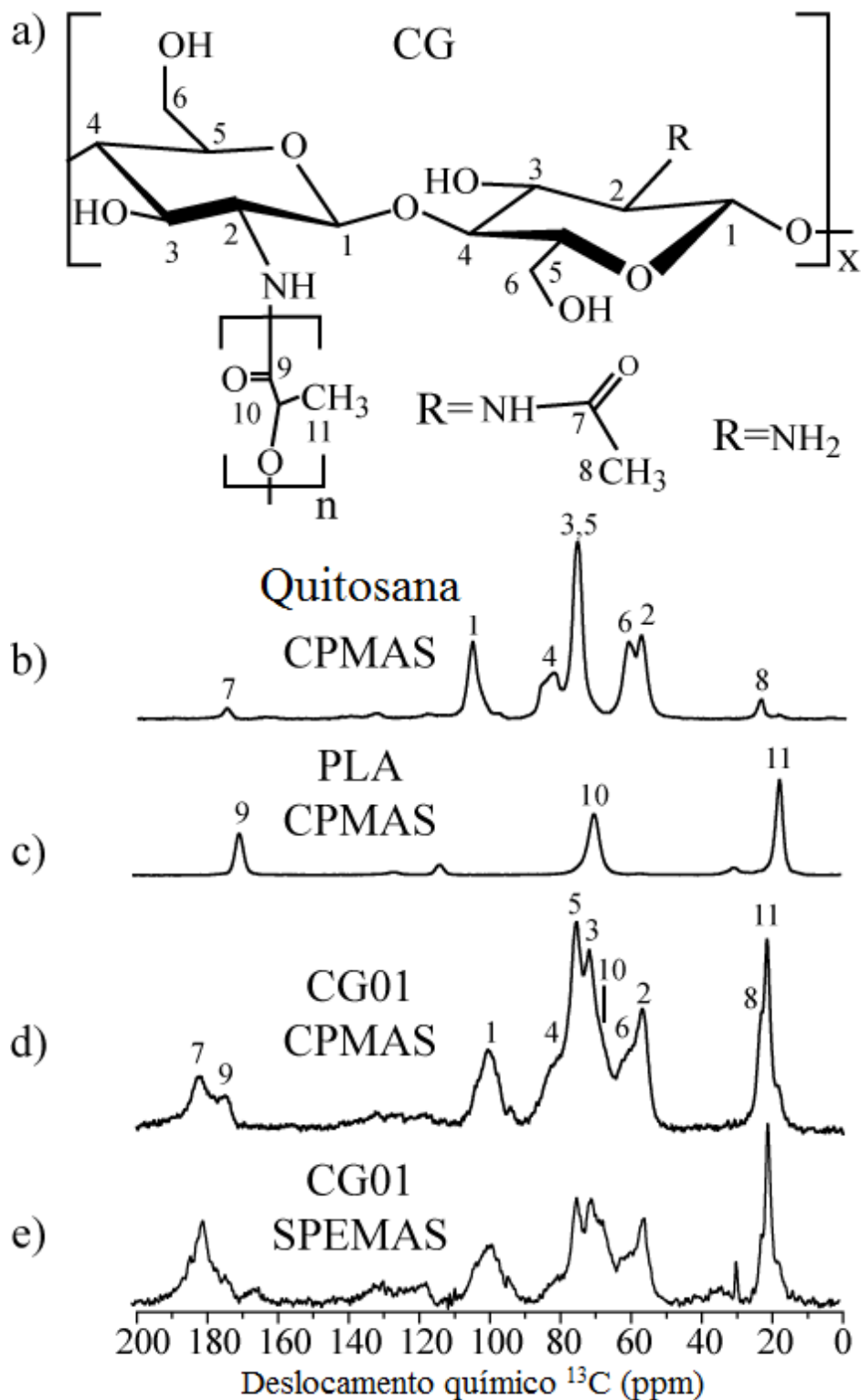


Figura 17 - a) Estrutura química genérica dos copolímeros grafitizados. b) Espectro de  $^{13}\text{C}$  CPMAS para a quitosana pura. c) Espectro de  $^{13}\text{C}$  CPMAS para o OLA puro. d) Espectro de  $^{13}\text{C}$  CPMAS para a composição CG01. e) Espectro de  $^{13}\text{C}$  SPEMAS para a composição CG01.

A Figura 18 mostra os espectros de  $^{13}\text{C}$  CPMAS e SPEMAS para todos os copolímeros graftizados. O estreitamento progressivo dos sinais de OLA é evidente, o que sugere um aumento das taxas médias de movimento das cadeias de OLA como uma função da concentração deste polímero [112]. Além disso, a perda na resolução de todos os sinais da quitosana também é observada nos espectros das amostras CG04, CG05 e CG06.

Com o aumento da desordem na conformação das cadeias de quitosana devido à presença do OLA, espera-se a presença de movimentos segmentais em sua cadeia polimérica. Além disso, os movimentos segmentais afetam a eficiência de polarização cruzada provocando uma diminuição na intensidade do sinal global, o que explica os sinais mais baixos observados nos espectros de CPMAS em comparação com os espectros de SPEMAS [112].

Portanto, os resultados apresentados na Figura 18 sugerem fortemente que há um aumento da dinâmica molecular tanto para a quitosana quanto o OLA, mostrando que o aumento na quantidade de OLA na amostra produz um amolecimento global do material. De fato, as mudanças mais acentuadas são observadas entre os espectros das amostras CG04, CG05 e GC06 enquanto que nenhum estreitamento substancial é observado entre os espectros de CG01, CG02 e CG03. Isto sugere que nas composições CG01, CG02, GC03, as cadeias poliméricas de quitosana desempenham um papel importante na restrição da dinâmica molecular do OLA, mas para amostras CG04, CG05 e CG06 o comportamento dinâmico global é ditado pelas cadeias de OLA. Esta mudança de comportamento também pode ser detectada pela alteração na forma dos sinais de OLA. Para as composições CG04, CG05, GC06 os sinais de OLA têm claramente uma forma de linha lorentziana, que surge tipicamente de segmentos altamente dinâmicos, mas para as composições CG01, CG02 e CG03 os sinais de OLA têm uma forma mais anisotrópica, que são típicos de segmentos com mobilidade reduzida [113].

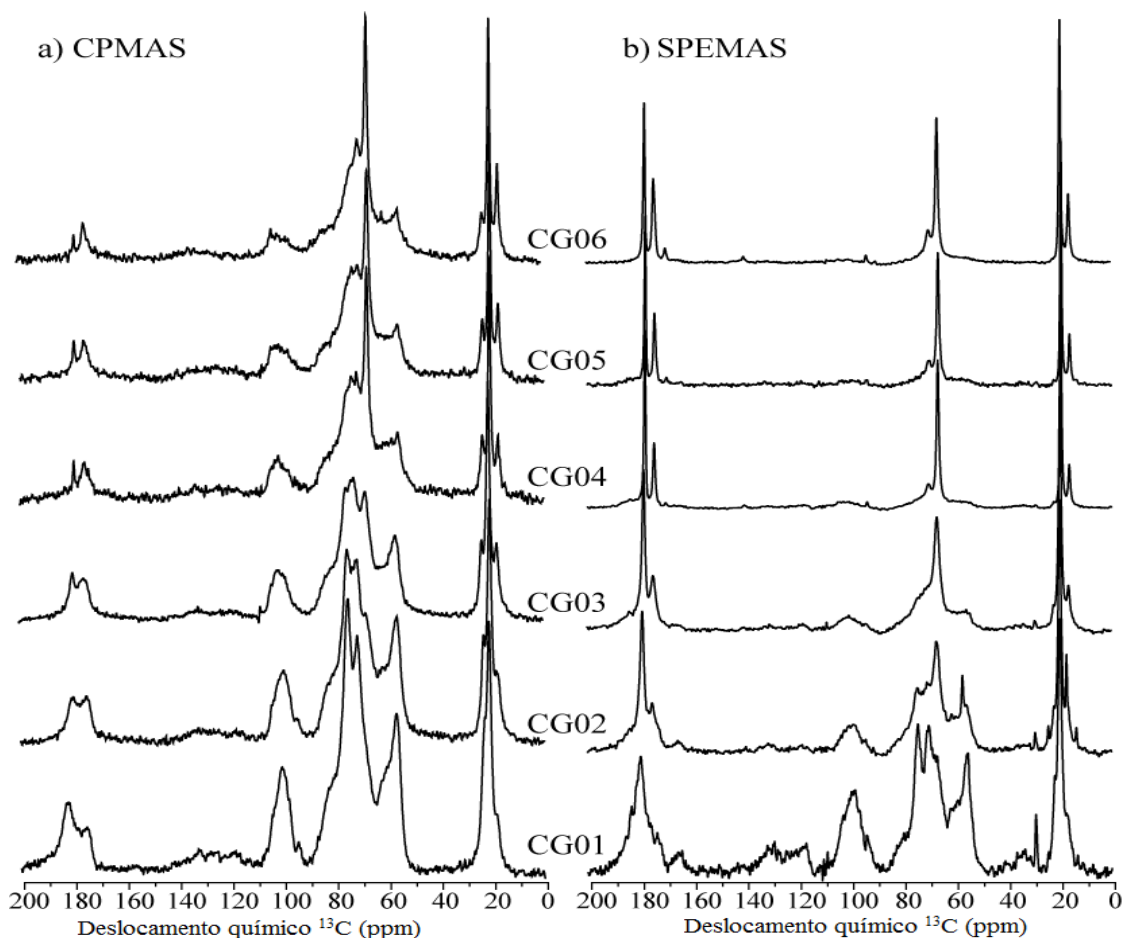


Figura 18 - a) Espectros de  $^{13}\text{C}$  CPMAS e b) Espectros de  $^{13}\text{C}$  SPEMAS das composições grafitizadas. Em ambos os casos as quantidades de OLA aumentam de baixo para cima.

Os espectros na Figura 18 foram normalizados pelo sinal da metila do OLA (C11). Comparando a intensidade dos sinais de OLA com sinais da quitosana se torna evidente o aumento das quantidades de OLA de CG01 para CG06. Assim, a razão entre a intensidade dos sinais da quitosana e OLA pode fornecer uma quantificação do número de unidades de OLA por unidade monomérica de quitosana. Para isso, utilizou-se a região espectral entre 50 a 85 ppm. Como pode ser observado na Figura 18, cinco sinais nesta região correspondem aos átomos de carbono da unidade glucosídica da quitosana (C2, C3, C4, C5 e C6) e um sinal atribuído ao átomo de carbono C10 do OLA. Usando um procedimento matemático de ajuste (alguns exemplos gráficos são mostrados na figura 19), a intensidade do sinal do carbono C10 do OLA ( $I_{\text{OLA}}$ ) foi determinada e subtraída da área total sob a região espectral entre 50 e 85 ppm para se obter a intensidade integrada dos sinais de quitosana, ( $I_{\text{CHI}}$ ). A partir destas intensidades, o número

médio de meros de ácido láctico por unidade monomérica de quitosana para cada amostra foi determinado e se encontra listado na Tabela 3.

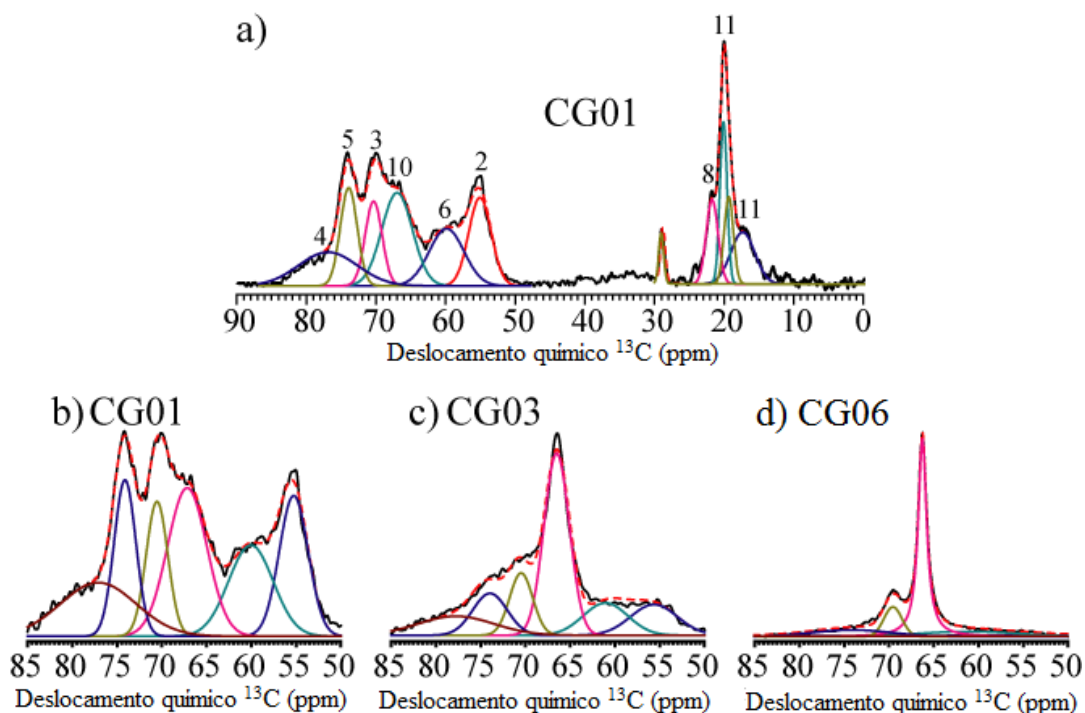


Figura 19 - Exemplos de deconvolução espectral dos espectros de  $^{13}\text{C}$  SPEMAS das amostras CG01, CG03 e CG06.

Tabela 3 - GP dos copolímeros graftizados obtido via RMN do estado sólido<sup>a)</sup>.

Amostras	$I_{\text{PLA}}$	$I_{\text{CHI}}$	GP (meros)
CG01	160	510	3.2
CG02	210	550	3.8
CG03	220	340	6.5
CG04	170	190	8.9
CG05	140	150	9.3
CG06	160	160	10.0

a) O erro associado a medida é de no máximo 10%.

Os resultados obtidos a partir de espectros de FTIR e RMN sugerem de forma satisfatória que cadeias laterais de OLA foram enxertadas com sucesso sobre as cadeias de quitosana. Para apoiar o resultado de grau de polimerização obtido por ressonância magnética nuclear, foi realizada a determinação do grau

de acetilação e do grau de substituição das aminas livres da quitosana via reação química com salicilaldeído discutido na seção a seguir.

#### 4.3.3 Determinação do grau de acetilação e do grau de substituição das aminas livres da quitosana via reação química com salicilaldeído

A lei de Beer, como expressa pela Equação 1, pode ser empregada de diversas formas. Podemos calcular as absorptividades molares ( $\epsilon$ ) das espécies se a concentração ( $c$ ) for conhecida e podemos utilizar o valor medido de absorvância ( $A$ ) para obter a concentração se a absorptividade e o caminho óptico ( $b$ ) forem conhecidos [114].

$$A = \epsilon bc$$

Equação 1

Para a medida quantitativa das aminas substituídas foi necessário conhecer a concentração de aminas livres presente nas amostras e para isso foi utilizado o composto salicilaldeído, o qual reage especificamente com a amina presente no anel glucosídico da quitosana formando o *N*-salicidenoquitosana como mostrado na Figura 20.

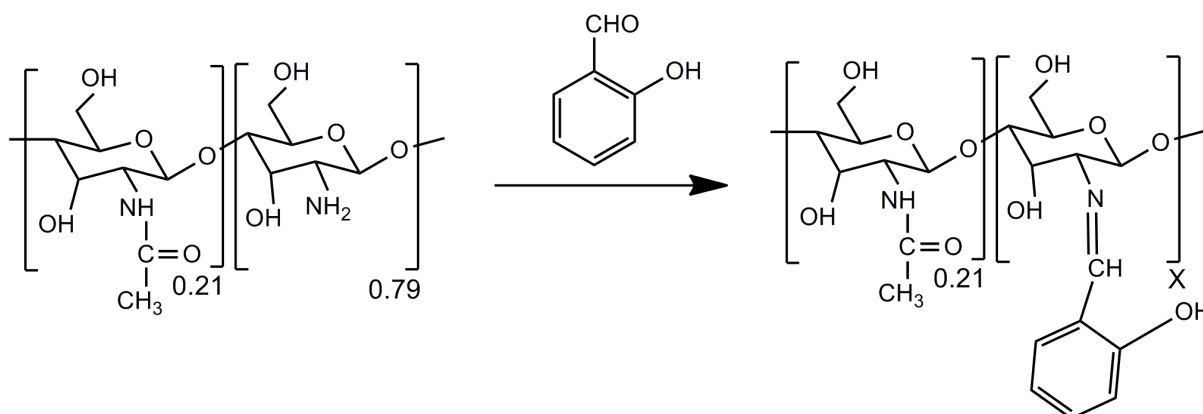


Figura 20 - Esquema reacional de formação do *N*-salicidenoquitosana.

A presença de grupos amina na cadeia polimérica leva a possibilidade de inúmeras modificações químicas, incluindo a preparação de bases de Schiff pela reação com aldeídos e cetonas. A reação com aldeídos aromáticos em ácido



acético para produzir a correspondente base de Schiff foi descrita há mais de 15 anos [115].

Bases de Schiff são compostos contendo um grupamento imina (-RC=NR') onde R' ≠ H, são usualmente formadas pela condensação de uma amina primária com uma carbonila ativa [73]. Esta reação é muito interessante principalmente por que emerge como uma ferramenta analítica simples e de baixo custo para a determinação de várias substâncias orgânicas e inorgânicas [116,117].

A estratégia analítica realizada consiste em utilizar uma quantidade precisa em massa de todas as amostras e submeter à reação com uma solução de salicilaldeído de concentração conhecida. Após o tempo de reação determinado, a solução é filtrada e a absorbância da concentração de salicilaldeído que não reagiu é medida. Todas as medidas espectroscópicas foram realizadas no mesmo dia, de forma que pode-se considerar a absorvidade molar constante, bem como o caminho óptico uma vez que as cubetas utilizadas tinham dimensões padrões e iguais entre si. Assim, a Equação 1 pode ser reduzida à Equação 2.

$$A \approx c \quad \text{Equação 2}$$

Conhecendo a absorbância e a concentração inicial da solução de salicilaldeído, pode-se obter a concentração final da solução medindo a absorbância da solução após a reação e realizando o tratamento matemático através da Equação 3.

$$c_2 = \frac{A_2 c_1}{A_1} \quad \text{Equação 3}$$

Os resultados obtidos através da reação química com salicilaldeído estão dispostos na Tabela 4.

Tabela 4 - Massas utilizadas na análise e resultados obtidos após o tempo determinado de reação para a quitosana e para os copolímeros graftizados.

Código da amostra	Massa da amostra (mg)	Concentração de salicilaldeído consumido em 90 ml (mmol)	Aminas livres (%)	Grau de acetilação / substituição (%)
Quitosana	102,6	0,51	79,7	20,3
CG01	100,5	0,41	66,1	13,6
CG02	101,6	0,27	42,8	36,9
CG03	103,1	0,18	28,5	51,2
CG04	104,1	0,08	12,0	67,7
CG05	104,1	0,01	2,2	77,5
CG06	101,1	0,00	0,0	79,7

Também foi possível estimar o grau de polimerização (GP) (Tabela 5) dos copolímeros sintetizados, conhecendo a massa de ácido láctico que restou, ou seja, que reagiu após a extração via soxhlet, associado aos dados obtidos pela quantificação via reação com salicilaldeído.

Tabela 5 - Massas dos copolímeros graftizados antes e depois da extração soxhlet.

Código da amostra	Massa inicial da amostra (g)	Massa final da amostra (g)	Massa de ácido láctico que reagiu (g)
CG01	1,5	1,29	0,29
CG02	2,0	1,82	0,82
CG03	3,0	2,72	1,72
CG04	4,0	3,81	2,81
CG05	5,0	4,83	3,83
CG06	6,0	5,79	4,79

Primeiramente calcula-se o número de moles de aminas livres que foram substituídas para 1 g de quitosana juntamente com a conversão da massa de ácido láctico reagida para mol. Utilizando a Equação 4 obtém-se o valor estatístico de mols de ácido láctico polimerizados por amina substituída. Os valores estão dispostos na Tabela 6.

$$GP = \frac{\text{moles de ácido láctico que reagiu em 1 g de quitosana}}{\text{moles de amina que foi substituída em 1 g de quitosana}}$$

Equação 4

Tabela 6 - GP dos copolímeros graftizados obtido via reação química com salicilaldeído e GP obtido via RMN do estado sólido e massa molar teórica.

Código da amostra	GP (meros) <sup>a)</sup>	Massa molar (g) <sup>c)</sup>	GP (meros) <sup>b)</sup>	Massa molar (g) <sup>c)</sup>
CG01	3,8	342,3	3,2	288,3
CG02	4,0	360,3	3,8	342,3
CG03	6,2	558,5	6,5	585,5
CG04	7,4	666,6	8,9	801,7
CG05	8,9	801,7	9,3	837,7
CG06	10,6	954,8	10,0	900,8

a) salicilaldeído b) RMN do estado sólido c) massa calculada com base na massa molar do monomero do ácido DL-lático.

Em uma análise comparativa, as duas técnicas estão sujeitas a erros de natureza bem distintas. A técnica de RMN é mais confiável, pois embora apresente uma margem de até 10 % de erro, é uma técnica altamente desenvolvida e padronizada. A técnica de reação com salicilaldeído está sujeita a erros humanos e de aferição das vidrarias, além do erro instrumental. Mesmo assim, quando se observa os resultados é fácil notar a proximidade dos valores dos dados, reforçando a sugestão de que a graftização ocorreu e que os ramos laterais apresentaram massas oligoméricas [73].

#### 4.3.4 Análise termogravimétrica (TGA)

A técnica termogravimétrica foi utilizada para avaliar a variação na perda de massa em função da temperatura sob uma programação controlada cujas temperaturas de partida e término da análise foram, respectivamente, de 0 e 600 °C.

As curvas termogravimétricas dos copolímeros grafitizados são mostradas na Figura 21. Pode-se observar que há um comportamento semelhante no que diz respeito a perda de massa em todas as composições. É digno de nota o fato que a quantidade de oligo(ácido DL-lático) presente em cada amostra influencia no perfil termogravimétrico das curvas; as amostras de maior teor de graftização e de polimerização apresentaram perda de massa mais acentuada na mesma faixa de temperatura. Para reforçar essa proposta, a Tabela 7 apresenta os valores da energia das ligações covalentes [118] presentes na estrutura da quitosana-g-oligo(ácido DL-lático).

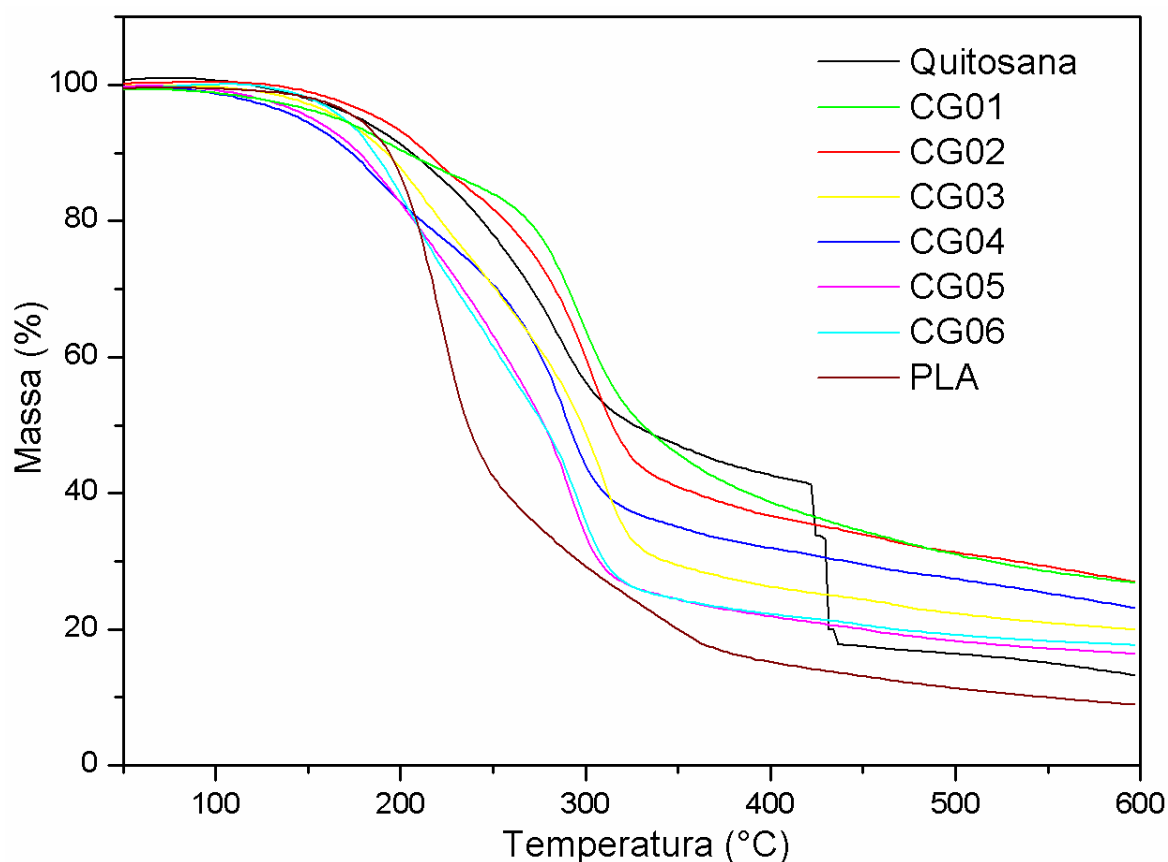


Figura 21 - Curvas termogravimétricas para as amostras grafitizadas.

Tabela 7- Valores de energia de ligações covalente.

Ligação	Energia de ligação (Kcal/mol)
C=O	171
O-H	111
C-H	99
N-H	93
C-O	84
<b>C-C</b>	<b>83</b>
C-N	70

Na Tabela 7, ordenou-se o tipo de ligação covalente com relação à sua energia de ligação. A ligação simples C-C marcada em negrito é a ligação covalente mais comum, presente nas amostras. Menores valores de energia indicam ligações mais instáveis e vice-versa. Quando a ligação mais instável está posicionada em grupos laterais, sua quebra pode gerar a perda de parte do grupo lateral, ocasionando a degradação do polímero. Isto parece ocorrer na degradação do copolímeros graftizado, uma vez que a ligação C-N é a menos estável.

Para avaliar a temperatura em que a degradação do material se torna mais proeminente, a mais simples característica deste processo de

degradação, tornou-se interessante a derivatização da curva de TG (DTG), sendo que o mínimo do vale da curva DTG é a temperatura correspondente para a taxa de maior degradação e a área delimita a variação de massa sofrida pela amostra. As curvas DTG correspondentes aos eventos térmicos se encontram na Figura 22.

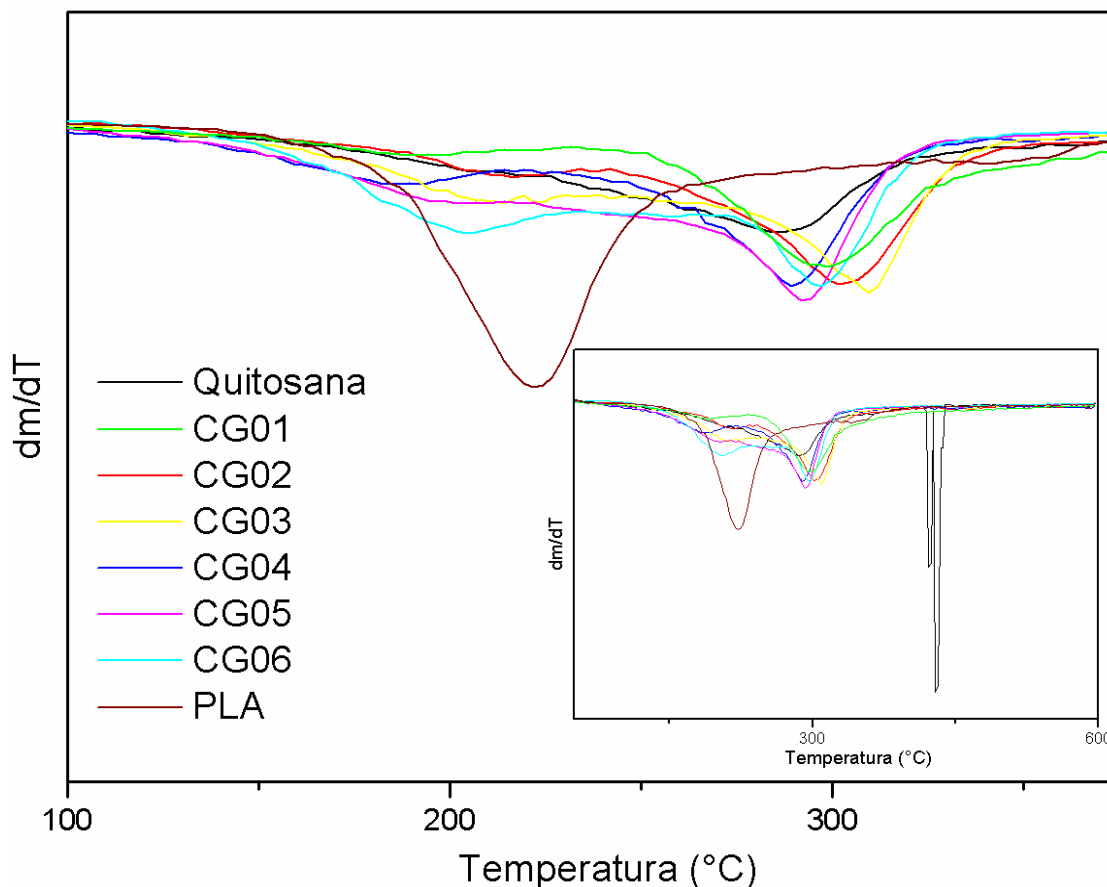


Figura 22 - Região em evidência da primeira derivada das curvas termogravimétricas para as composições graftizadas. Inserido no gráfico, o resultado completo da derivada mostrando o pico de degradação pertencente à quitosana.

A curva DTG não contém mais informações do que a curva TG integral mas apresenta os dados de forma mais clara, e assim, foi permitida uma pronta determinação da temperatura em que a taxa de variação de massa é máxima, e, todas as composições variaram entre 284 e 310  $^{\circ}C$ , esta variação sugere que as cadeias laterais de OLA influenciaram na temperatura de degradação do material. Considerando-se que a área do pico sob a curva DTG é diretamente proporcional a variação de massa, pode-se ressaltar que todas as composições apresentaram comportamentos semelhantes no que diz respeito à perda de massa, o que já era esperado de acordo com as diferenças na concentração do OLA, ou seja quanto maior a quantidade de OLA, menor a estabilidade do material.

#### 4.3.5 Análise dinâmico-mecânica

A técnica de análise dinâmico-mecânica tem sido amplamente usada como uma técnica de caracterização de polímeros através da detecção dos processos de relaxação, por apresentar sensibilidade muito superior (por volta de três ordens de grandeza) quando comparada às técnicas convencionais de análise térmica [119].

Uma das utilizações mais comuns da técnica de DMA é a determinação da temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ), que apresenta a grande vantagem de ser um método direto de medição, permitindo ainda determinar transições secundárias que estão relacionadas à relaxação de grupos ou parte de grupos laterais da cadeia polimérica e, também, a temperatura de fusão cristalina de polímeros semicristalinos ( $T_m$ ). Essas temperaturas de transição podem ser definidas através de máximos nas curvas de  $\tan\delta$  em função da temperatura [119].

Existem diversos trabalhos na literatura que relatam a temperatura de relaxamento correspondente à temperatura de transição vítrea da quitosana e, apesar do grande número de trabalhos publicados envolvendo o uso da quitosana, muitas vezes as informações são discrepantes ou incompletas [120-123]. Utilizando a técnica de DMA não foi possível observar a  $T_g$  do material no intervalo estudado como já era esperado para um polímero de elevada massa molar e reconhecida alta densidade de ligações de hidrogênio (Figura 23).

Já é conhecido que a temperatura de transição vítrea do PLA é alterada por massas molares distintas abaixo de  $22000 \text{ g mol}^{-1}$  [124,125]. Dessa maneira, o estudo de algumas amostras de OLA, se tornou interessante visto que o valor médio de massa molar das cadeias laterais dos copolímeros graftizados, está próximo às amostras de OLA puro. Os valores encontrados ficaram de acordo com o esperado e foram de  $-3$ ,  $17$  e  $27 \text{ }^\circ\text{C}$ , respectivamente, para as amostras OLA15, OLA18 e OLA21 como mostrado na Figura 23.

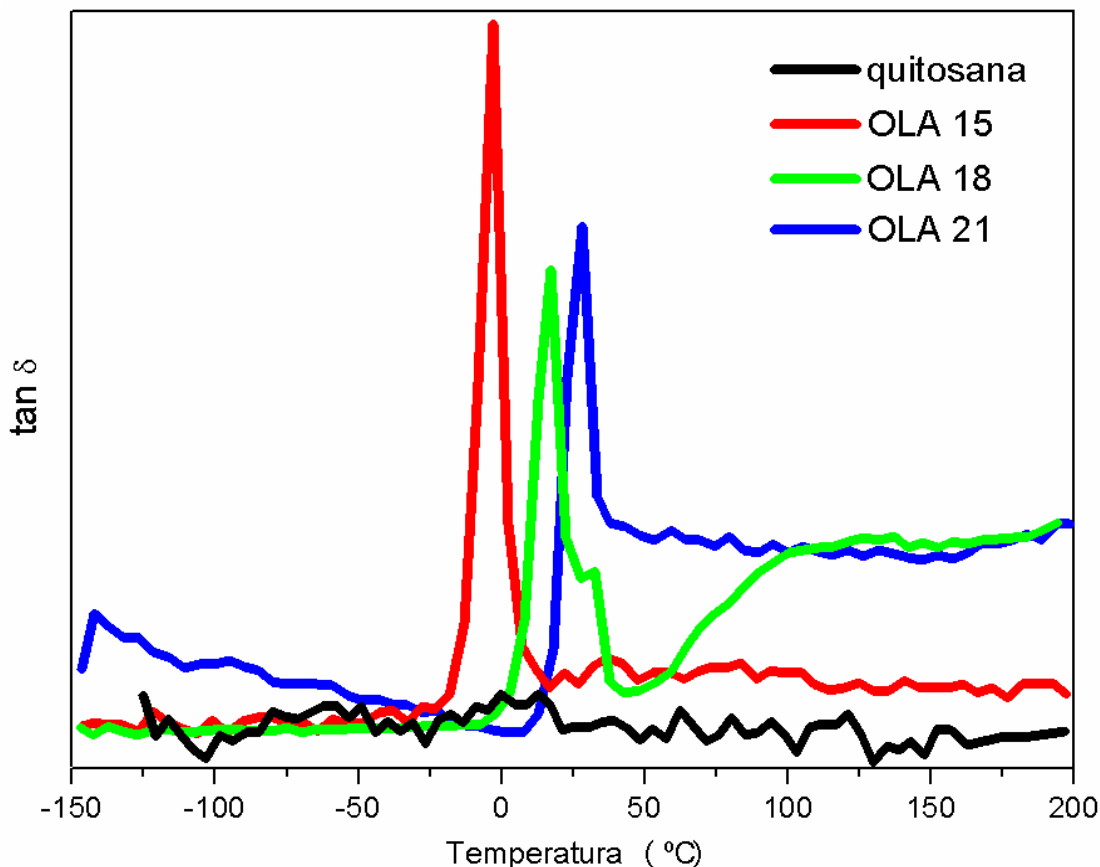


Figura 23 - Curvas  $\tan \delta$  em função da temperatura para amostras de OLA.

A Figura 24 mostra as curvas  $\tan \delta$  em função da temperatura para as amostras de quitosana-g-oligo(ácido DL-lático) nas diferentes proporções estudadas e as temperaturas obtidas pelo máximos das curvas estão descritas na Tabela 8.

A temperatura de transição vítrea (definida e identificada através do máximo em  $\tan \delta$ ) é função de características internas da fase em transição e/ou características induzidas pela fase externa envolvente, nesta mesma fase de transição [119]. Se as características implicam em um impedimento de movimentação molecular, a temperatura de transição se desloca para valores maiores. Se por outro lado isto tende a facilitar a movimentação molecular, reflete-se em uma redução na temperatura de transição. Assim, a presença de uma fase envolvente mais rígida, por exemplo, uma alta densidade de ligações de hidrogênio, pode deslocar a  $T_g$  para valores maiores. Por outro lado a inserção de grupos quimicamente ligados aumentam o volume livre e, conseqüentemente, a mobilidade das cadeias poliméricas reduzindo sua  $T_g$  [119].



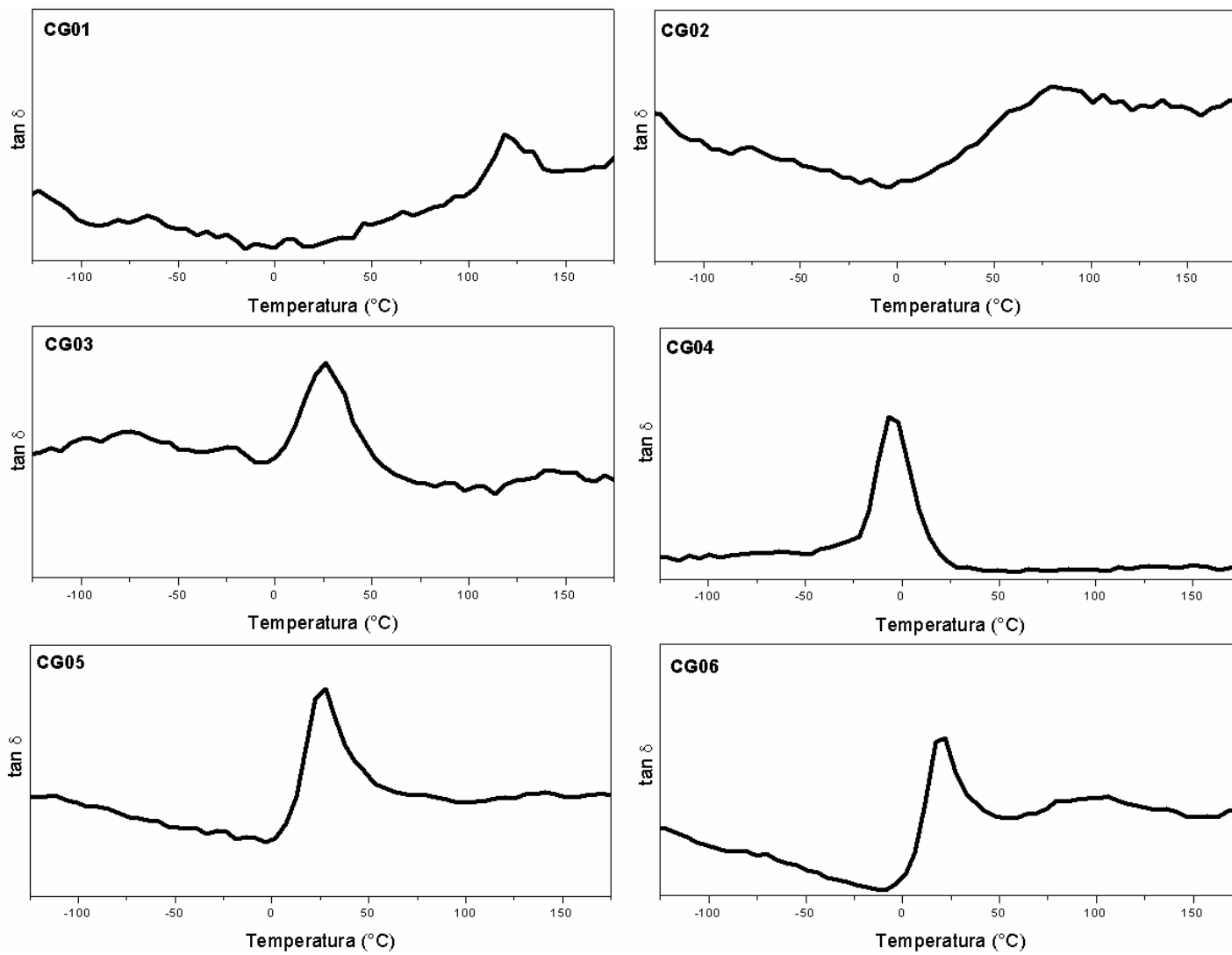


Figura 24 - Curvas  $\tan \delta$  em função da temperatura para as amostras de quitosana grafitizada em diferentes proporções.

Tabela 8 - Relação entre as razões molares utilizadas e as temperaturas de transição vítrea obtidas.

Código da amostra	AL:R-NH <sub>2</sub> <sup>a)</sup> mol/mol	Tg (°C)
CG01	0,89	118,7
CG02	1,79	79,8
CG03	3,57	25,4
CG04	5,36	-6,3
CG05	7,15	27,0
CG06	8,94	21,1

a) AL:R-NH<sub>2</sub> proporção molar entre ácido DL- lático e grupos funcionais amina, no meio reacional.

Como diagnosticado na Figura 24, as composições estudadas mostraram variações acentuadas na diminuição da temperatura de transição vítrea para as composições que vão da CG01 a CG04. A este fenômeno atribuiu-se o efeito de plastificação interna que ocorre devido às cadeias laterais de OLA quimicamente ligadas, sendo que as mesmas geram um espaçamento entre as cadeias de quitosana impedindo que ocorra novamente a formação de ligações de hidrogênio.

A partir da composição CG05 acontece o efeito inverso, a Tg dos materiais teve um aumento considerável quando comparado à CG04. Levando em conta as proporções dos precursores, pode-se sugerir que nestas amostras o OLA constitui a matriz dos sistemas com as cadeias poliméricas da quitosana agindo como reforço e conseqüentemente elevando a Tg nestes materiais.

#### 4.3.6 Ensaio mecânicos

As amostras na forma de filmes foram testadas por ensaio mecânico para verificação de suas propriedades mecânicas, obtendo depois da secagem uma espessura dos filmes de 250 µm. Os ensaios mecânicos foram realizados com corpos de prova com dimensões e forma especificadas em norma técnica [126]. Os testes foram realizados com 6 corpos de prova para cada filme e calculando

as médias de todas as amostras para maior representatividade dos dados. O ensaio para a obtenção da tensão pela deformação foi realizado para submeter o material a um esforço axial que tende a alongá-lo até a ruptura. Assim, foi possível conhecer como os filmes produzidos reagem ao esforço de tração, quais são os limites de tração que suportam e a partir de que momento se rompem, para entender e verificar a possibilidade de uma potencial e hipotética aplicação. Relata-se que o grau de desacetilação da quitosana, o perfil de secagem do solvente, o grau de graftização e procedimentos de mistura podem influenciar conjuntamente todas as propriedades mecânicas dos materiais produzidos nestas condições. Os resultados estão dispostos na Figura 25.

As amostras apresentaram comportamento mecânico que é dominado pelo fenômeno viscoelástico. Nos sistemas poliméricos, cada cadeia ocupa um volume médio maior que as dimensões atômicas e está continuamente mudando a forma de seus contornos na medida que vai movendo-se sinuosamente, sob influência dos movimentos brownianos e de reptação. Diferentes modos de movimentos são acessíveis à macromolécula: mudanças elásticas nos ângulos e distâncias das ligações; mudança na conformação de grupos laterais e pequenas partes da cadeia; mudança nos contornos da cadeia devido a rotações internas em torno das ligações e, finalmente, alteração da posição em relação às macromoléculas vizinhas [127].

Entende-se que rearranjos locais, envolvendo pequenas partes da molécula, ocorrem relativamente rápido e não contribuem significativamente para a deformabilidade do material sob tensão. Quanto maior for o segmento envolvido em um movimento molecular, mais vagaroso ele será e maior será sua contribuição à deformação. Este fato explica a larga escala de tempo característica dos movimentos de macromoléculas e a enorme variação da magnitude do módulo por ocorrência destes movimentos.

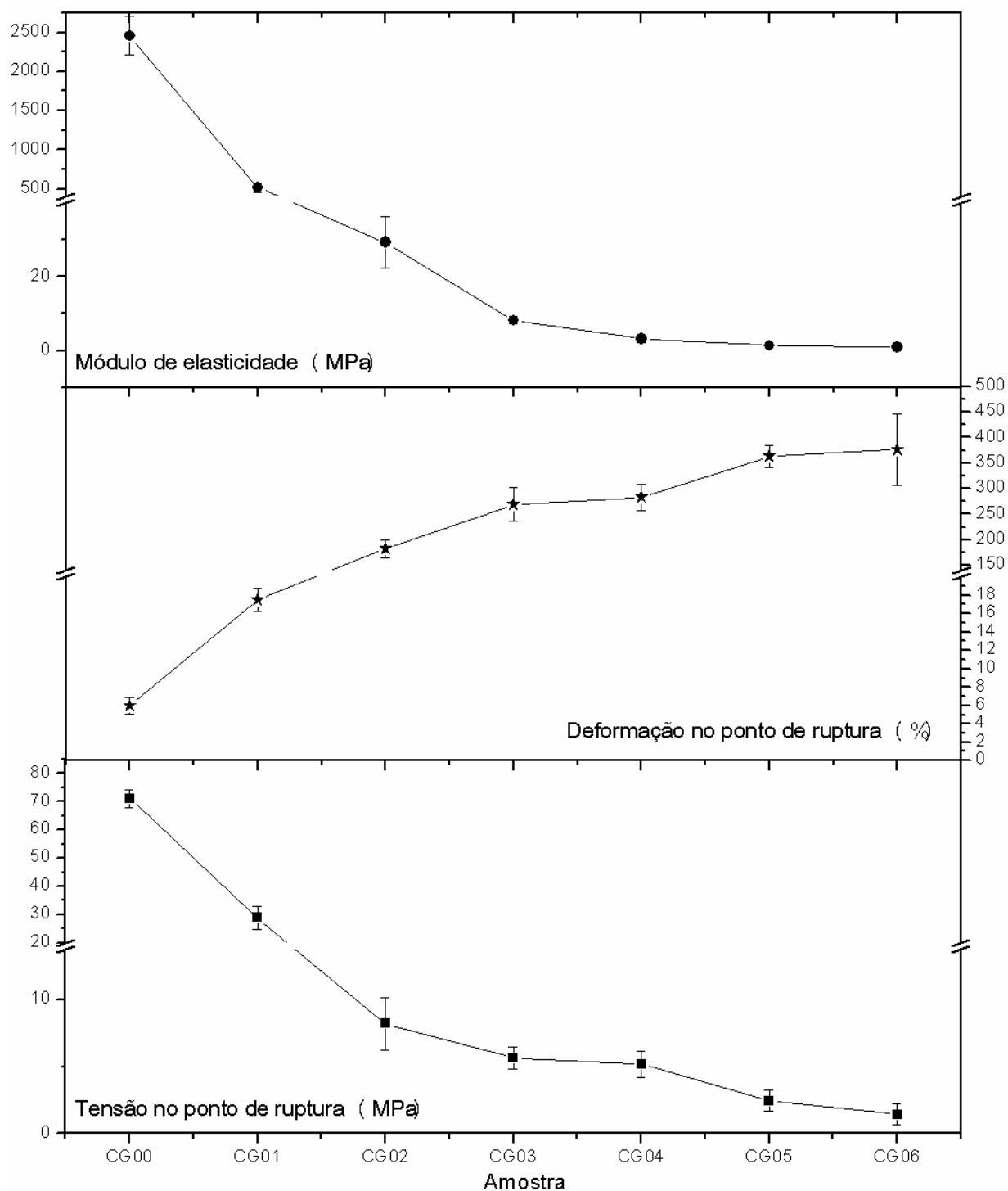


Figura 25 - Variação nas propriedades mecânicas estudadas dos copolímeros grafitizados em relação as composições obtidas.

Uma observação particularmente importante ainda a ser feita é a obtenção de um material homogêneo, ao contrário das misturas físicas preparadas com os mesmos polímeros. Estes formam fases grosseiramente separadas e mecanicamente muito pobres, independentemente da proporção de quitosana e

OLA, enquanto que a introdução de ligações covalentes entre os componentes produz materiais homogêneos e com propriedades físicas úteis, conforme os resultados descritos.

Ainda torna-se interessante a observação do gráfico disposto na Figura 26. Neste gráfico é feita a relação entre a transição vítrea, o grau de substituição e a razão de ácido DL-lático utilizado para as reações de graftização. De posse deste gráfico e com uma hipotética aplicação a ser realizada, a composição graftizada pode ser sintetizada de acordo com as necessidades do momento, sem que seja necessário obter várias composições, para então, escolher a mais apropriada.

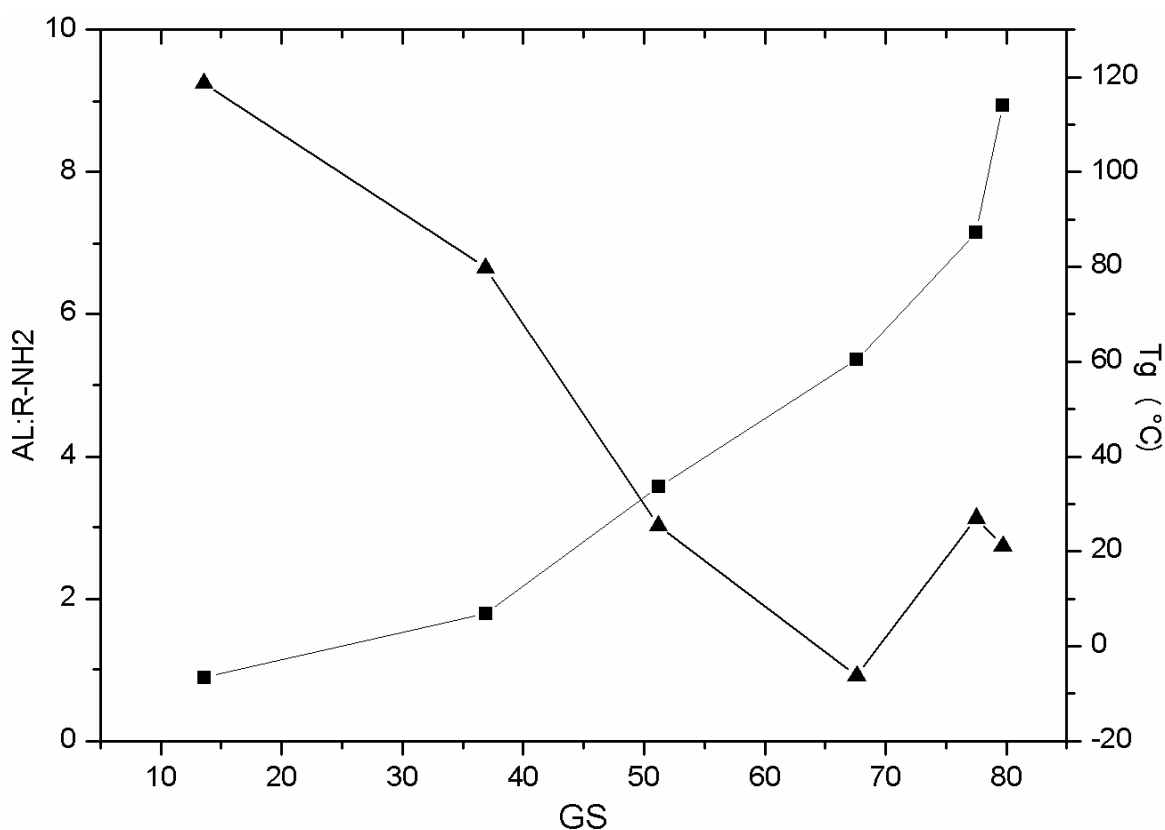


Figura 26 - Variação da temperatura de transição vítrea (Tg) (▲) com o grau de substituição (GS) % e a razão entre a proporção dos materiais de partida (mol/mol) (■) para todos os copolímeros sintetizados.

A Figura 27 ilustra o comportamento da elongação de amostra graftizada (CG 06), antes e durante a elongação.



Figura 27 - Comportamento da elongação de amostra graftizada (CG 06), antes e durante a elongação.

As propriedades mecânicas dos materiais refletem a composição e as características morfológicas até agora discutidas e demonstra que a quitosana graftizada é muito mais maleável e flexível do que o material de partida e, além disso, que o grau de plastificação pode ser concebido com base nos dados apresentados.

#### 4.4 Síntese da *N*-succinilquitosana

Para obtenção das redes poliméricas constituídas de quitosana e OLA, fez-se necessário a modificação química em um dos polímeros, uma vez que tanto a quitosana quanto o ácido láctico não apresentam as funcionalidades necessárias para a formação de uma rede polimérica. Diante da problemática, optou-se primeiramente pela inserção de um grupamento ácido carboxílico pela reação com anidrido ftálico na extremidade contendo a função hidroxila na cadeia do poli(ácido DL-láctico). No entanto, um fator desencorajou a continuidade desta rota: a razão molar de hidroxilas frente à massa molar do polímero como um todo, o que implicaria em utilizar um excesso do diácido para a substituição completa das hidroxilas, porém, ocorreria uma reação paralela de despolimerização da cadeia catalisada pelo diácido [128]. Portanto, tal estratégia não foi considerada uma boa opção para o objetivo do trabalho. Frente às dificuldades apontadas, a atenção foi voltada para a modificação da quitosana. Neste escopo, existem inúmeras pesquisas que contemplam a síntese de precursores à partir da quitosana para

reações posteriores [129,130,34,131]. Para o objetivo em mente, a síntese de redes poliméricas formadas por quitosana e OLA, foi escolhida a síntese da *N*-succinilquitosana, um material obtido à partir da reação entre a quitosana e o anidrido succínico. O mecanismo proposto para a reação de formação [100] está descrito na Figura 28.

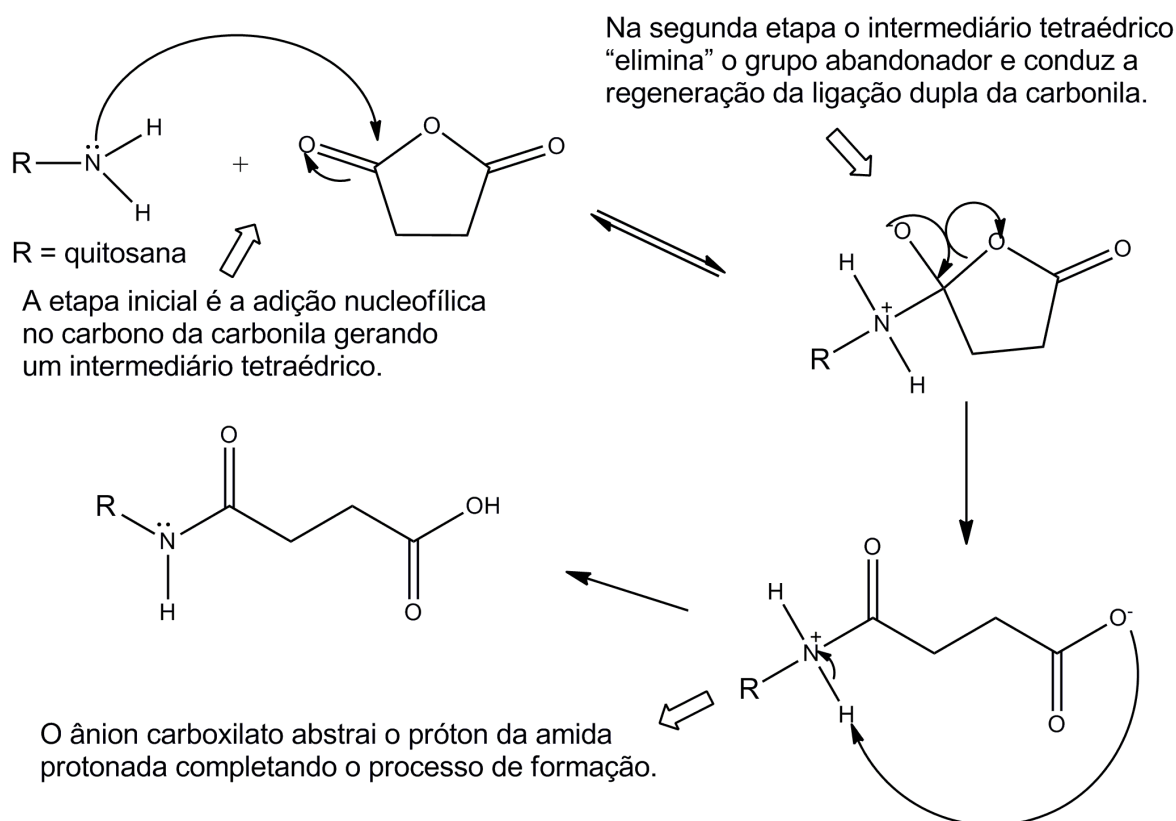


Figura 28 - Mecanismo proposto para a formação da *N*-succinilquitosana.

#### 4.4.1 Infravermelho com transformada de Fourier

No espectro da quitosana (Figura 29) são observadas bandas de absorção distintas em  $1655\text{ cm}^{-1}$ , devido ao estiramento da carbonila de amida,  $1574\text{ cm}^{-1}$ , devido a flexão da ligação H-N e uma banda larga em  $3400\text{ cm}^{-1}$  relacionada ao estiramento da ligação O-H. Comparado com a quitosana, o espectro da *N*-succinilquitosana (Figura 29) mostra o aumento evidente da banda de absorção em  $2930\text{ cm}^{-1}$  referente ao estiramento do metileno ( $-\text{CH}_2-$ ) relativo à presença do ácido succínico [132-134]. A banda em  $1655\text{ cm}^{-1}$  aumenta notoriamente indicando a substituição no grupamento amina como discutido anteriormente.

Além disso, pode-se observar a ausência de uma banda em torno de  $1730\text{ cm}^{-1}$  característica de carbonila de éster, bem como a presença permanente da banda em  $3400\text{ cm}^{-1}$  reforçando que a inserção ocorreu no grupamento amina do anel glucosídico da quitosana.

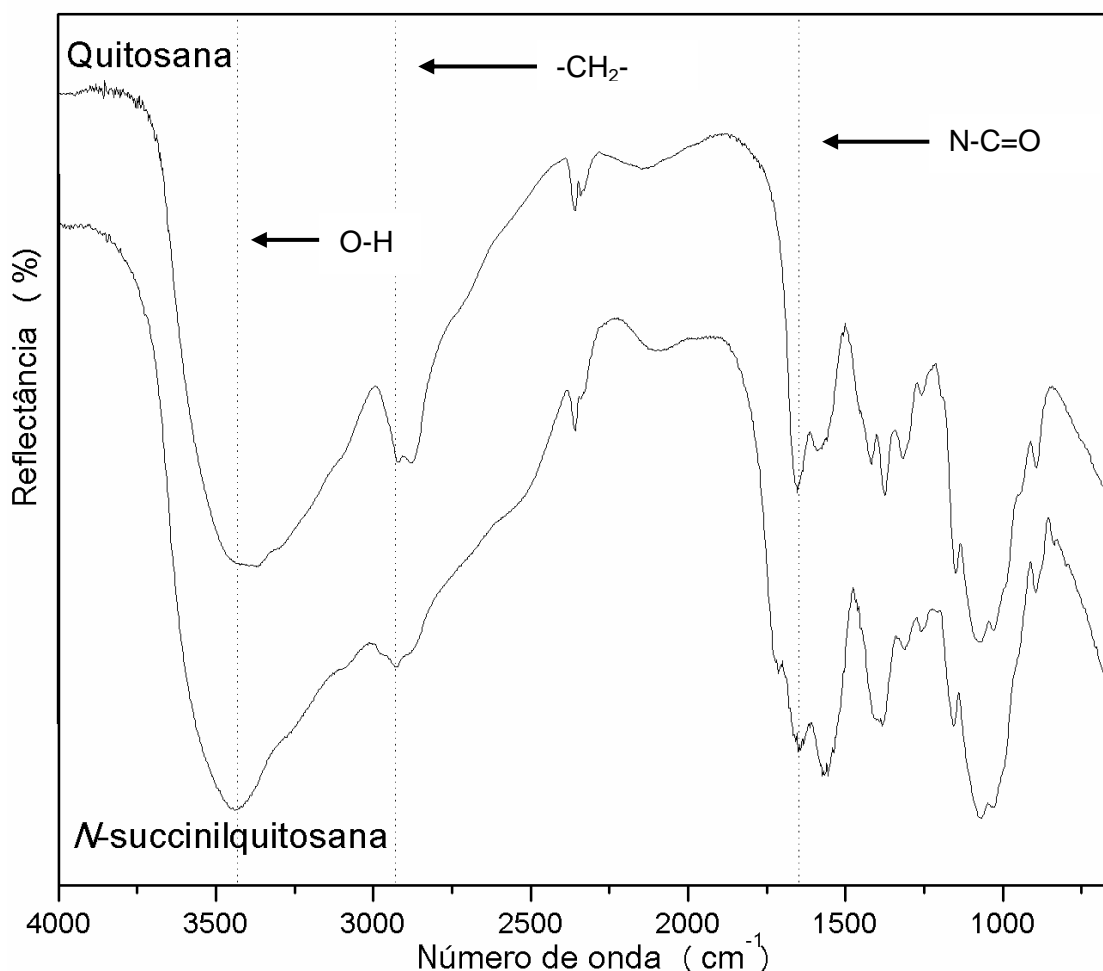


Figura 29 - Espectros de infravermelho da quitosana e quitosana substituída com anidrido succínico (*N*-succinilquitosana).

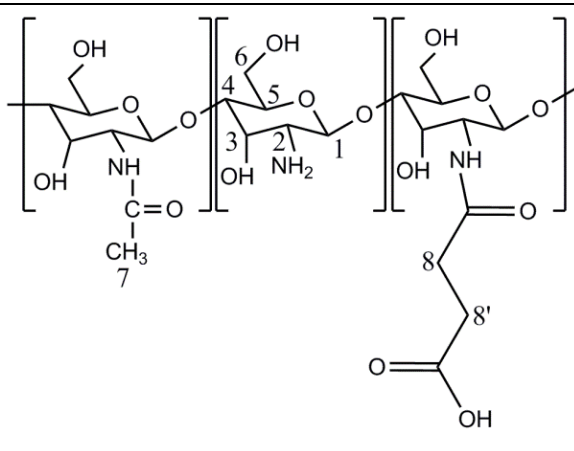
#### 4.4.2 Ressonância magnética nuclear de $^1\text{H}$

Ressonância magnética nuclear de  $^1\text{H}$  foi utilizada para confirmar a obtenção da *N*-succinilquitosana, o espectro de  $^1\text{H}$  RMN é mostrado na Figura 30 e a relação dos sinais com a estrutura do material foram baseados na literatura e estão dispostos na Tabela 9 [135,136].



Tabela 9 - Relação da numeração atribuída aos hidrogênios da *N*-succinilquitosana com os respectivos sinais obtidos por  $^1\text{H}$  RMN.

Nº	Sinal (ppm)
1	4,6
2	3,1
3,4,5,6	3,6 a 3,9
7	2,0
8 e 8'	2,5



De acordo com a razão da integração dos picos referentes aos átomos de hidrogênio 2 e 8 pode-se conhecer o grau de substituição para a reação [135]. Segundo a sensibilidade do equipamento (pela observação das integrais dos sinais 3,1 e 2,5 ppm), todos os grupamentos amina foram substituídos pelo anidrido succínico. Os resultados de  $^1\text{H}$  RMN confirmam os resultados obtidos por FTIR.

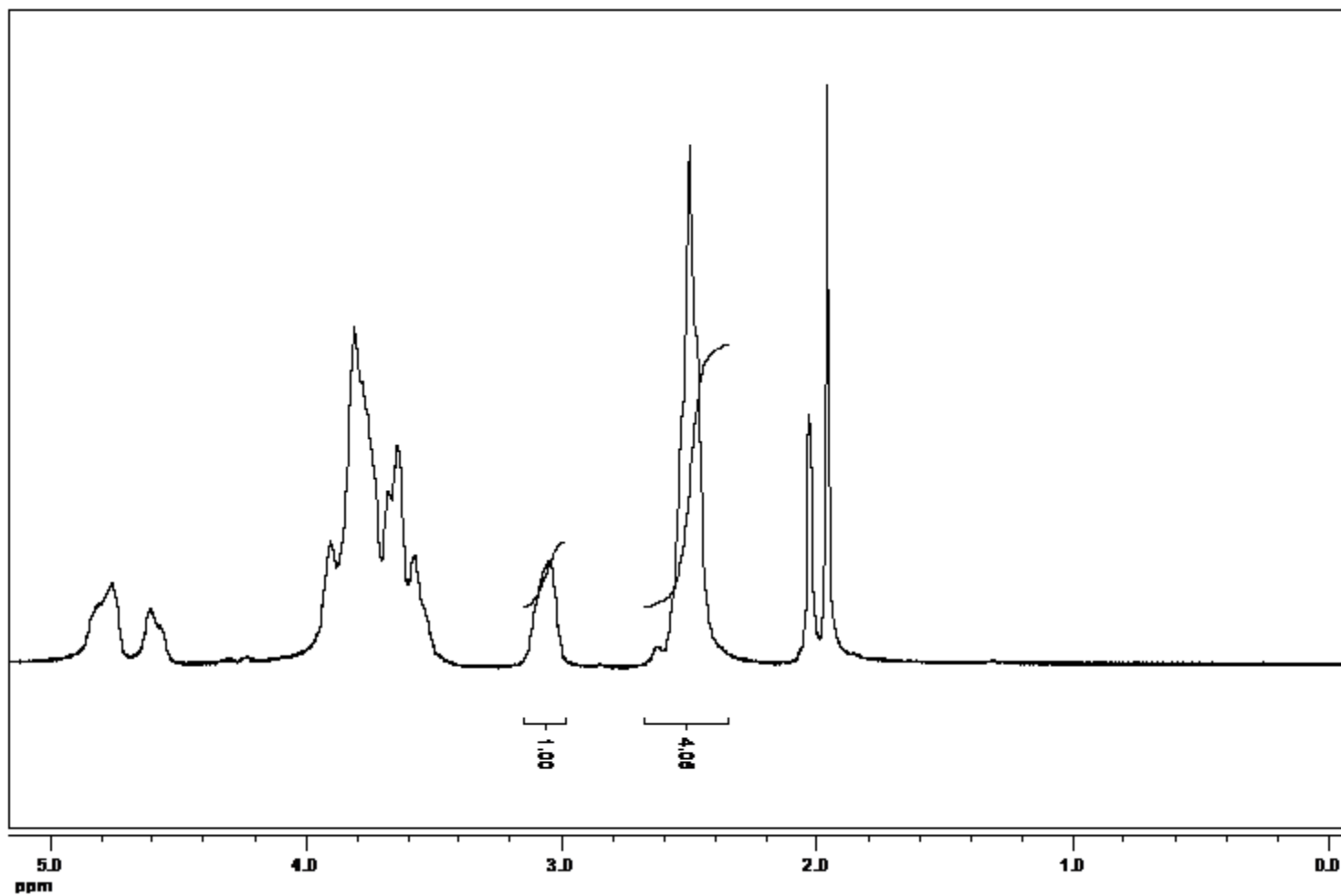


Figura 30 - Espectro de RMN 1H da *N*-succinilquitosana.

#### 4.5 Síntese de redes poliméricas contendo quitosana, *N*-succinilquitosana e poli(DL-ácido láctico)

Para a síntese das redes poliméricas (Figura 31), gerando os produtos denominados CR, o mecanismo provável envolve a formação de um intermediário na forma de sal lactato de quitosana gerado através da protonação do grupamento amina durante o preparo da solução B, do mesmo modo proposto para a obtenção dos copolímeros graftizados (Figura 13) [97-99]. Paralelamente, o preparo da solução A é necessário para que a *N*-succinilquitosana esteja solubilizada quando adicionada ao meio reacional. Acredita-se que durante a formação das redes, as cadeias laterais de oligo(ácido DL-láctico) se formem simultaneamente através da policondensação do ácido DL-láctico presente em excesso no meio reacional (Figura 14), ao mesmo tempo que a função hidroxila do poliéster em formação reage com a função ácido carboxílico da *N*-succinilquitosana [100] (Figura 32). Em outras palavras, o ácido DL-láctico atua como um agente formador de ligações cruzadas; suas hidroxilas reagem com as carboxilas da *N*-succinilquitosana enquanto que suas carboxilas reagem com os grupamentos amino da quitosana original. A di-funcionalidade deste composto conduz à polimerização, formando os segmentos de OLA que unem as cadeias de quitosana e *N*-succinilquitosana. Os parâmetros reacionais estão resumidos na Tabela 10.

Tabela 10 - Quantidades utilizadas nas reações de obtenção das redes poliméricas.

Código da amostra	Quantidade quitosana (g)/n (mmol)	Quantidade de <i>N</i> -succinilquitosana massa (g)/n (mmol)	Quantidade de ácido DL-lático massa (g)/n (mmol)
CR01	0,5/3,10	0,5/1,90	0,5/5,55
CR02	0,5/3,10	0,5/1,90	1/11,1
CR03	0,5/3,10	0,5/1,90	2/22,2
CR04	0,5/3,10	0,5/1,90	3/33,3
CR05	0,5/3,10	0,5/1,90	4/44,4
CR06	0,5/3,10	0,5/1,90	5/55,5

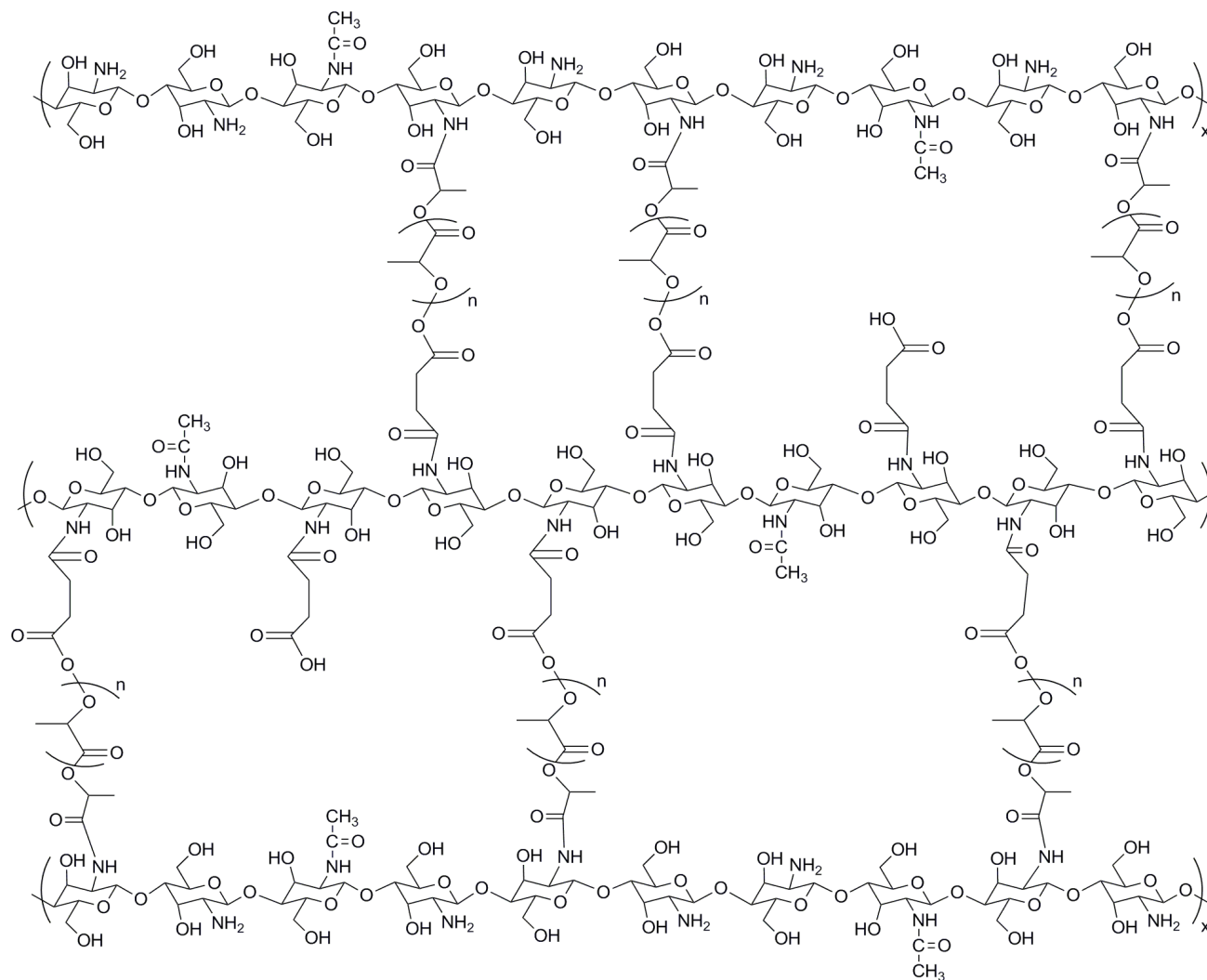
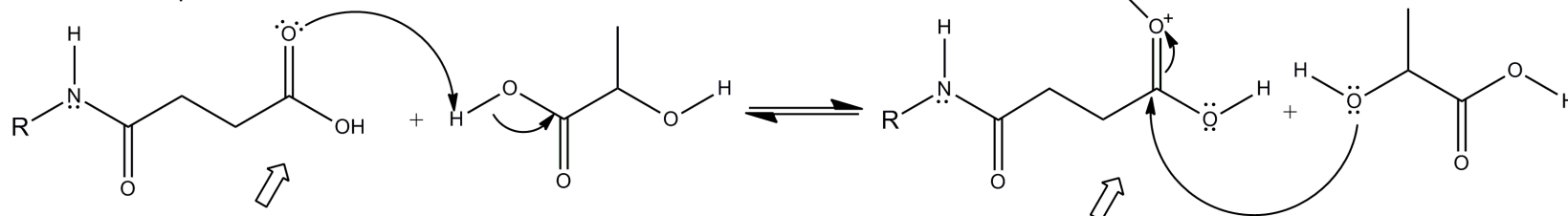


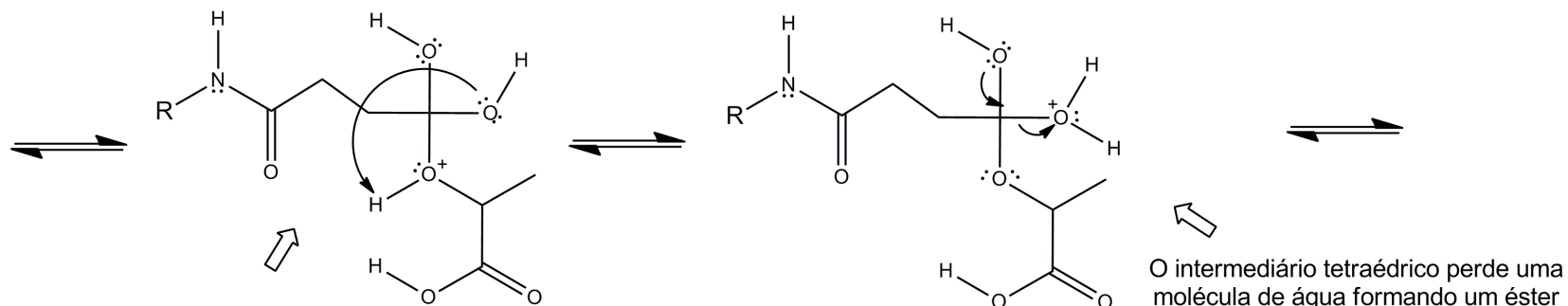
Figura 31 - Representação esquemática de uma rede polimérica.

R = cadeia de quitosana



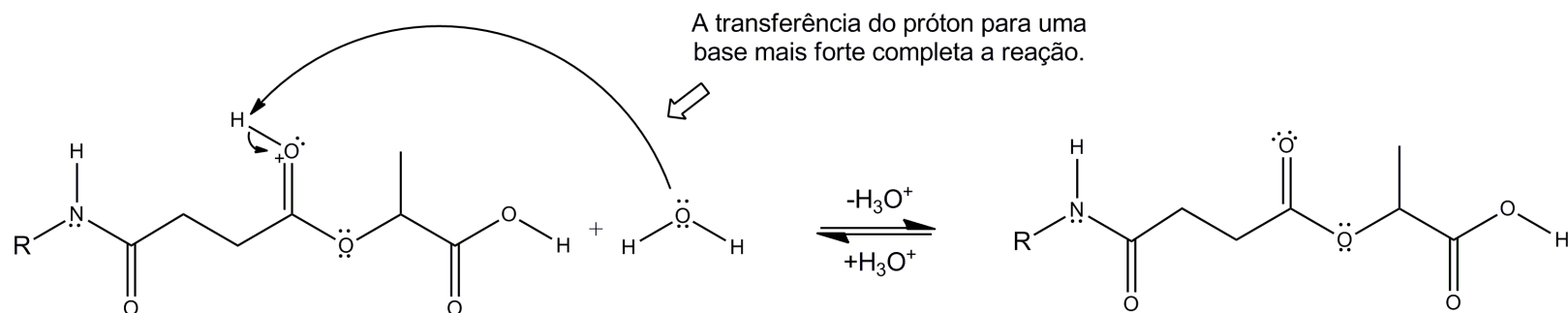
A carboxila de N-succinilquitosana aceita o próton de uma molécula de ácido láctico.

A função álcool de outra molécula de ácido láctico ataca a carboxila protonada para formar um intermediário tetraédrico.



Um próton é perdido por um átomo de oxigênio e ganho por outro.

O intermediário tetraédrico perde uma molécula de água formando um éster protonado.



A transferência do próton para uma base mais forte completa a reação.

Figura 32 - Mecanismo proposto para a reação entre a N-succinilquitosana e o ácido láctico.

Como discutido anteriormente, a polimerização do OLA na obtenção das redes poderia ser realizada com rendimentos mais elevados usando catalisadores, mas uma rede polimérica CR com um grau de polimerização (GP) elevado provavelmente apresentaria os problemas de um PLA de alta massa molar, como a ausência de maleabilidade e presença de termorrigidez [51,101-103].

Decorrido o tempo de reação, os filmes obtidos apresentaram transparência e uma coloração amarelada, provavelmente pela presença da quitosana uma vez que o PLA é incolor. Mesmo com a etapa final de preparo ocorrer sob vácuo por 6 h notou-se a ausência de bolhas. Os filmes das redes poliméricas (Figura 33) mantiveram sua integridade quando retirados das placas de Petri, demonstrando robustez, maleabilidade e adesividade quando manuseados. Todas essas características relatadas se mantiveram antes e depois do tratamento de purificação, exceto a adesividade, que tornou-se sensivelmente mais branda, provavelmente pela ausência dos oligômeros de PLA que não reagiram e estavam presentes na amostra antes da purificação.



Figura 33 - Filme de uma rede polimérica em contato com a pele.

#### 4.5.1 Infravermelho com transformada de Fourier

A Figura 34 mostra os espectros de FTIR para a quitosana, a *N*-succinilquitosana, o PLA e as amostras CR01 e CR06. Os demais espectros foram omitidos para facilitar a visualização, uma vez que todos apresentam perfis

similares. Esta técnica foi utilizada buscando informações que pudessem confirmar a obtenção da estrutura desejada, da mesma forma como foi utilizado na caracterização dos copolímeros graftizados. Foram observados nos espectros dos produtos CR a banda em  $1655\text{ cm}^{-1}$  atribuída originalmente ao grupamento *N*-acilamida residual da quitina (devido ao estiramento da carbonila de amida) aumentando com a formação de ligações amida proveniente da reação do ácido DL-lático com a quitosana [104-107] e a banda fraca em  $2930\text{ cm}^{-1}$  (referente ao estiramento do metileno,  $-\text{CH}_2-$ ) devido a presença do ácido succínico presente na *N*-succinilquitosana [132,133,120]. Ainda presentes, a banda acentuada em  $1730\text{ cm}^{-1}$ , referente a carbonila de éster [108], indica a polimerização do ácido DL-lático na formação da ligação cruzada, e a banda em  $3400\text{ cm}^{-1}$  (estiramento da ligação O-H [106,107]), que não sofreu alteração, conforme esperado visto que se trata de uma região de absorção característica para a função hidroxila, indicando que a reação de substituição não afetou as hidroxilas dos precursores.



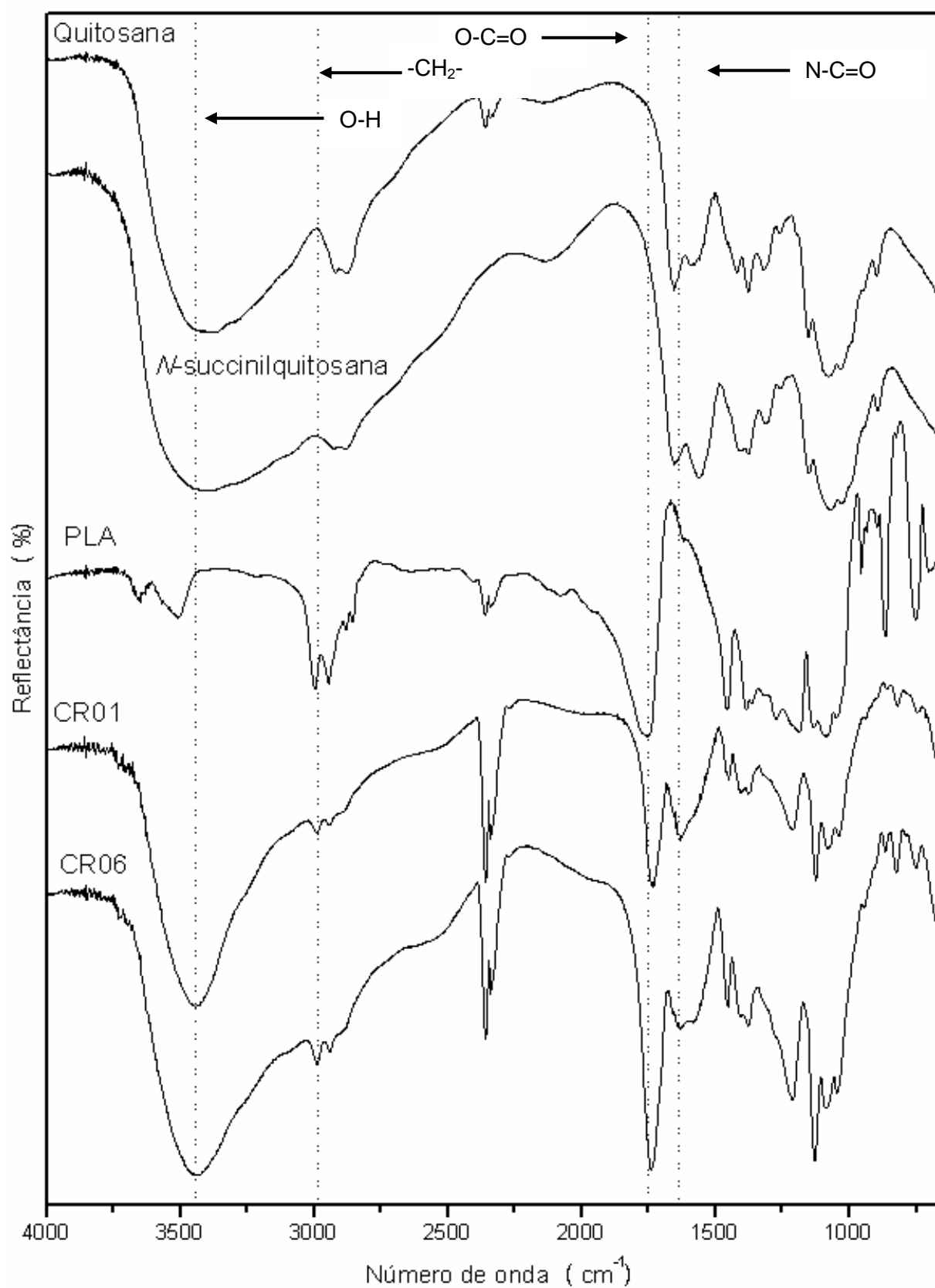


Figura 34 - Espectros de FTIR dos precursores e das amostras CR01 e CR06.



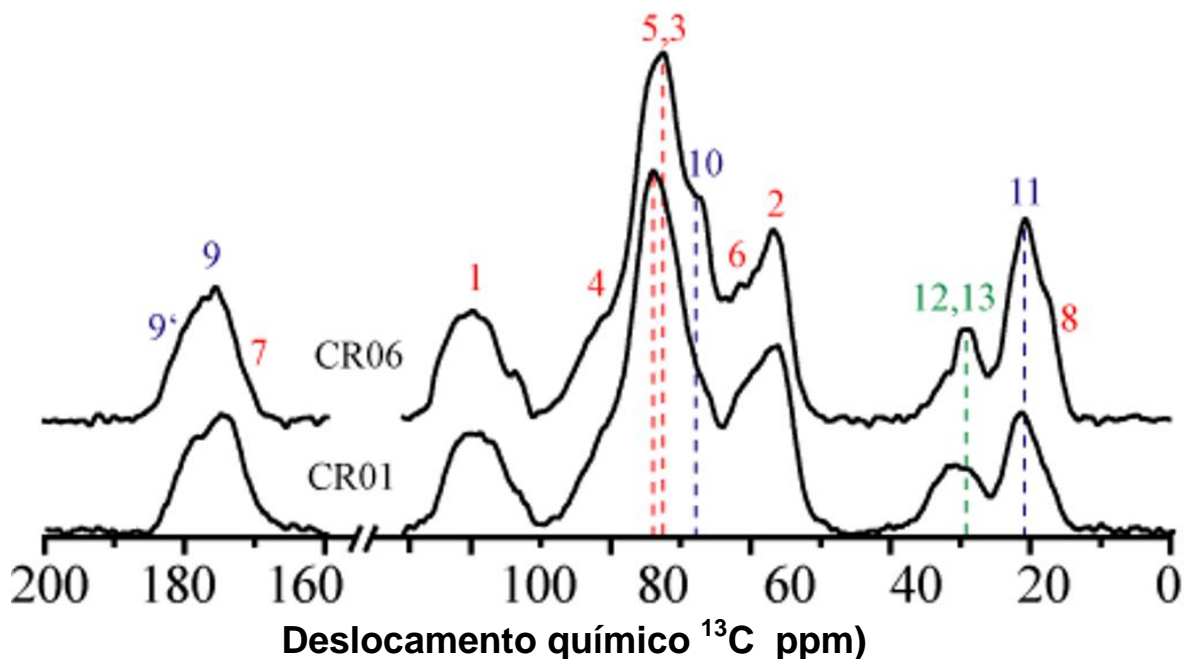


Figura 36 - Comparação entre espectros MultiCP das amostras CR01 e CR06 ; Para melhorar a visualização da região de interesse, a região de 110 a 160 ppm foi removida.

Todos os espectros das Figuras 36 e 37 foram normalizados pela integral do sinal C1. No entanto, o aumento das intensidades dos sinais C9, C10 e C11, indicados pelas linhas pontilhadas em azul, são diretamente relacionadas com a incorporação do OLA. Para a amostra CR06, também é possível observar a presença de uma linha estreita na região dos sinais atribuídos ao C12 e C13. O estreitamento de linhas em análise de sólidos orgânicos pode ser atribuído tanto a presença de movimentos moleculares com taxas  $>10$  kHz [112,137] ou aumento da ordem conformacional do local [111]. Medidas de  $^1\text{H}$  RMN no domínio do tempo (não disponibilizado) revelaram que não há movimentação molecular na escala de frequência utilizada para as amostras CR. Assim, o estreitamento da linha C12,13 provavelmente está relacionado com a formação da ligação cruzada que induz uma restrição conformacional. O aumento na concentração de ligações cruzadas é também apoiado pelo aparente deslocamento do pico nos sinais atribuídos ao carbono 3 (C3) e carbono 5 (C5), como indicado pelas linhas pontilhadas em vermelho. A substituição do grupo amina da quitosana pelo grupo amida produz um deslocamento para a direita no sinal C3 [110], assim, o deslocamento observado pode ser tomado como evidência da substituição dos grupamentos  $\text{NH}_2$  (amina). De fato, a análise qualitativa pode ser estendida aos

espectros das amostras CR02, CR03, CR04 e CR05, mostrados na Figura 37, permitindo concluir que a concentração de ligações cruzadas aumenta sistematicamente como função da concentração de OLA.

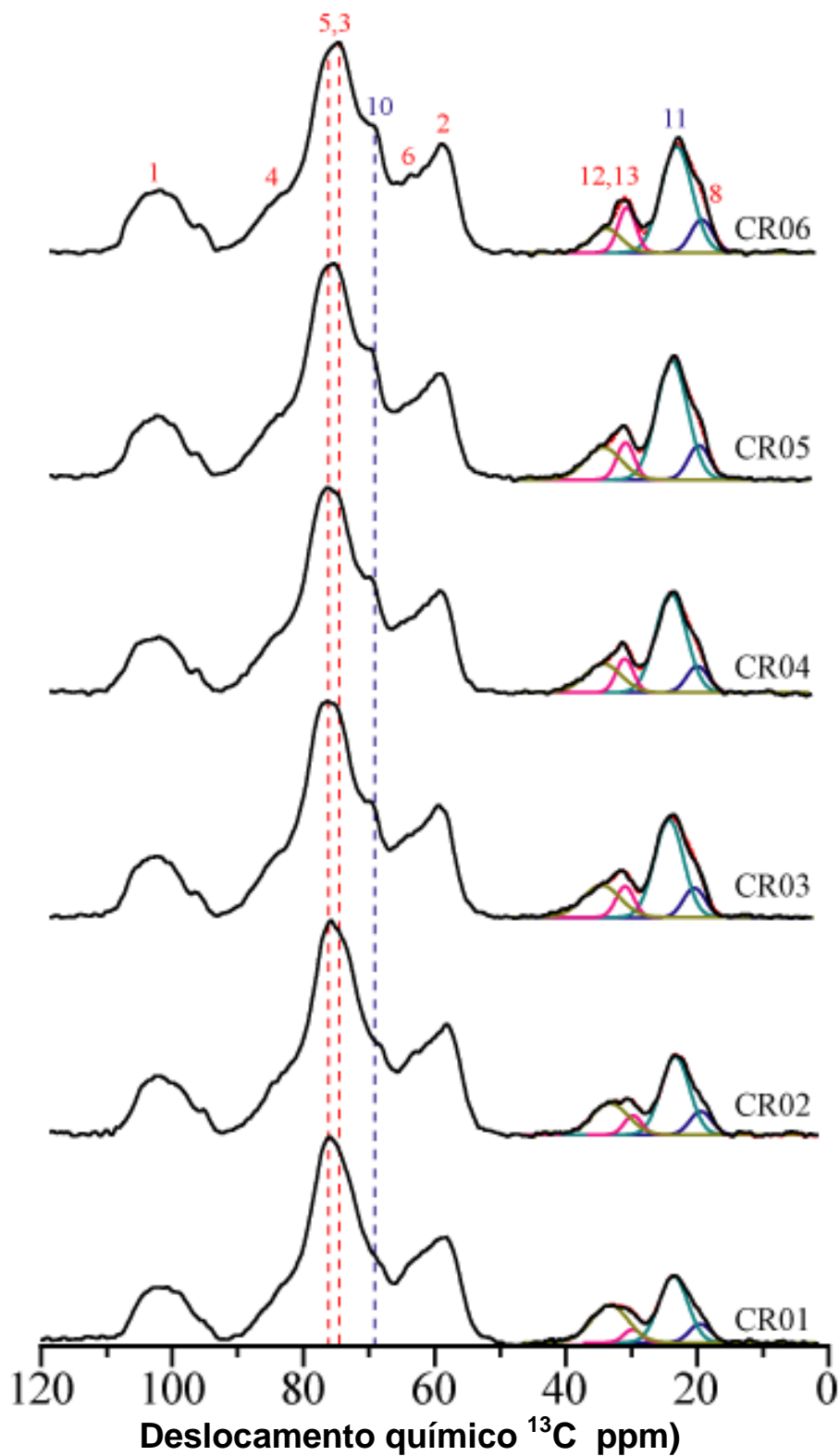


Figura 37 - Espectros MultiCP de todas as amostras CR.

Além do mencionado acima sobre a discussão qualitativa, com o uso de experimentos multiCP [92] torna possível obter estimativas quantitativas, a partir dos espectros da Figura 37. A acentuada sobreposição de linhas na região de 50-90 ppm dificulta o uso desses sinais para uma possível análise quantitativa, mas a região espectral de 10-40 ppm pode ser deconvoluída de forma segura em quatro linhas Gaussianas. Essas linhas podem ser associadas aos carbonos  $\text{CH}_3$  do grupo acetamida (azul) e OLA (verde), e carbono  $\text{CH}_2$  dos grupamentos succinila que reagiram para a formação da rede, bem como aqueles que não reagiram. Como já mencionado, todos os espectros foram normalizados pela integral do sinal C1. A área de cada linha Gaussiana é proporcional a concentração do segmento correspondente, relativo ao número de unidades de glucosamina e acetilglucosamina. Assim a deconvolução dos espectros mostra que a quantidade de acetamida é constante, enquanto a concentração de sítios de ligações cruzadas aumenta da amostra CR01 para CR06. Adicionalmente, a intensidade integrada do sinal atribuído aos grupamentos succinila formadores de ligação cruzada (rosa), claramente aumentam da amostra CR01 para CR06, enquanto o sinal dos grupamentos que não reagiram para formação da ligação cruzada (amarelo) diminui. Vale a pena mencionar, que a integral que cobre ambos sinais não foi fixada no ajuste, mas é constante para todas as amostras. Isso evidencia, que a concentração de ligações cruzadas aumenta em função à adição de OLA, enquanto o número total de grupamentos succinila permanece constante. Ainda, tomando a razão entre a integral ao longo do sinal de C12 e a área sobre ambos sinais 12 e 13, obtém-se a porcentagem de unidades succinila que realizaram ligação cruzada. Os valores obtidos para CR01, CR02, CR03, CR04, CR05 e CR06 foram, respectivamente, 14, 23, 32, 36, 38 e 53 %. Assim, para cada 100 unidades glucosídicas de quitosana, os valores em porcentagem representam o número de sítios substituídos (ponto de ligação cruzada). O gráfico gerado a partir desses valores é mostrado na Figura 38.

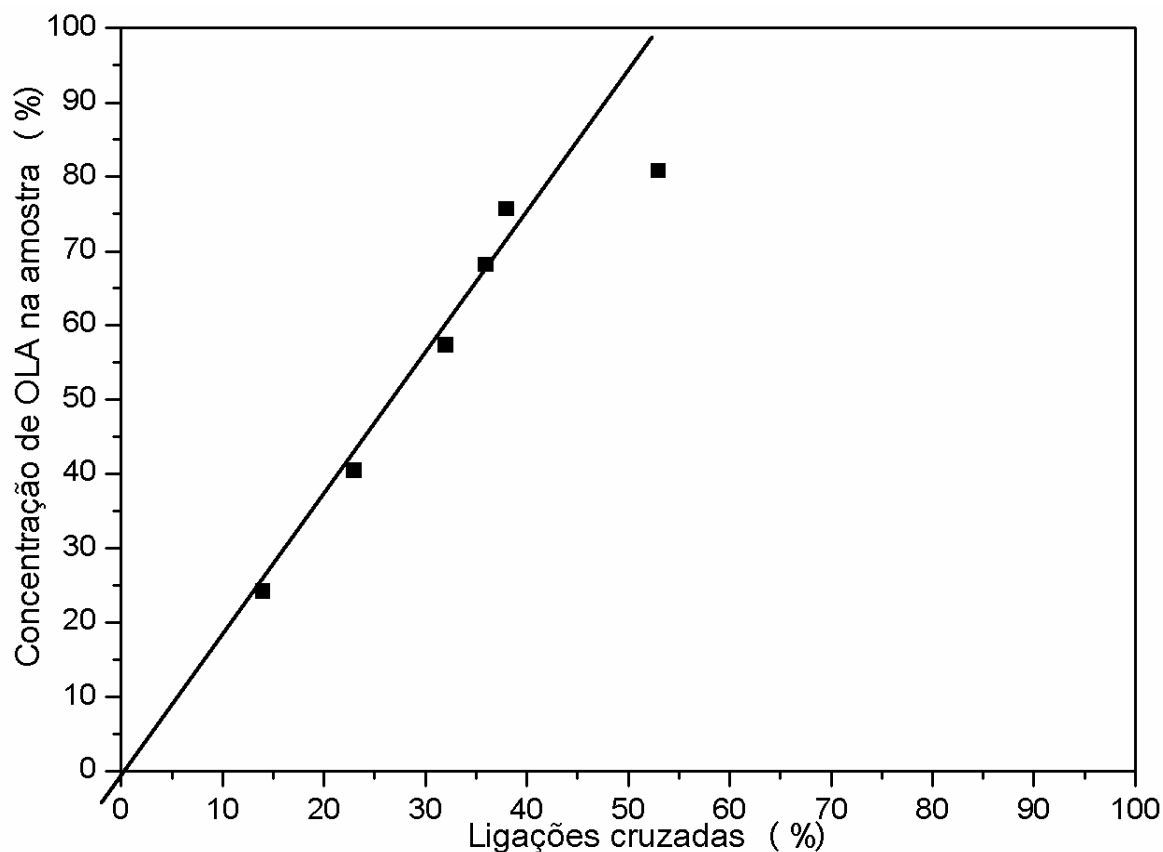


Figura 38 - Porcentagem de ligações cruzadas *versus* concentração de OLA na amostra.

#### 4.5.3 Análise termogravimétrica

As atribuições desta técnica foram discutidas na seção anterior e a faixa de estudo foi a mesma utilizada no ensaio dos copolímeros graftizados para permitir uma comparação. As curvas termogravimétricas das redes poliméricas são mostradas na Figura 39, e, novamente, é possível observar que o comportamento das redes foi semelhante no que diz respeito a perda de massa como foi observado nos copolímeros graftizados. Tal semelhança atribui-se ao fato que as ligações químicas que compõem os materiais são as mesmas em ambos os casos e embora do ponto de vista morfológico e estrutural seus comportamentos sejam diferentes, termicamente se comportam de forma semelhante, atribuído ao fato de que as ligações que os compõem são as mesmas (Tabela 7). Como relatado anteriormente, a quantidade de oligo(ácido DL-lático) presente em cada amostra influencia no perfil termogravimétrico das curvas, sendo que o perfil de perda de massa aumenta respectivamente da amostra CR01 à amostra CR06.

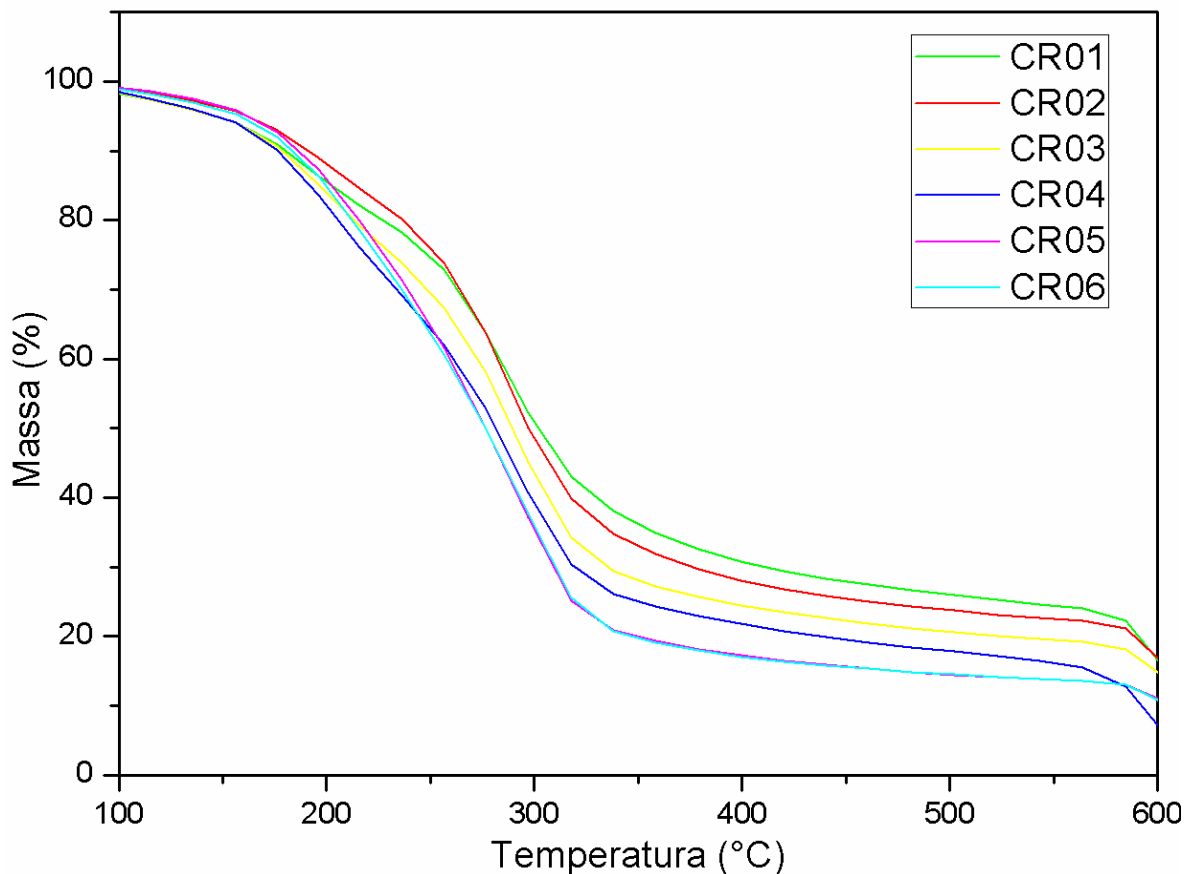


Figura 39 - Curvas termogravimétricas para as redes poliméricas.

Como analisado anteriormente na seção dos copolímeros graftizados, a curva DTG foi obtida e, então, foi possível observar um comportamento ligeiramente diferente a respeito da temperatura onde a taxa de maior degradação ocorre. As curvas DTG correspondentes aos eventos térmicos se encontram na Figura 40.

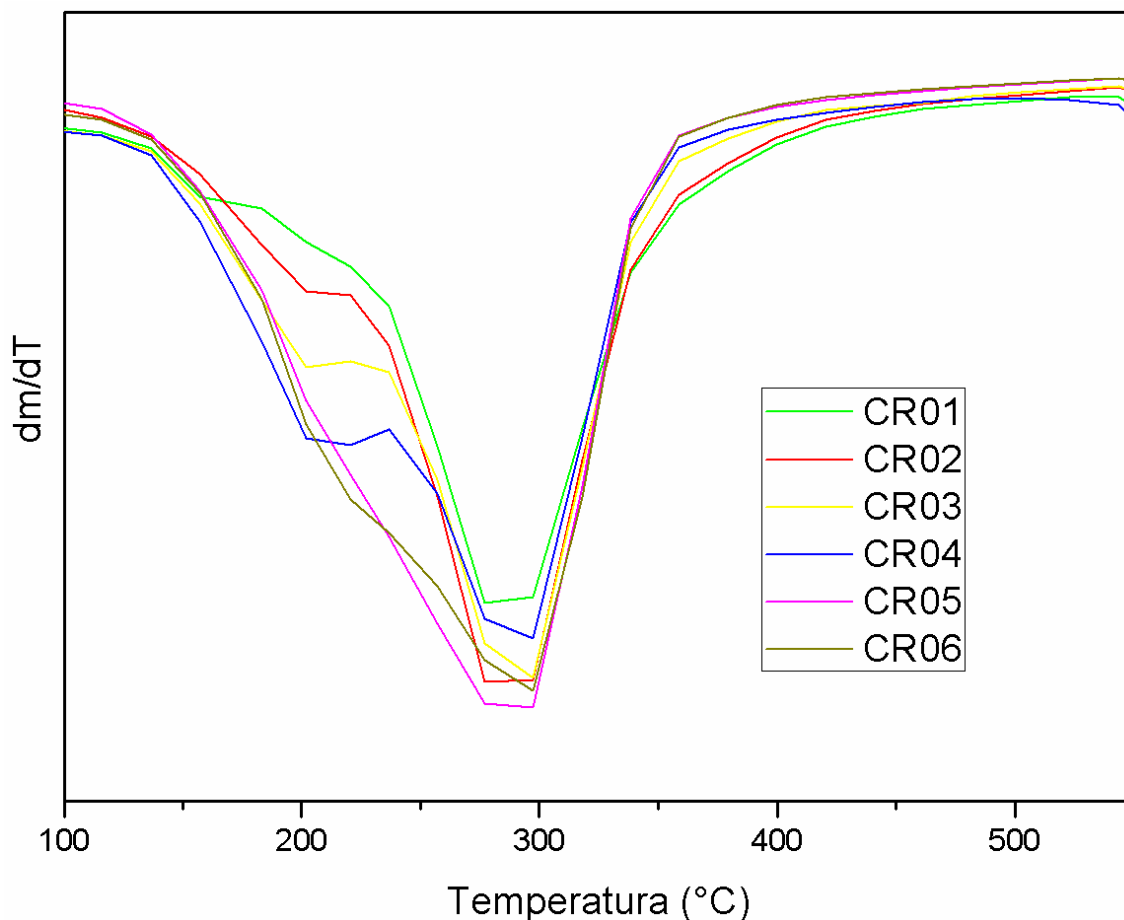


Figura 40 - Primeira derivada das curvas termogravimétricas para as composições reticuladas.

Quando comparado as curvas DTG das redes com os copolímeros graftizados, percebe-se que a taxa de máxima degradação dos materiais reticulados tendem a uma uniformidade e isso sugere que as ligações químicas obtidas pela reticulação exercem uma estabilidade térmica semelhante em todas as composições. Considerando-se que a área do pico sob a curva DTG é diretamente proporcional a variação de massa, pode-se ressaltar que todas as composições apresentaram comportamentos semelhantes no que diz respeito à perda de massa, o que já era esperado de acordo com as diferenças na concentração do OLA.

#### 4.5.4 Análise dinâmico-mecânica

A análise dinâmico-mecânica para as amostras das redes poliméricas revelou temperaturas de transição vítrea mais elevadas em comparação a mesma



análise dinâmico-mecânica realizada para os copolímeros graftizados, como esperado para um copolímero reticulado [138,139]. Os gráficos de  $\tan \delta$  para as redes poliméricas estão dispostos na Figura 41 e os valores das Tg's são mostrados na Tabela 11.

Tabela 11 - Temperaturas de transição vítrea obtidas para as redes poliméricas.

Código da amostra	Tg (°C)
CR01	165.3
CR02	169.1
CR03	172.3
CR04	177.8
CR05	167.1
CR06	157.8

Em nível molecular, a transição vítrea é acompanhada por movimentos moleculares de mais longo alcance, isto é, ocorre uma maior liberdade rotacional e conseqüentemente, mais movimentos segmentais da cadeia são permitidos.

Genericamente, pode-se considerar como volume livre o volume não ocupado existente entre os segmentos das cadeias poliméricas. Estes espaços vazios surgem como consequência da ineficiência de empacotamento das cadeias, gerando arranjos desordenados, típicos dos materiais amorfos. Há duas maneiras do volume ocupado por uma amostra influenciar a transição vítrea do sistema [140]: uma delas envolve a distância média de separação entre as moléculas e, portanto, influenciam a Tg através da diminuição da energia das interações moleculares. O segundo efeito na Tg provém da contribuição do volume livre através do aumento da entropia.

Tais fatores quando levados em conta sugerem que há uma separação proeminente entre as cadeias poliméricas nas redes visto que se observa sinais de transição vítrea, o que não foi observado no material de partida devido à sua rigidez. Isso ocorre pela introdução do poli(ácido DL-lático) entre as cadeias de *N*-succinilquitosana e quitosana diminuindo a alta densidade de ligações de hidrogênio que elas apresentam isoladamente e, conseqüentemente, aumentando a desordem do sistema. Por outro lado, a reticulação exerce um efeito

exatamente contrário ao aumento do volume livre, ou seja, com o aumento do grau de reticulação, o volume livre do sistema diminui e a Tg, por consequência, aumenta. Isto pode ser observado nos valores de Tg das amostras CR01, CR02, CR03 e CR04 que são, respectivamente, 165,3, 169,1, 172,3 e 177,8 °C. Em outras palavras, a reticulação separa as cadeias originais de forma a permitir mobilidade segmental, mas ao mesmo tempo exerce um efeito de ancoramento com o aumento dos pontos de reticulação.

O surgimento de reticulações em um sistema polimérico ocorre através da adição de agentes reticulantes específicos, que no caso deste trabalho é o oligo(ácido DL-lático) dando origem à um copolímero. Desta forma, dois efeitos diferentes devem ser observados: o resultado da incorporação de uma segunda cadeia polimérica e o efeito da reticulação em si. Na transição vítrea, tornam-se possíveis deslocamentos localizados dos segmentos da cadeia e com o aumento do grau de polimerização do segmento reticulante, deslocamentos com efeito de mais longo alcance começam a ocorrer, diminuindo o efeito do ancoramento e consequentemente diminuição da Tg, como verificado em relação às amostras CR05 e CR06 (167,1 e 157,8).

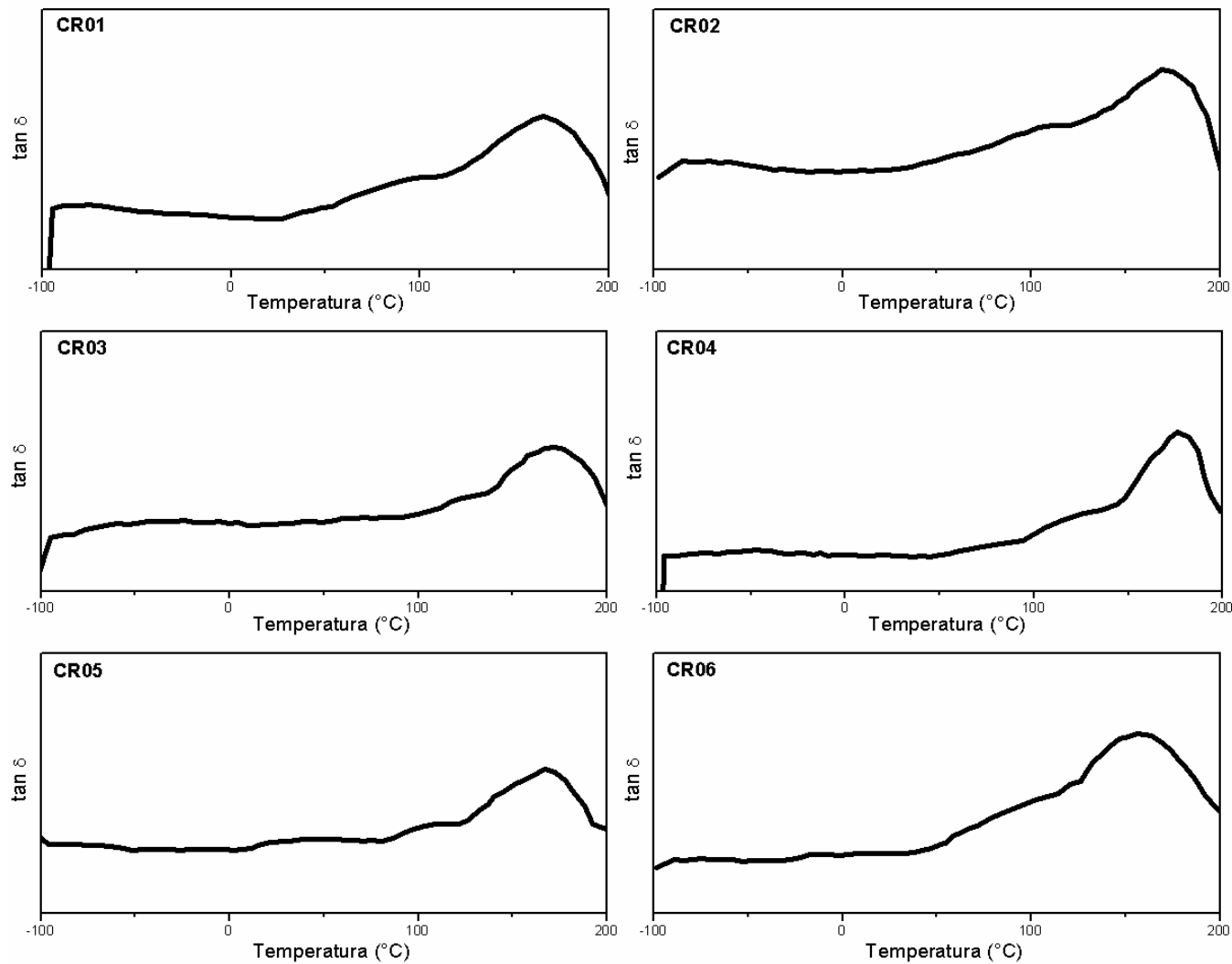


Figura 41 - Curvas  $\tan \delta$  em função da temperatura para as amostras de redes poliméricas em diferentes proporções de OLA adicionado.

#### 4.5.5 Ensaio mecânicos

As amostras na forma de filmes foram testadas por ensaio mecânico para verificação de suas propriedades mecânicas, obtendo depois da secagem uma espessura dos filmes de 300  $\mu\text{m}$ . Os detalhes do ensaio já foram discutidos na seção de ensaios mecânicos dos copolímeros graftizados. Os resultados estão dispostos na Figura 42.

Ao se fazer uma comparação generalizada aos resultados de ensaio mecânico obtidos para os copolímeros graftizados constata-se um aumento considerável tanto na tensão de ruptura quanto no módulo de elasticidade, bem como uma diminuição na deformação do copolímeros reticulados o que já era esperado para esta arquitetura molecular [141-143].

Ainda pode-se observar que o aumento da porcentagem de OLA nos filmes aumenta os valores de tensão e de módulo até a amostra CR04 e então ocorre um pequeno decréscimo nas amostras seguintes. Este fato corrobora os resultados encontrados para as Tg's nos ensaios de DMA.

Os detalhes discutidos até o momento reforçam a abordagem levantada na seção de RMN e, em resumo, sugerem que o grau de reticulação aumenta enquanto o grau de polimerização se mantém relativamente constante com o aumento da quantidade de OLA até amostra CR04. Para as duas últimas composições o aumento na quantidade de OLA demonstra ser superior ao requerido para a reticulação, gerando um copolímero reticulado onde o agente reticulante tem um grau de polimerização maior.

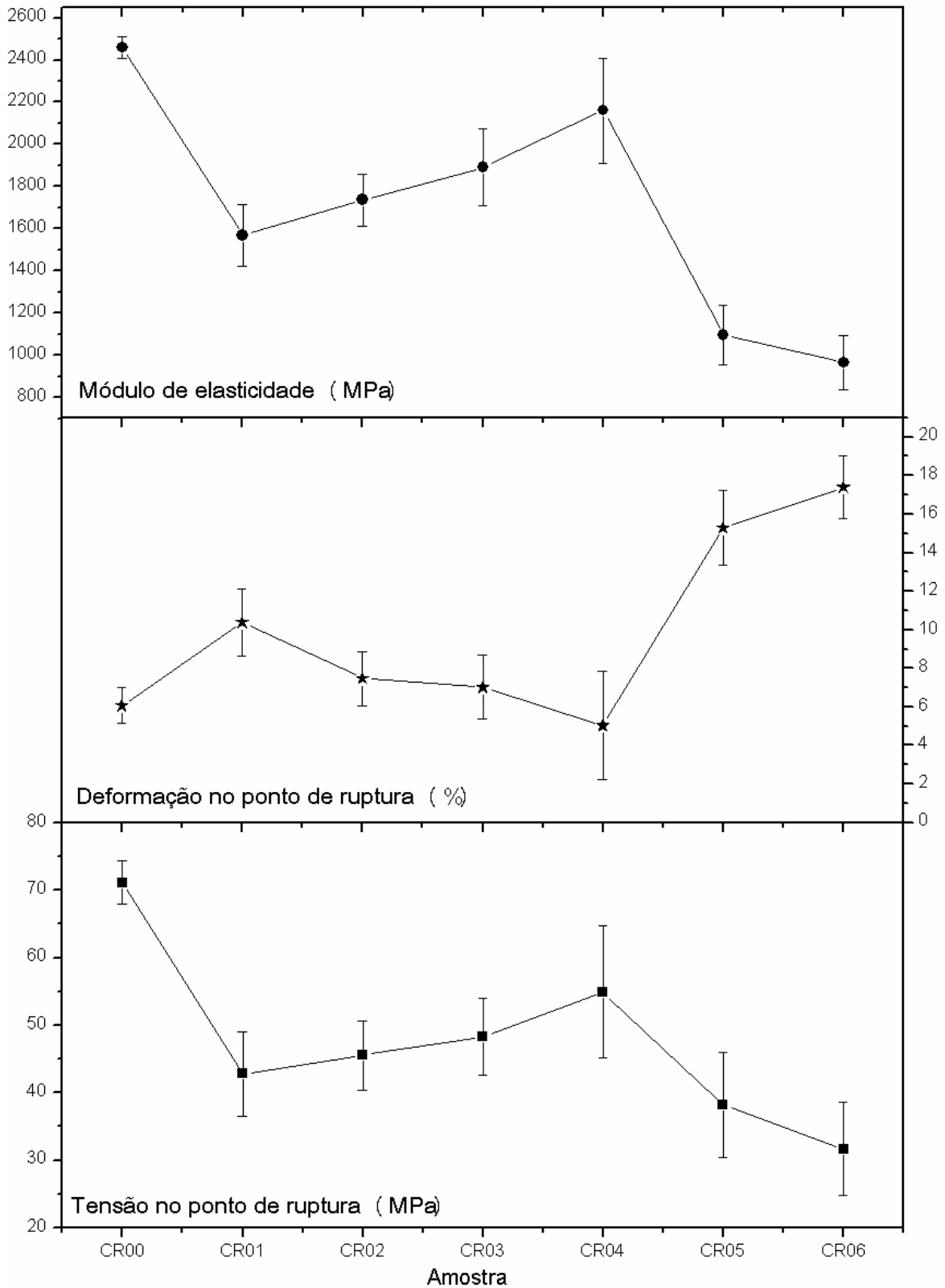


Figura 42 - Variação nas propriedades mecânicas estudadas das redes poliméricas relacionado a cada amostra obtida.

#### **4.6 Correlações entre os materiais obtidos**

Os resultados apresentados permitiram avaliar as correlações entre propriedades térmicas, mecânicas e dinâmico-mecânicas das três arquiteturas macromoleculares. As blendas não formaram materiais homogêneos devido à grosseira separação de fases, com propriedades muito fracas, atribuídas à falta de adesão entre estas fases.

A formação de materiais com ligação covalente entre os componentes propiciou um espectro de propriedades, que variou de acordo com a proporção entre os componentes (Figura 43).

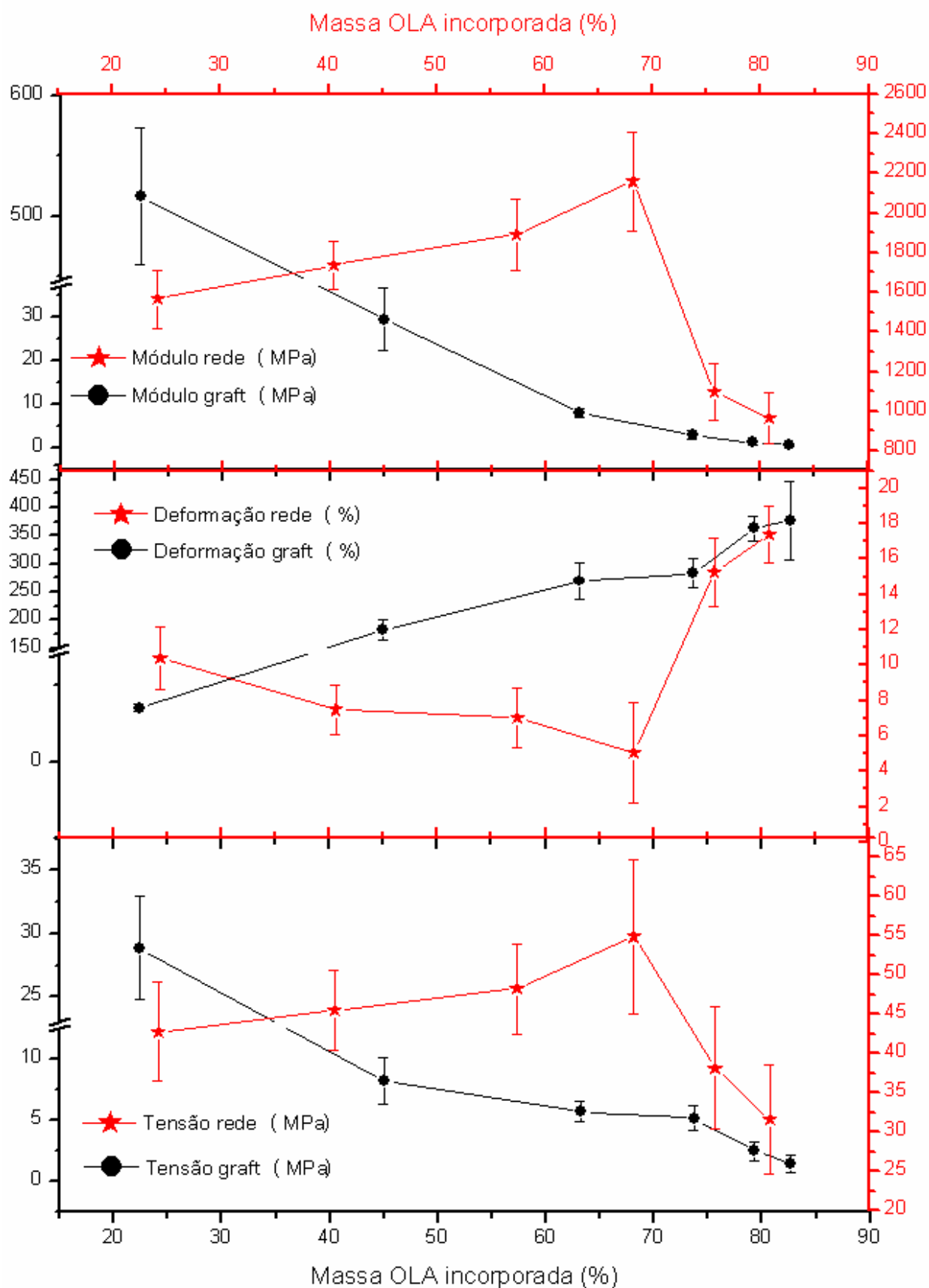


Figura 43 - Correlações entre as propriedades mecânicas e a massa de OLA incorporada para os copolímeros graftizados e as redes poliméricas.

O comportamento da relaxação  $\alpha$  ( $T_g$ ) pode ser tomado com um fator aferidor da flexibilidade conseguida com o afastamento intermolecular das cadeias rígidas de quitosana. Em todos os materiais foi obtida uma transição vítrea com a incorporação do poli(ácido DL-lático) como pode ser visto na Figura 44, em contraste com o produto original, onde não foi possível detectar a transição. Neste sentido, o objetivo principal do trabalho foi plenamente atingido, pois conseguiu-se obter materiais com flexibilidade e coesão, passíveis de serem testados para aplicações biológicas. Além disso, as diferentes configurações com os respectivos comportamentos correlacionados com a proporção entre os componentes, permitem o desenho de materiais com um perfil desejado de comportamento mecânico e térmico.

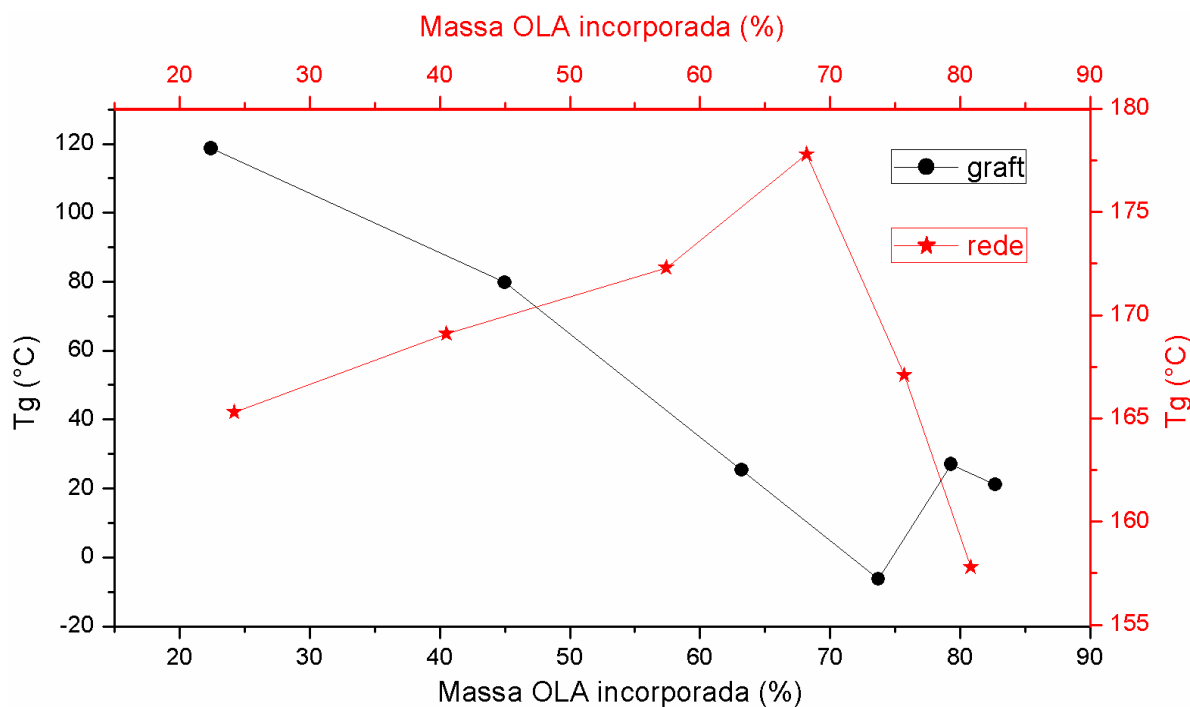


Figura 44 - Correlações entre a temperatura de transição vítrea e a massa de OLA incorporada para os copolímeros graftizados e as redes poliméricas.

A diferença entre os perfis dos materiais com mesma proporção dos componentes mas com diferentes arquiteturas moleculares constitui um exemplo marcante do efeito da configuração nas propriedades: enquanto a  $T_g$  e o módulo dos produtos graftizados decresce continuamente até certo ponto com o grau de inserção e o tamanho dos segmentos pendentes, as mesmas propriedades das redes aumenta até um ponto bem próximo. Este ponto situa-se na faixa de 70%



(concentração de OLA na amostra). A partir deste ponto a Tg dos copolímeros graftizados aumenta, provavelmente devido a uma inversão de fase onde o poli(ácido DL-lático) predomina. O oposto acontece para as redes, onde a Tg começa decair, porque o tamanho dos segmentos intercadeia aumenta, diminuindo o ancoramento, chegando a um ponto tal em que o volume livre permite maior alcance de mobilidade segmental. Uma comparação direta destes resultados com os ensaios mecânicos não leva à resultados onde os pontos de inflexão coincidem como na transição vítrea, provavelmente devido às diferentes morfologias que podem ser assumidas. É interessante notar que foi observada apenas uma Tg para todos os materiais, o perfil desta relaxação observado no DMA é bastante largo e pode abrigar transições relativas à diferentes fases, mas certamente reflete uma grande dispersão conformacional.

## 5. CONCLUSÕES

---

Tendo em mente a obtenção de materiais que aliem propriedades úteis para aplicação em biomateriais, com boas propriedades mecânicas (notadamente flexibilidade), foram escolhidos os materiais quitosana e poli(ácido DL-lático), ambos biodegradáveis e biocompatíveis, em três combinações diferentes: blendas, copolímeros graftizados e redes poliméricas em que as proporções entre os dois componentes foram variadas sistematicamente.

Foram sintetizadas amostras de poli(DL-ácido lático) para possibilitar comparação e interpretação dos resultados, com massa molar variando de 700 a 4200 g.mol<sup>-1</sup>. A síntese do OLA a partir do ácido DL-lático permitiu estudar as propriedades deste polímero e compreender melhor como ocorreu sua interação com a quitosana.

As blendas apresentaram separação de fase grosseira e propriedades mecânicas pobres, em toda a faixa de composição estudada, mas permitiram compreender como a utilização dos mesmos precursores em diferentes técnicas de associação levam a materiais com distintas propriedades.

A estrutura química dos copolímeros graftizados e das redes foi completamente elucidada por métodos químicos e espectrométricos (FTIR e RMN).

O grau de inserção dos segmentos graftizados e seu comprimento foi determinado, sendo os valores de 13,6 a 79,7 % para o grau de inserção e de aproximadamente 300 a 1000 g.mol<sup>-1</sup> para a massa molar.

O número de sítios contendo pontos de reticulação das redes variou de 14 a 53 % (densidade de ligações cruzadas) e o tamanho dos segmentos variou de 1522 a 5287 g.mol<sup>-1</sup>.

O comportamento das temperaturas de transição vítrea dos materiais caracterizou-se por: 1- em ambos os casos verificou-se que com pequena incorporação do poliácido, ocorre um grande abaixamento em comparação com a quitosana original, não substituída (o material muito rígido não tem Tg detectável) 2- os copolímeros graftizados e em rede apresentaram-se marcadamente diferentes; a medida que aumenta a incorporação do poliácido a Tg dos graftizados cai até a faixa de 70% , enquanto que a Tg das redes para semelhantes composições em massa, aumenta.

O comportamento mecânico seguiu a mesma tendência mas não de uma forma direta, provavelmente devido à diferentes morfologias formadas em cada caso.

O objetivo geral foi plenamente atingido, notadamente na incorporação da flexibilidade no conjunto de propriedades apresentado pela quitosana. Os resultados obtidos propiciam o desenvolvimento de materiais com propriedades pré desenhadas para aplicações específicas.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

1. Vogler EA (1998) Structure and reactivity of water at biomaterial surfaces. *Adv Colloid Interface Sci* 74:69-117.
2. Luxenhofer R, Fetsch C, Grossmann A (2013) Polypeptoids: A perfect match for molecular definition and macromolecular engineering? *J Polym Sci Pol Chem* 51 (13):2731-2752.
3. Williams DF (2009) On the nature of biomaterials. *Biomaterials* 30 (30):5897-5909.
4. Collier JH, Segura T (2011) Evolving the use of peptides as components of biomaterials. *Biomaterials* 32 (18):4198-4204.
5. Chen QZ, Liang SL, Thouas GA (2013) Elastomeric biomaterials for tissue engineering. *Prog Polym Sci* 38 (3-4):584-671.
6. Hopfner U, Schenck TL, Chavez MN, Machens HG, Bohne AV, Nickelsen J, Giunta RE, Egana JT (2014) Development of photosynthetic biomaterials for in vitro tissue engineering. *Acta Biomater* 10 (6):2712-2717.
7. Webber MJ, Matson JB, Tamboli VK, Stupp SI (2012) Controlled release of dexamethasone from peptide nanofiber gels to modulate inflammatory response. *Biomaterials* 33 (28):6823-6832.
8. Perez RA, Won JE, Knowles JC, Kim HW (2013) Naturally and synthetic smart composite biomaterials for tissue regeneration. *Adv Drug Deliv Rev* 65 (4):471-496.
9. Xu HP, Cao W, Zhang X (2013) Selenium-Containing Polymers: Promising Biomaterials for Controlled Release and Enzyme Mimics. *Accounts Chem Res* 46 (7):1647-1658.
10. Seal BL, Otero TC, Panitch A (2001) Polymeric biomaterials for tissue and organ regeneration. *Mater Sci Eng R-Rep* 34 (4-5):147-230.
11. Ellison DL (2013) Burns. *Crit Care Nurs Clin N Am* 25 (2):273-+.

12. Koehler S, Jinbo A, Johnson S, Puapong D, de los Reyes C, Woo R (2014) Negative pressure dressing assisted healing in pediatric burn patients. *J Pediatr Surg* 49 (7):1142-1145.
13. Kheyfets VO, Thornton RC, Kowal M, Finol EA (2014) A Protocol for Measuring Pull-off Stress of Wound-Treatment Polymers. *J Biomech Eng-Trans ASME* 136 (7):5.
14. Chaloupka K, Malam Y, Seifalian AM (2010) Nanosilver as a new generation of nanoparticle in biomedical applications. *Trends Biotechnol* 28 (11):580-588.
15. Muzzarelli RAA, Greco F, Busilacchi A, Sollazzo V, Gigante A (2012) Chitosan, hyaluronan and chondroitin sulfate in tissue engineering for cartilage regeneration: A review. *Carbohydr Polym* 89 (3):723-739.
16. Busilacchi A, Gigante A, Mattioli-Belmonte M, Manzotti S, Muzzarelli RAA (2013) Chitosan stabilizes platelet growth factors and modulates stem cell differentiation toward tissue regeneration. *Carbohydr Polym* 98 (1):665-676.
17. Swetha M, Sahithi K, Moorthi A, Srinivasan N, Ramasamy K, Selvamurugan N (2010) Biocomposites containing natural polymers and hydroxyapatite for bone tissue engineering. *Int J Biol Macromol* 47 (1):1-4.
18. Muzzarelli RAA (2011) Chitosan composites with inorganics, morphogenetic proteins and stem cells, for bone regeneration. *Carbohydr Polym* 83 (4):1433-1445.
19. Chen JN, Chen HA, Li P, Diao HJ, Zhu SY, Dong L, Wang R, Guo T, Zhao JN, Zhang JF (2011) Simultaneous regeneration of articular cartilage and subchondral bone in vivo using MSCs induced by a spatially controlled gene delivery system in bilayered integrated scaffolds. *Biomaterials* 32 (21):4793-4805.
20. Azhar FF, Olad A, Salehi R (2014) Fabrication and characterization of chitosan-gelatin/nanohydroxyapatite-polyaniline composite with potential application in tissue engineering scaffolds. *Des Monomers Polym* 17 (7):654-667.
21. Bavariya AJ, Norowski A, Anderson KM, Adatrow PC, Garcia-Godoy F, Stein SH, Bumgardner JD (2014) Evaluation of biocompatibility and degradation of chitosan nanofiber membrane crosslinked with genipin. *J Biomed Mater Res Part B* 102 (5):1084-1092.
22. Poranki D, Whitener W, Howse S, Mesen T, Howse E, Burnell J, Greengauz-Roberts O, Molnar J, Van Dyke M (2014) Evaluation of skin regeneration after

burns in vivo and rescue of cells after thermal stress in vitro following treatment with a keratin biomaterial. *J Biomater Appl* 29 (1):26-35.

23. Rouget C (1859) Des substances amylace es dans les tissus des animaux, specialement des Articules (chitine). *comprend* 48:792-795

24. Rinaudo M (2006) Chitin and chitosan: Properties and applications. *Prog Polym Sci* 31 (7):603-632.

25. Dash M, Chiellini F, Ottenbrite RM, Chiellini E (2011) Chitosan-A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. *Prog Polym Sci* 36 (8):981-1014.

26. Srinivasan A, Viraraghavan T (2010) Decolorization of dye wastewaters by biosorbents: A review. *J Environ Manage* 91 (10):1915-1929.

27. Jayakumar R, Menon D, Manzoor K, Nair SV, Tamura H (2010) Biomedical applications of chitin and chitosan based nanomaterials-A short review. *Carbohydr Polym* 82 (2):227-232.

28. Kean T, Thanou M (2010) Biodegradation, biodistribution and toxicity of chitosan. *Adv Drug Deliv Rev* 62 (1):3-11.

29. Kong M, Chen XG, Xing K, Park HJ (2010) Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review. *Int J Food Microbiol* 144 (1):51-63.

30. Mao SR, Sun W, Kissel T (2010) Chitosan-based formulations for delivery of DNA and siRNA. *Adv Drug Deliv Rev* 62 (1):12-27.

31. Kumari A, Yadav SK, Yadav SC (2010) Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloid Surf B-Biointerfaces* 75 (1):1-18.

32. Xia WS, Liu P, Zhang JL, Chen J (2011) Biological activities of chitosan and chitooligosaccharides. *Food Hydrocolloids* 25 (2):170-179.

33. Kumar M (2000) A review of chitin and chitosan applications. *React Funct Polym* 46 (1):1-27

34. Wang JL, Chen C (2014) Chitosan-based biosorbents: Modification and application for biosorption of heavy metals and radionuclides. *Bioresour Technol* 160:129-141.

35. Won SW, Kotte P, Wei W, Lim A, Yun YS (2014) Biosorbents for recovery of precious metals. *Bioresour Technol* 160:203-212.

36. Balan V, Verestiuc L (2014) Strategies to improve chitosan hemocompatibility: A review. *Eur Polym J* 53:171-188.

37. Wang KP, Liu Q (2014) Chemical structure analyses of phosphorylated chitosan. *Carbohydr Res* 386:48-56.
38. Muzzarelli RAA, Boudrant J, Meyer D, Manno N, DeMarchis M, Paoletti MG (2012) Current views on fungal chitin/chitosan, human chitinases, food preservation, glucans, pectins and inulin: A tribute to Henri Braconnot, precursor of the carbohydrate polymers science, on the chitin bicentennial. *Carbohydr Polym* 87 (2):995-1012.
39. Baldrick P (2010) The safety of chitosan as a pharmaceutical excipient. *Regul Toxicol Pharmacol* 56 (3):290-299.
40. Aider M (2010) Chitosan application for active bio-based films production and potential in the food industry: Review. *LWT-Food Sci Technol* 43 (6):837-842.
41. Prado HJ, Matulewicz MC (2014) Cationization of polysaccharides: A path to greener derivatives with many industrial applications. *Eur Polym J* 52:53-75.
42. Kandimalla VB, Ju HX (2006) Binding of acetylcholinesterase to a multiwall carbon nanotube-cross-linked chitosan composite for flow-injection amperometric detection of an organophosphorous insecticide. *Chem-Eur J* 12 (4):1074-1080.
43. Singh B, Choi YJ, Park IK, Akaike T, Cho CS (2014) Chemical Modification of Chitosan with pH-Sensitive Molecules and Specific Ligands for Efficient DNA Transfection and siRNA Silencing. *J Nanosci Nanotechnol* 14 (1):564-576.
44. Azevedo JV, Mano JF, Alves NM (2013) Development of new poly( $\epsilon$ -caprolactone)/chitosan films. *Polym Int* 62 (10):1425-1432.
45. Campos CA, Gerschenson LN, Flores SK (2011) Development of Edible Films and Coatings with Antimicrobial Activity. *Food Bioprocess Technol* 4 (6):849-875.
46. Gautam S, Chou CF, Dinda AK, Potdar PD, Mishra NC (2014) Fabrication and characterization of PCL/gelatin/chitosan ternary nanofibrous composite scaffold for tissue engineering applications. *J Mater Sci* 49 (3):1076-1089.
47. Fatoni A, Numnuam A, Kanatharana P, Limbut W, Thavarungkul P (2014) A Conductive Porous Structured Chitosan-grafted Polyaniline Cryogel for use as a Sialic Acid Biosensor. *Electrochim Acta* 130:296-304.
48. Popat A, Karmakar S, Jambhrunkar S, Xu C, Yu CZ (2014) Curcumin-cyclodextrin encapsulated chitosan nanoconjugates with enhanced solubility and cell cytotoxicity. *Colloid Surf B-Biointerfaces* 117:520-527.

49. Carothers W. H. Van Natta F. J. (1932) Studies of polymerization and ring formation. X. The reversible polymerization of six-membered cyclic esters. *Journal of the American Chemical Society* 54:761-772
50. Jeong B, Bae YH, Lee DS, Kim SW (1997) Biodegradable block copolymers as injectable drug-delivery systems. *Nature* 388 (6645):860-862
51. Garlotta D (2001) A literature review of poly(lactic acid). *J Polym Environ* 9 (2):63-84.
52. Hofvendahl K, Hahn-Hagerdal B (2000) Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources. *Enzyme Microb Technol* 26 (2-4):87-107.
53. Chen S, Hao YT, Cui WG, Chang J, Zhou Y (2013) Biodegradable electrospun PLLA/chitosan membrane as guided tissue regeneration membrane for treating periodontitis. *J Mater Sci* 48 (19):6567-6577.
54. Lou T, Leung M, Wang XJ, Chang JYF, Tsao CT, Sham JGC, Edmondson D, Zhang MQ (2014) Bi-Layer Scaffold of Chitosan/PCL-Nanofibrous Mat and PLLA-Microporous Disc for Skin Tissue Engineering. *J Biomed Nanotechnol* 10 (6):1105-1113.
55. Lasprilla AJR, Martinez GAR, Lunelli BH, Jardini AL, Maciel R (2012) Polylactic acid synthesis for application in biomedical devices - A review. *Biotechnol Adv* 30 (1):321-328.
56. Wee YJ, Kim JN, Ryu HW (2006) Biotechnological production of lactic acid and its recent applications. *Food Technol Biotechnol* 44 (2):163-172
57. Vleggaar D, Fitzgerald R, Lorenc ZP, Andrews JT, Butterwick K, Comstock J, Hanke CW, O'Daniel TG, Palm MD, Roberts WE, Sadick N, Teller CF (2014) Consensus Recommendations on the Use of Injectable Poly-L-Lactic Acid for Facial and Nonfacial Volumization. *J Drugs Dermatol* 13 (4):S44-S51
58. Burgess CM, Quiroga RM (2005) Assessment of the safety and efficacy of poly-L-lactic acid for the treatment of HIV-associated facial lipoatrophy. *J Am Acad Dermatol* 52 (2):233-239.
59. Lonvaud-Funel A (1999) Lactic acid bacteria in the quality improvement and depreciation of wine. *Antonie Van Leeuwenhoek* 76 (1-4):317-331.
60. Albertsson AC, Varma IK (2003) Recent developments in ring opening polymerization of lactones for biomedical applications. *Biomacromolecules* 4 (6):1466-1486.

61. Drumright RE, Gruber PR, Henton DE (2000) Polylactic acid technology. *Adv Mater* 12 (23):1841-1846.
62. Hutmacher DW (2000) Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials* 21 (24):2529-2543.
63. Auras R, Harte B, Selke S (2004) An overview of polylactides as packaging materials. *Macromol Biosci* 4 (9):835-864.
64. ATALA A. (1997) *Synthetic Biodegradable Polymer Scaffolds*. Birkhauser, Boston, MA
65. Chung YL, Olsson JV, Li RJ, Frank CW, Waymouth RM, Billington SL, Sattely ES (2013) A Renewable Lignin-Lactide Copolymer and Application in Biobased Composites. *ACS Sustain Chem Eng* 1 (10):1231-1238.
66. Takahashi S, Nobukawa S, Yamaguchi M (2014) Transparency of Rubber-Toughened Polymer Blend Containing Plasticizer. *J Appl Polym Sci* 131 (18):9.
67. Dong YM, Zhou ZJ, Ding HY, Zhang SJ (2014) Preparation and properties of a pH sensitive carrier based on three kinds of polymer blend to control the release of 5-amino salicylic acid. *Pharm Dev Technol* 19 (8):960-967.
68. Kumar P, Dutta K, Das S, Kundu PP (2014) Membrane prepared by incorporation of crosslinked sulfonated polystyrene in the blend of PVdF-co-HFP/Nafion: A preliminary evaluation for application in DMFC. *Appl Energy* 123:66-74.
69. Sam ST, Nuradibah MA, Ismail H, Noriman NZ, Ragunathan S (2014) Recent Advances in Polyolefins/Natural Polymer Blends Used for Packaging Application. *Polym-Plast Technol Eng* 53 (6):631-644.
70. El-Hefian EA, Nasef MM, Yahaya AH (2014) Chitosan-Based Polymer Blends: Current Status and Applications. *J Chem Soc Pak* 36 (1):11-27
71. Brittain WJ, Minko S (2007) A structural definition of polymer brushes. *J Polym Sci Pol Chem* 45 (16):3505-3512.
72. Erdodi G, Kennedy JP (2006) Amphiphilic conetworks: Definition, synthesis, applications. *Prog Polym Sci* 31 (1):1-18.
73. IUPAC Compendium of Chemical Terminology - the Gold Book. (2014). <http://goldbook.iupac.org/>. Acessado Junho 2014
74. Bhattarai N, Gunn J, Zhang MQ (2010) Chitosan-based hydrogels for controlled, localized drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 62 (1):83-99.



75. Jiang HL, Kim YK, Arote R, Nah JW, Cho MH, Choi YJ, Akaike T, Cho CS (2007) Chitosan-graft-polyethylenimine as a gene carrier. *J Control Release* 117 (2):273-280.
76. Al-Karawi AJM, Al-Qaisi ZHJ, Al-Qaisi AHJ, Al-Jeboori FHA (2014) Investigation of poly(methyl acrylate) grafted chitosan as a polymeric drug carrier. *Polym Bull* 71 (7):1575-1590.
77. Shankar P, Gomathi T, Vijayalakshmi K, Sudha PN (2014) Comparative studies on the removal of heavy metals ions onto cross linked chitosan-g-acrylonitrile copolymer. *Int J Biol Macromol* 67:180-188.
78. Wichterle O, Lim D (1960) HYDROPHILIC GELS FOR BIOLOGICAL USE. *Nature* 185 (4706):117-118.
79. Peppas NA, Bures P, Leobandung W, Ichikawa H (2000) Hydrogels in pharmaceutical formulations. *Eur J Pharm Biopharm* 50 (1):27-46.
80. Soni G, Yadav KS (2014) High encapsulation efficiency of poloxamer-based injectable thermoresponsive hydrogels of etoposide. *Pharm Dev Technol* 19 (6):651-661.
81. Yunoki S, Kohta M, Ohyabu Y, Sekiguchi M, Kubo T, Iwasaki T (2014) Electrostatic Immobilization of Cetylpyridinium Chloride to Poly( vinyl alcohol) Hydrogels for the Simple Fabrication of Wound Dressings with the Suppressed Release of Antibacterial Agents. *J Appl Polym Sci* 131 (13):9.
82. Selby A, Maldonado-Codina C, Derby B (2014) Influence of specimen thickness on the nanoindentation of hydrogels: Measuring the mechanical properties of soft contact lenses. *J Mech Behav Biomed Mater* 35:144-156.
83. Sohail K, Khan IU, Shahzad Y, Hussain T, Ranjha NM (2014) pH-sensitive polyvinylpyrrolidone-acrylic acid hydrogels: Impact of material parameters on swelling and drug release. *Braz J Pharm Sci* 50 (1):173-184.
84. Sato R, Kawakami T, Tokuyama H (2014) Preparation of polymeric macroporous hydrogels for the immobilization of enzymes using an emulsion-gelation method. *React Funct Polym* 76:8-12.
85. Awadallah A (2014) Synergistic effect of poly(acrylamide)-incorporated poly(L-ascorbic acid) hydrogels in controlled release and wound dressings. *Des Monomers Polym* 17 (5):466-480.
86. Laftah WA, Hashim S (2014) The influence of plant natural fibers on swelling behavior of polymer hydrogels. *J Compos Mater* 48 (5):555-569.

87. Zhao W, Jin X, Cong Y, Liu YY, Fu J (2013) Degradable natural polymer hydrogels for articular cartilage tissue engineering. *J Chem Technol Biotechnol* 88 (3):327-339.
88. Patenaude M, Hoare T (2012) Injectable, Mixed Natural-Synthetic Polymer Hydrogels with Modular Properties. *Biomacromolecules* 13 (2):369-378.
89. Yamaguchi R, Arai Y, Itoh T, Hirano S (1981) PREPARATION OF PARTIALLY N-SUCCINYLATED CHITOSANS AND THEIR CROSS-LINKED GELS. *Carbohydr Res* 88 (1):172-175.
90. HAERBELEN U (1976) High Resolution NMR in solids. Academic Press, New York
91. K. SCHMIDT-ROHR HWS (1994) Multidimensional Solid-State NMR and Polymers. Academic Press, New York
92. Johnson RL, Schmidt-Rohr K (2014) Quantitative solid-state C-13 NMR with signal enhancement by multiple cross polarization. *J Magn Reson* 239:44-49.
93. Suyatma NE, Copinet A, Tighzert L, Coma V (2004) Mechanical and barrier properties of biodegradable films made from chitosan and poly (lactic acid) blends. *J Polym Environ* 12 (1):1-6.
94. Sebastien F, Stephane G, Copinet A, Coma V (2006) Novel biodegradable films made from chitosan and poly(lactic acid) with antifungal properties against mycotoxinogen strains. *Carbohydr Polym* 65 (2):185-193.
95. Wan Y, Fang Y, Wu H, Cao XY (2007) Porous polylactide/chitosan scaffolds for tissue engineering. *J Biomed Mater Res Part A* 80A (4):776-789.
96. Masson JF, Manley RS (1991) MISCIBLE BLENDS OF CELLULOSE AND POLY(VINYLPYRROLIDONE). *Macromolecules* 24 (25):6670-6679.
97. Wakselman M, Acher F (1980) REACTION OF CARBOXYLATE SALTS WITH CYCLIC PHOSPHORAMIDATES - AMIDE BOND FORMATION BY PRIOR AMINE CAPTURE. *Tetrahedron Lett* 21 (28):2705-2708.
98. Goodreid JD, Duspara PA, Bosch C, Batey RA (2014) Amidation Reactions from the Direct Coupling of Metal Carboxylate Salts with Amines. *J Org Chem* 79 (3):943-954.
99. Rao AP, Joshi SV, Trivedi JJ, Devmurari CV, Shah VJ (2003) Structure-performance correlation of polyamide thin film composite membranes: effect of coating conditions on film formation. *J Membr Sci* 211 (1):13-24

100. Solomons T.W. Fryle CB (2011) Organic Chemistry. 10th edition edn. JOHN WILEY & SONS, INC., New Jersey
101. Islam MR, Bach LG, Vo TS, Lee DC, Lim KT (2014) Controlled Synthesis, Optical Properties and Cytotoxicity Studies of CdSe-Poly(lactic acid) Multifunctional Nanocomposites by Ring-Opening Polymerization. *J Nanosci Nanotechnol* 14 (8):6251-6255.
102. Perego G, Cella GD, Bastioli C (1996) Effect of molecular weight and crystallinity on poly(lactic acid) mechanical properties. *J Appl Polym Sci* 59 (1):37-43.
103. Grizzi I, Garreau H, Li S, Vert M (1995) HYDROLYTIC DEGRADATION OF DEVICES BASED ON POLY(DL-LACTIC ACID) SIZE-DEPENDENCE. *Biomaterials* 16 (4):305-311.
104. Liu XF, Guan YL, Yang DZ, Li Z, De Yao K (2001) Antibacterial action of chitosan and carboxymethylated chitosan. *J Appl Polym Sci* 79 (7):1324-1335
105. Cadogan EI, Lee CH, Popuri SR, Lin HY (2014) Effect of Solvent on Physico-Chemical Properties and Antibacterial Activity of Chitosan Membranes. *Int J Polym Mater Polym Biomat* 63 (14):708-715.
106. Brugnerotto J, Lizardi J, Goycoolea FM, Arguelles-Monal W, Desbrieres J, Rinaudo M (2001) An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization. *Polymer* 42 (8):3569-3580.
107. Robert M. Silverstein FXW, David J. Kiemle (2005) Spectrometric Identification of Organic Compounds. 7th Edition edn. John Wiley & Sons, New Jersey
108. Motta AC, Duek EAR (2007) Synthesis and characterization of the copolymer poly(L-co-D,L lactic acid). *Polimeros* 17 (2):123-129.
109. Heux L, Brugnerotto J, Desbrieres J, Versali MF, Rinaudo M (2000) Solid state NMR for determination of degree of acetylation of chitin and chitosan. *Biomacromolecules* 1 (4):746-751.
110. Oliveira JR, Martins MCL, Mafra L, Comes P (2012) Synthesis of an O-alkynyl-chitosan and its chemoselective conjugation with a PEG-like amino-azide through click chemistry. *Carbohydr Polym* 87 (1):240-249.
111. Tonelli AE (1989) NMR Spectroscopy and Polymer Microstructure: The Conformational Connection. Wiley, New York

112. DeAzevedo ER, Bonagamba TJ, Reichert D (2005) Molecular dynamics in solid polymers. *Prog Nucl Magn Reson Spectrosc* 47 (3-4):137-164.
113. Bernardinelli OD, Faria GC, Nunes L, Faria RM, deAzevedo ER, Pinto MFS (2012) Correlation Between Molecular Conformation, Packing, and Dynamics in Oligofluorenes: A Theoretical/Experimental Study. *J Phys Chem A* 116 (17):4285-4295.
114. Douglas A. Skoog DMW, James Holler, Stanley R. Crouch (2006) *Fundamentos de Química Analítica*. 8ª Edição edn. Thomson, São Paulo
115. Tirkistani FAA (1998) Thermal analysis of some chitosan Schiff bases. *Polym Degrad Stabil* 60 (1):67-70.
116. Guinesi LS, Cavalheiro ETG (2006) Influence of some reactional parameters on the substitution degree of biopolymeric Schiff bases prepared from chitosan and salicylaldehyde. *Carbohydr Polym* 65 (4):557-561.
117. Deng PH, Xu ZF, Feng YL (2013) Sensitive determination of bisphenol A in plastic products by derivative voltammetry using an acetylene black paste electrode coated with salicylaldehyde-modified chitosan. *Int J Environ Anal Chem* 93 (11):1116-1131.
118. Canevarolo SV (2006) *Ciência dos polímeros: um texto básico para tecnólogos e engenheiros*. 2ª Edição edn. Artliber Ltda., São Paulo
119. Menard KP (2008) *Dynamic mechanical analysis : a practical introduction*. 2 edition edn. CRC press, Boca Raton FL
120. Wang S, Zheng MY (2014) An easy approach to fabricating HgS/chitosan nanocomposite films and their ability to sense triethylamine. *J Polym Eng* 34 (4):339-344.
121. Correia CO, Caridade SG, Mano JF (2014) Chitosan Membranes Exhibiting Shape Memory Capability by the Action of Controlled Hydration. *Polymers* 6 (4):1178-1186.
122. Xu KM, Li KF, Zhong TH, Guan LT, Xie CP, Li S (2014) Effects of chitosan as biopolymer coupling agent on the thermal and rheological properties of polyvinyl chloride/wood flour composites. *Compos Pt B-Eng* 58:392-399.
123. Ngadaonye JI, Geever LM, Killion J, Higginbotham CL (2013) Development of novel chitosan-poly(N,N-diethylacrylamide) IPN films for potential wound dressing and biomedical applications. *J Polym Res* 20 (7):13.

124. Burgos N, Tolaguera D, Fiori S, Jimenez A (2014) Synthesis and Characterization of Lactic Acid Oligomers: Evaluation of Performance as Poly(Lactic Acid) Plasticizers. *J Polym Environ* 22 (2):227-235.
125. Corre YM, Maazouz A, Reignier J, Duchet J (2014) Influence of the chain extension on the crystallization behavior of polylactide. *Polym Eng Sci* 54 (3):616-625.
126. Standard test method for tensile properties of plastics, ASTM D638 (1991). Easton
127. Akcelrud L (2007) Fundamentos da ciência dos polímeros. Editora Manole, Barueri
128. Li SM (1999) Hydrolytic degradation characteristics of aliphatic polyesters derived from lactic and glycolic acids. *J Biomed Mater Res* 48 (3):342-353.
129. Xu KM, Li KF, Tu DY, Zhong TH, Xie CP (2014) Reinforcement on the Mechanical-, Thermal-, and Water-Resistance Properties of the Wood Flour/Chitosan/Poly(vinyl chloride) Composites by Physical and Chemical Modification. *J Appl Polym Sci* 131 (18):7.
130. Gu CH, Zhang H, Lang MD (2014) Preparation of mono-dispersed silver nanoparticles assisted by chitosan-g-poly(epsilon-caprolactone) micelles and their antimicrobial application. *Appl Surf Sci* 301:273-279.
131. Kim IY, Seo SJ, Moon HS, Yoo MK, Park IY, Kim BC, Cho CS (2008) Chitosan and its derivatives for tissue engineering applications. *Biotechnol Adv* 26 (1):1-21.
132. Tan HP, Chu CR, Payne KA, Marra KG (2009) Injectable in situ forming biodegradable chitosan-hyaluronic acid based hydrogels for cartilage tissue engineering. *Biomaterials* 30 (13):2499-2506.
133. Dai YN, Li P, Zhang JP, Wang AQ, Wei Q (2008) A novel pH sensitive N-succinyl chitosan/alginate hydrogel bead for nifedipine delivery. *Biopharm Drug Dispos* 29 (3):173-184.
134. Wang ZH, Zeng R, Tu M, Zhao JH (2013) Synthesis, Characterization of Biomimetic Phosphorylcholine-Bound Chitosan Derivative and In Vitro Drug Release of Their Nanoparticles. *J Appl Polym Sci* 128 (1):153-160.
135. Zhu AP, Chen T, Yuan LH, Wu H, Lu P (2006) Synthesis and characterization of N-succinyl-chitosan and its self-assembly of nanospheres. *Carbohydr Polym* 66 (2):274-279.

136. Yan CY, Chen DW, Gu JW, Hu HY, Zhao XL, Qiao MX (2006) Preparation of N-succinyl-chitosan and their physical-chemical properties as a novel excipient. *Yakugaku Zasshi-J Pharm Soc Jpn* 126 (9):789-793.
137. Takegoshi K, Hikichi K (1991) EFFECTS OF BLENDING ON LOCAL CHAIN DYNAMICS AND GLASS-TRANSITION - POLYSTYRENE POLY(VINYL METHYL-ETHER) BLENDS AS STUDIED BY HIGH-RESOLUTION SOLID-STATE C-13 NUCLEAR-MAGNETIC-RESONANCE SPECTROSCOPY. *J Chem Phys* 94 (4):3200-3206.
138. Donth E, Beiner M, Reissig S, Korus J, Garwe F, Vieweg S, Kahle S, Hempel E, Schroter K (1996) Fine structure of the main transition in amorphous polymers: Entanglement spacing and characteristic length of the glass transition. Discussion of examples. *Macromolecules* 29 (20):6589-6600.
139. Nobukawa S, Urakawa O, Shikata T, Inoue T (2013) Dynamics of a Probe Molecule Dissolved in Several Polymer Matrices with Different Side-Chain Structures: Determination of Correlation Length Relevant to Glass Transition. *Macromolecules* 46 (6):2206-2215.
140. Hiemenz PC (1984) *Polymer Chemistry*. Marcel Dekker, New York
141. Safranski DL, Gall K (2008) Effect of chemical structure and crosslinking density on the thermo-mechanical properties and toughness of (meth)acrylate shape memory polymer networks. *Polymer* 49 (20):4446-4455.
142. Li FK, Hasjim J, Larock RC (2003) Synthesis, structure, and thermophysical and mechanical properties of new polymers prepared by the cationic copolymerization of corn oil, styrene, and divinylbenzene. *J Appl Polym Sci* 90 (7):1830-1838.
143. Lin N, Chen GJ, Huang J, Dufresne A, Chang PR (2009) Effects of Polymer-Grafted Natural Nanocrystals on the Structure and Mechanical Properties of Poly(lactic acid): A Case of Cellulose Whisker-graft-Polycaprolactone. *J Appl Polym Sci* 113 (5):3417-3425.
-