UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA

DEPARTAMENTO DE TERMOFLUIDODINÂMICA – ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: ENGENHARIA DE PROCESSOS

OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MEMBRANAS MULTICAMADAS DE QUITOSANA E ALGINATO CONTENDO COBRE

AUTOR: RAFAEL GONÇALVES DE PAIVA

ORIENTADORA: PROF[a]. DR[a]. MARISA MASUMI BEPPU

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Engenharia Química como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Campinas – São Paulo

02/2009

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DA ÁREA DE ENGENHARIA E ARQUITETURA - BAE - UNICAMP

P166o

Paiva, Rafael Gonçalves de
Obtenção e caracterização de membranas multicamadas de quitosana e alginato contendo cobre / Rafael Gonçalves de Paiva. --Campinas, SP: [s.n.], 2009.

Orientador: Marisa Masumi Beppu.
Dissertação de Mestrado - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Quitosana. 2. Alginatos. 3. Cobre. 4. Membranas (Tecnologia). I. Beppu, Marisa Masumi. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. III. Título.

Título em Inglês: Production and characterization of chitosan and alginate multilayer membranes containing copper
Palavras-chave em Inglês: Chitosan, Alginate, Copper, Membranes
Área de concentração: Engenharia de Processos
Titulação: Mestre em Engenharia Química
Banca examinadora: Theo Guenter Kieckbusch, Silvia Yuko Eguchi
Data da defesa: 18/02/2009
Programa de Pós Graduação: Engenharia Química

Dissertação de Mestrado defendida por Rafael Gonçalves de Paiva e aprovada em 18 de Fevereiro pela banca examinadora constituída pelos doutores:

Profa. Dra. Marisa Masumi Beppu (FEQ/UNICAMP)

Dra. Silvia Yuko Eguchi (DOSAGE)

Prof. Dr. Theo Guenter Kieckbusch (FEQ/UNICAMP)

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado em Engenharia Química.

Marisa Masumi Beppu - orientadora

Aos meus pais

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que estiveram em meu convívio durante este trabalho:

- Meus pais, Jane e Randolfo, e meu irmão Guilherme, que nunca hesitaram em me apoiar;
- Companheiros de república: Cassiano, Ennio, Santizta, Daniel, Danilo, Guilhermão e Guilherminho;
- Colegas de laboratório: Ródrigo, Gilberto, Emerson, Aline, Grínia, Raquel, Tiba, Fernando “Ferdinando” Vasconcelos, Fernando Rosa e Wellington;
- Professora Marisa, que sempre acreditou em meu potencial, e com quem aprendi muito;
- FAPESP, CAPES e CNPq, pelo apoio financeiro;
- Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, pelas análises de EXAFS;
- Dra. Sílvia Eguchi, pelas análises de capacidade bacteriostática;
- Prof. César Costapinto Santana, por disponibilizar seu laboratório para as análises de FTIR-ATR e Difusão de Íons;
- Todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a execução deste trabalho.

Este trabalho contém descobertas científicas que se encontram em processo de patenteamento. A exploração do conhecimento apresentado aqui deve ser realizada com a anuência dos autores.

RESUMO

Estudos envolvendo membranas têm atraído muito interesse nos últimos anos, uma vez que, além da aplicação clássica em processos de separação, estas têm sido usadas também em áreas como medicina, microeletrônica, tratamento de água, etc. À medida que o número de aplicações cresce, a necessidade de criação de estruturas elaboradas também aumenta. Neste contexto, este trabalho realizou a adaptação da técnica “layer-by-layer” de produção de membranas multicamadas, porém visando a produção de membranas com espessuras de ordem micrométricas. Foi realizada, também, a subseqüente incorporação de íons cobre a estas membranas. Caracterizações morfológicas, químicas e cristalinas, além de testes de difusão de íons e avaliação de capacidade bacteriostática das membranas foram realizados. As análises químicas mostraram a interação entre as cadeias de quitosana e alginato, garantindo a estabilidade dimensional da membrana. Foi possível observar também mudanças na cristalinidade das membranas, que se tornaram mais amorfas após a incorporação de íons cobre em sua estrutura. Análises de EXAFS mostraram que estes átomos se ligam preferencialmente aos átomos de oxigênio e nitrogênio constituintes dos grupos funcionais de alginato e quitosana, respectivamente. Além disso, a incorporação de cobre às membranas causou mudanças notáveis na difusividade destas, tornando a difusão de cloreto de sódio mais lenta do que nas membranas sem cobre. A capacidade bacteriostática foi sensivelmente influenciada pela presença do metal nas membranas: as amostras com cobre, independente de sua composição, proporcionaram inibição do crescimento bacteriano, tanto para *E. coli* quanto para *S. aureus,* ao passo que as amostras sem cobre não apresentaram capacidade bacteriostática. Esses resultados mostram potencial aplicabilidade destas membranas em situações onde este tipo de capacidade é requerida.

Palavras-chave: Quitosana, Alginato, Cobre, Membranas

ABSTRACT

Study of membranes has attracted much interest in recent years due to their applicability in areas such as medicine, microelectronics, water treatment, etc. rather than in traditional separation processes. As the application range arises, the need for establishing more elaborated structures also increases. In this context, the present study adapts the layer-by-layer technique for production of micro-scale multilayer membranes. Subsequent incorporation of copper ions is performed n these membranes. Morphological, chemical and crystalline characterizations, besides ion diffusion tests and evaluation of bacteriostatic ability were performed. The chemical analysis showed the interaction between the chains of chitosan and alginate, ensuring the dimensional stability of the membrane. Changes in crystallinity of membranes were also observed, as they became amorphous after the incorporation of copper ions in its structure. EXAFS analysis indicated that these atoms are linked preferentially to oxygen and nitrogen atoms, constituents of alginate and chitosan functional groups, respectively. Moreover, the amount of copper to the membrane caused remarkable changes in its diffusivity, reducing its value in comparison to membranes without copper. The bacteriostatic capacity was significantly influenced by the presence of metal in membranes: the samples with copper, regardless of its composition, provided inhibition of bacterial growth, both for *E. coli* and for *S. aureus*, while the untreated control samples showed no bacteriostatic capacity. These results show the potential of using these membranes in applications where this kind of capacity is required.

Keywords: Chitosan, Alginate, Copper, Membranes

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO.....1

CAPÍTULO 2

OBJETIVOS.....4

CAPÍTULO 3

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 5

3.1. MEMBRANAS 5

3.2. MÉTODO *layer-by-layer* DE PRODUÇÃO DE MEMBRANAS MULTICAMADAS 7

3.3. QUITOSANA 9

3.4. ALGINATO 12

3.5. ASPECTOS GERAIS DO COBRE (PROCOBRE, 2007) 14

CAPÍTULO 4

MATERIAIS E MÉTODOS 19

4.1. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO DE QUITOSANA 19

4.2. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO DE ALGINATO 19

4.3. PREPARAÇÃO DAS MEMBRANAS.....20

4.3.1. MEMBRANA DE QUITOSANA.....20

4.3.2. MEMBRANA DE ALGINATO.....20

4.3.3. MEMBRANA COMPOSTA 20

4.4. INCORPORAÇÃO DE COBRE ÀS MEMBRANAS 22

4.5. CARACTERIZAÇÃO DAS MEMBRANAS 22

4.5.1. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) 23

4.5.2. ESPECTROSCOPIA DE ENERGIA DISPERSIVA DE RAIOS-X (EDX) 23

4.5.3. DIFRAÇÃO DE RAIOS-X (XRD) 23

4.5.4. ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR) 24

4.5.5. ESTRUTURA FINA ESTENDIDA DE ABSORÇÃO DE RAIOS-X (EXAFS) (Mazali, 1998) 25

4.5.6. DIFUSÃO DE ÍONS 30

4.6. AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE BACTERIOSTÁTICA 33

CAPÍTULO 5

RESULTADOS E DISCUSSÃO 35

5.1. PREPARAÇÃO DAS MEMBRANAS 35

5.2. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA 37

5.3. ESPECTROSCOPIA DE ENERGIA DISPERSIVA DE RAIOS-X (EDX) 38

5.4. DIFRAÇÃO DE RAIOS-X 41

5.5. ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER 45

5.6. ESTRUTURA FINA ESTENDIDA DE ABSORÇÃO DE RAIOS-X (EXAFS) 49

5.7. DIFUSÃO DE ÍONS 53

5.8. AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE BACTERIOSTÁTICA 57

CAPÍTULO 6

DISCUSSÃO GERAL 62

6.1. PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DAS MEMBRANAS 62

6.2. ANÁLISE ESTRUTURAL 64

6.3. APLICABILIDADE 66

CAPÍTULO 7

CONCLUSÕES 69

CAPÍTULO 8

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS 71

CAPÍTULO 9

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 72

ANEXO 1 - Fotografias dos resultados dos testes de avaliação bacteriostática. 77

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

O estudo envolvendo membranas tem atraído interesse nos últimos tempos, já que além da aplicação clássica em processos de separação de misturas, estas têm sido utilizadas também em outras áreas, como, por exemplo, medicina (Cárdenas, 2008), microeletrônica, tratamento de água, sensores eletrônicos, etc. (Joly, 2000). Ao mesmo tempo em que as aplicações envolvendo membranas se tornam mais numerosas, cresce a necessidade de criação de estruturas que atendam a demandas específicas, sem perda de funcionalidade.

Nesse contexto surgem técnicas como, por exemplo, o método *"layer-by-layer"* de obtenção de membranas multicamadas (Decher, 2002). Este método apresenta vantagens como nenhum outro, principalmente na sua simplicidade e baixo custo operacional. A desvantagem é que este ainda é um método que produz em escala extremamente reduzida, da ordem de nanômetros, podendo apresentar complexidade para adaptação de produção em grande escala.

É exatamente neste ponto que o presente trabalho se insere, ao propor um método de obtenção de membranas multicamadas, adaptado do método *"layer-by-layer",* mas com o intuito de trabalhar na escala micrométrica, para sistemas onde o refinamento nanométrico do método *"layer-by-layer"* não seja requerido. Além disso, a proposta é produzir membranas de maior dimensão, maior espessura, e conseqüentemente, de maior facilidade ao manuseio e de uso nas análises que forem pertinentes.

Trata-se de um método que tem a característica de ser completamente adaptável, com a capacidade de atender aos mais diferentes requisitos, bastando para isso, mudar o conjunto de polímeros que são utilizados para a produção da

membrana. Vale ressaltar que além de polímeros, também podem ser utilizados outros materiais, como proteínas, micropartículas, compostos inorgânicos, etc.

Neste trabalho, além da possibilidade de se obter membranas multicamadas através de uma forma adaptada do método *"layer-by-layer",* será estudada a capacidade de se obter estas membranas usando-se biopolímeros, tais como a quitosana e o alginato. Ambos têm se mostrado interessantes sob vários pontos de vista, com propriedades que os tornam capazes de substituir alguns polímeros derivados de petróleo, e também para outras aplicações. Ambos são provenientes de fontes renováveis e abundantes e, além disso, são biodegradáveis. Sabemos também, de estudos anteriores, que os dois polímeros possuem propriedades químicas, físicas e biológicas que os potencializam como matéria-prima para várias aplicações, desde biomédicas até em alimentos (Kurita, 2006).

Sabe-se, por exemplo, que quitosana e alginato têm capacidade de interagir com íons metálicos, apresentando boa capacidade de adsorção destes (Rinaudo, 2008). Isto faz com que possam ser utilizados, por exemplo, em processos de tratamento de efluentes, retirando estes íons de uma corrente de água que eventualmente será devolvida à natureza; ou para um pré-tratamento de água que será fornecida para os moradores de uma cidade, através da rede pública.

Propomos, no presente trabalho, a utilização de quitosana e alginato para obtenção de membranas organizadas em camadas, visando obter uma estrutura final com características mais interessantes do que aquelas encontradas isoladamente em cada um dos materiais. Adicionalmente, podemos também nos beneficiar de características sinérgicas que possam surgir da associação dos polímeros e da forma como a membrana é construída.

Também procedemos com a incorporação de cobre a essas membranas, com o intuito de podermos caracterizar sua funcionalidade quanto à capacidade de inibir a proliferação de microorganismos, aproveitando-se da boa interação dos polímeros com este metal. Sabemos que uma propriedade do cobre que o torna importante é a sua capacidade bacteriostática, podendo ser utilizado em situações

onde não se deseja a proliferação de bactérias ou outros agentes patogênicos (PROCOBRE, 2007).

Os resultados deste trabalho proporcionam um melhor entendimento de como os biopolímeros quitosana e alginato podem ser utilizados sob a forma de membranas, servindo como alternativa a polímeros sintéticos, não biodegradáveis e derivados de petróleo. Além disso, foi possível entender como o cobre se ligou a estes polímeros, e quais as conseqüências, do ponto de vista estrutural e biológico, de sua adição nas membranas. Com estas informações podemos prever algumas potenciais aplicações para as membranas multicamadas de quitosana e alginato, organizadas em camadas, contendo cobre.

Outro ponto interessante e que deve ser considerado é que o estudo a respeito desta forma de obtenção de membranas pode ser replicada para qualquer outra aplicação e para qualquer conjunto de matérias primas, sejam polímeros, aminoácidos, etc., e também com o nível de complexidade desejado, com um, dois ou mais componentes.

CAPÍTULO 2

OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho são:

- Desenvolvimento do método de obtenção de membranas multicamadas;
- Realização de ensaios de incorporação de íons cobre às membranas multicamadas produzidas;
- Caracterização das membranas obtidas através de:
    - Caracterização química;
    - Caracterização estrutural;
    - Testes de difusão de íons;
    - Avaliação de capacidade bacteriostática.
- Análise do potencial do método de obtenção de membranas através dos resultados obtidos;

CAPÍTULO 3

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. MEMBRANAS

De uma forma simplificada, membrana é uma barreira seletiva entre duas fases, onde o termo “seletiva” é inerente a uma membrana ou a um processo que utilize membranas. É importante notar que esta é uma definição macroscópica, enquanto que uma separação deve considerar também, e principalmente, o ambiente microscópico. Esta definição também não aborda os aspectos de funcionalidade e estrutura da membrana (Mulder, 1991).

A fim de se obter uma definição mais informativa a respeito das membranas, podemos classificá-las de acordo com vários critérios: espessura, estrutura, propriedades de transporte, carga elétrica. Levando em consideração a natureza das membranas, podemos dividi-las em dois grupos com estruturas completamente distintas, podendo ser biológicas ou sintéticas. Dentro de cada um destes grupos, pode-se utilizar as mais variadas e convenientes divisões. Quando falamos de membranas sintéticas, podemos classificá-las como orgânicas (poliméricas ou líquidas) ou inorgânicas, por exemplo (Mulder, 1991).

Considerando-se as membranas sintéticas, os mais variados compostos podem ser utilizados para a produção destas, desde cerâmicas até polímeros naturais. Além disso, existem várias formas de se produzir estas membranas, dependendo-se principalmente das características da matéria-prima, e da finalidade para a qual a membrana será empregada.

As membranas são utilizadas em várias áreas, tais como aplicação em células de combustível (Wan, 2006), tratamento de água potável, remoção de

metais pesados de águas residuais e processos de separação de misturas azeotrópicas, entre outras. Na maioria dos casos, os processos envolvendo membranas servem como alternativa a outras técnicas. Estas aplicações têm em comum o fato de explorar características específicas do polímero que eventualmente formará a membrana.

Quando mais de um polímero é utilizado para produzir a membrana, podemos refinar as características que interessam para a finalidade escolhida, através das interações químicas e físicas entre as cadeias poliméricas. As características das soluções que passarão pela membrana também são importantes, no que diz respeito à polaridade.

Devido à maior atenção ultimamente dispensada às causas ambientais, e a uma provável escassez de petróleo no futuro, o número de estudos envolvendo membranas compostas por polímeros naturais tem aumentado. Nesta linha de associação de dois polímeros naturais para produção de uma membrana, estudos produzindo membranas compostas por uma blenda de biopolímeros (quitosana e amido de milho, por exemplo) foram conduzidos (Xu, 2004). Estas membranas foram caracterizadas por FTIR e DRX, e foi possível notar que houve uma forte interação, tanto no que diz respeito a ligações químicas quanto a características conformacionais (aumentando-se a quantidade de amido na mistura, maior o caráter amorfo da membrana) entre os dois polímeros. Testes de permeação de vapor também foram realizados e notou-se que quanto maior a relação amido/quitosana, menor o fluxo através da membrana.

Quitosana e alginato estão entre os biopolímeros utilizados para a produção de membranas compostas, para a realização de experimentos de pervaporação (Moon, 1999). As membranas foram submetidas à reticulação, e esta etapa se mostrou uma boa alternativa para promover a adesão das duas camadas de polímeros, e conseqüentemente para proporcionar um fluxo de solução satisfatório através da membrana.

Uma boa parte dos estudos de separação de misturas tem o seu foco voltado para misturas de água e álcoois por (pervaporação), e a capacidade de

separação de misturas por membranas compostas por quitosana e alginato, preparadas sobre um substrato de polímero sintético, foi analisada (Kim, 2007). As análises realizadas mostraram que a seletividade e permeabilidade da membrana dependem das características (tamanho da molécula, polaridade e superfície hidrofílica) das moléculas da solução a ser permeada. Foram realizados ensaios com soluções aquosas e puras de metanol, propanol, isopropanol e terc-butil-álcool, e no caso do metanol, o comportamento foi diferente, devido aos diferentes tamanhos de cada molécula. Este trabalho é interessante por mostrar através de simulação molecular as interações entre as moléculas de quitosana e alginato, e desta forma, explicar as diferenças no desempenho da membrana com diferentes soluções.

Alguns estudos, além de utilizar polímeros naturais tentam também combinar estes polímeros com outros polímeros sintéticos, a fim de obter uma membrana com alta performance, estabilidade e fluxo de solução. A combinação de quitosana e PTFE modificado, para utilização em ensaios de desidratação de uma solução aquosa de isopropanol, é um exemplo (Liu, 2007). Do PTFE obtém-se boa resistência térmica e mecânica, enquanto que da quitosana temos o bom fluxo de permeado. O resultado é uma membrana com grande fluxo de solução e boa seletividade, sendo assim adequada para separação de misturas azeotrópicas.

3.2. MÉTODO *layer-by-layer* DE PRODUÇÃO DE MEMBRANAS MULTICAMADAS

Nos últimos anos, vários estudos têm desenvolvido a técnica *layer-by-layer*, como um método simples e versátil para produção de membranas multicamadas (Decher, 2002). Os filmes orgânicos produzidos a partir desta técnica têm potencial aplicação em áreas tais como sensores, coberturas redutoras de atrito, ótica, fabricação de dispositivos eletrônicos.

O processo básico envolve a imersão de um substrato, preferencialmente carregado eletricamente, em uma solução diluída de um polieletrólito de carga oposta. A interação eletrostática entre o substrato e o polieletrólito promoverá a adsorção e a carga da superfície do substrato será invertida. O substrato, agora com carga negativa, é lavado para a retirada do excesso de polieletrólito e mergulhado em outra solução de polieletrólito, com carga oposta à primeira solução. Assim, a carga inicial do substrato é restabelecida, e tem-se a formação de um filme com duas camadas de polieletrólitos sobre a superfície do mesmo. A repetição desta seqüência de processos de adsorção de polieletrólitos leva à formação de uma membrana multicamadas. A figura 3.3.1 ilustra o método *layer-by-layer*.

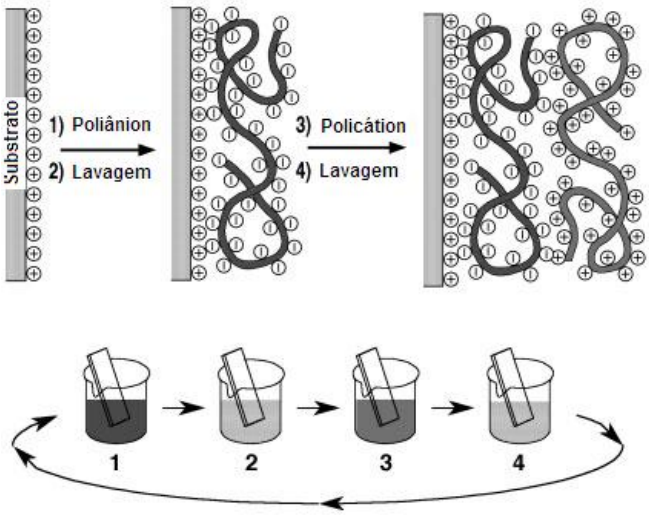

Figura 3.2.1. Método *layer-by-layer* de produção de membranas multicamadas (figura adaptada de Decher, 2002).

Este processo de construção de membranas multicamadas tem várias vantagens sobre outros métodos: é baseado em adsorção espontânea, o substrato pode ter, a princípio, qualquer tamanho, forma, topografia ou topologia, e não é necessário controle estequiométrico para manter-se a funcionalidade da membrana, uma vez que os defeitos não se propagam de uma camada para outra. Além disso, é um método extremamente simples, relativamente rápido,

ambientalmente limpo, barato, e a funcionalidade da superfície pode ser controlada diretamente, ao se escolher os polieletrólitos apropriados (Chen, 1997).

3.3. QUITOSANA

A quitosana é a forma desacetilada da quitina, o segundo polímero natural mais abundante na natureza, depois da celulose, sendo que ambos possuem estrutura molecular muito semelhante (Chu, 2002). Suas cadeias são basicamente iguais, com uma diferença no grupo funcional ligado ao carbono 2: enquanto que na celulose temos um grupo hidroxila, na quitina temos um grupo acetamido ligado a esse átomo de carbono (Kurita, 2006).

Quitina (poli(N-acetil-D-glucosamina)) é encontrada principalmente no reino animal, como um composto de proteção e estrutural, constituinte de exoesqueletos. Apesar da grande quantidade disponível, e de ser encontrada principalmente em invertebrados, a quitina é uma substância sem notáveis aplicações biológicas.

A opção encontrada para a utilização da grande quantidade de quitina disponível é a sua transformação em quitosana, através de desacetilação. Neste processo, utiliza-se uma solução 50% (w/w) de hidróxido de sódio e temperatura, que pode variar de 120 a 150 ^{o}C. Com esse processo, consegue-se um grau de desacetilação de 5 a 30%. Repetindo-se o processo é possível chegar maiores graus de desacetilação (Kurita, 2006). A figura 3.3.1 mostra as cadeias de celulose, quitina e quitosana.

A produção de quitina e quitosana atualmente baseia-se em cascas de caranguejo e camarão que, por sua vez, são descartadas por empresas de pescados, localizadas principalmente nos Estados Unidos e Japão. Além destes países, outros, como Noruega, Chile e México, por terem uma forte indústria pesqueira, podem ser considerados potenciais fornecedores de material-prima para a produção de quitosana. Para a produção de 1kg de quitosana, com grau de

desacetilação de 70%, a partir de cascas de caranguejo, são necessárias 6,3kg de ácido clorídrico, 1,8kg de hidróxido de sódio, 0,5t de água para o processo e 0,9t de água de resfriamento (Kumar, 2000).

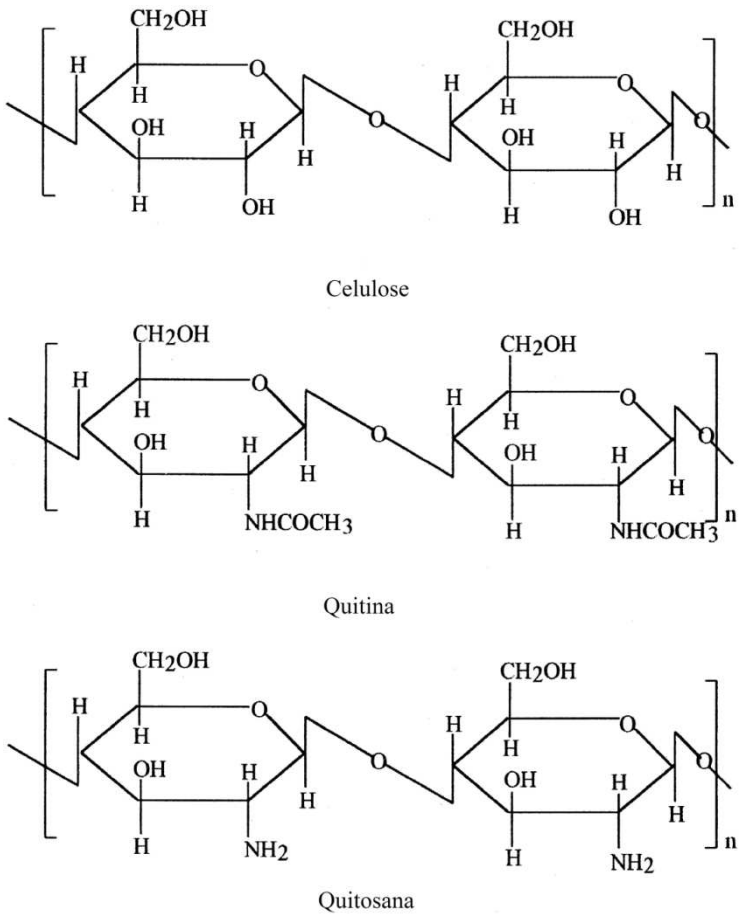

Figura 3.3.1: Estrutura molecular das cadeias de celulose, quitina e quitosana.

A quitosana tem como propriedades principais a não-toxicidade, boa capacidade de formação de filmes e fibras, adsorção de íons metálicos, entre outras. Além disso, tem a vantagem de ser um material natural, biodegradável e não poluente. Assim, a quitosana tem sido largamente estudada para aplicação nos mais diversos fins: purificação de água, processamento de alimentos, quelação de íons metálicos, agente de liberação controlada de fármacos, membranas semipermeáveis, produtos cosméticos e farmacêuticos (Kumar, 2000).

Na área biomédica, a propriedade antibacteriana da quitosana tem sido utilizada para inibição do crescimento de certas colônias de bactérias, entre elas *E. coli* e *S. aureus* (Qi, 2004). Testes foram realizados com nanopartículas de quitosana pura, e também com cobre adsorvido, e os resultados mostraram que a quitosana, com ou sem cobre, é uma ótima substância quando se deseja inibir o crescimento de bactérias. Tal característica pode ser útil, por exemplo, para se evitar rejeição quando é realizada uma cirurgia de transplante de órgãos.

A quitosana também tem sido utilizada na área de liberação controlada de fármacos (Mladenovska, 2007), onde se é necessário liberar tal substância a uma taxa controlada, e também em local específico. Neste estudo, a quitosana foi utilizada em associação com o alginato, onde foram produzidas micropartículas através de *spray-drying*, e as análises realizadas mostraram que a interação entre a quitosana e o fármaco é eletrostática, dessa forma, não modificando a estrutura do mesmo. Ainda foi possível concluir que as micropartículas produzidas tinham grande tendência a adesão à mucosa intestinal, que é justamente onde se deseja liberar o fármaco.

Atualmente, a maioria das embalagens de alimentos disponíveis no mercado é feita de polímeros sintéticos, derivados do petróleo. Esses polímeros não são biodegradáveis, contribuindo assim para a poluição e aumento de lixo no meio ambiente. A biodegradabilidade da quitosana faz com que esta possa ser utilizada também nesta área, como uma alternativa para produção de embalagens biodegradáveis (Srinivasa, 2007).

Além disso, a quitosana também pode ser utilizada sob a forma de filmes finos, que aplicados sobre a superfície do alimento, aumenta o tempo de validade do mesmo, antes que ocorra oxidação (escurecimento). Ela pode funcionar também como agente clarificante e deacidificante de frutas e bebidas, controlador de texturas, estabilizante de coloração, prolongador de sabor, entre outras aplicações (Shahidi, 1999).

Uma propriedade notável da quitosana é ser um ótimo agente quelante e de sorção de íons de metais pesados. Isso faz com que a quitosana possa ser

utilizada no tratamento de água, removendo íons metálicos, tais como cobre, zinco e mercúrio, entre outros (Kaminski, 2008).

A quitosana também é utilizada para a adsorção de moléculas maiores, como por exemplo, corantes utilizados na indústria têxtil (Wong, 2008). Nesse caso, nota-se que a capacidade de adsorção das moléculas pela quitosana está relacionada à heterogeneidade dos grupos funcionais ligados à cadeia principal e, portanto, ao grau de desacetilação. Ao se aumentar o grau de desacetilação, o desempenho da quitosana diminui, uma vez que a uniformidade dos grupos ligados à cadeia principal aumenta (maior quantidade de grupos amino).

3.4. ALGINATO

O alginato é um polissacarídeo encontrado em grandes proporções em algas marrons, principalmente dos gêneros *Macrocystis*, *Laminaria* e *Ascophyllum*. É parte constituinte das paredes celulares e do material intracelular destas, em geral associado a íons metálicos como cálcio, magnésio, estrôncio e bário (Dimitriu, 2005).

Quimicamente, o alginato é um copolímero formado por ácido β-D-manurônico e α-L-gulurônico. A proporção dos dois ácidos na cadeia polimérica é variável e pode depender da espécie da qual se extrai o alginato, e até mesmo do local e da época em que o alginato foi extraído. A figura 3.4.1 mostra a estrutura química dos dois ácidos que compõem uma molécula de alginato.

Praticamente todo o alginato produzido hoje é extraído de algas da natureza, pois o cultivo dessas espécies é muito caro e impediria que o alginato fosse utilizado na indústria, devido ao alto preço do produto final. Aproximadamente 40.000 toneladas de alginato são produzidas por ano.

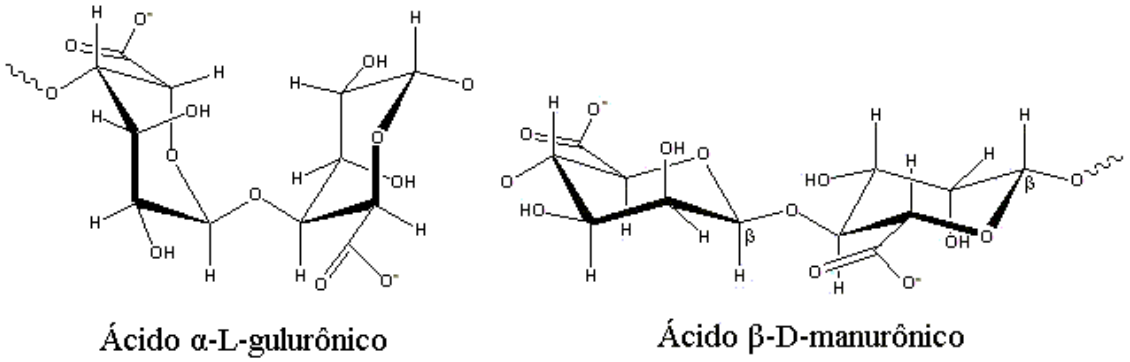

Figura 3.4.1: Representação das moléculas dos ácidos que compõem o alginato.

O processo de produção do alginato começa com o processamento das algas, e subseqüente reação com carbonato de sódio. O meio reacional é filtrado e cloreto de sódio ou de cálcio é adicionado ao líquido resultante, formando-se assim, fibras de alginato de sódio ou cálcio, que precipitam. Após várias etapas de purificação, o sal de alginato está pronto para uso (Rinaudo, 2008).

As características químicas e físicas do alginato variam muito de acordo com a proporção entre os dois ácidos que o constituem, influenciando, por exemplo, em sua resistência mecânica e na tendência de formar filmes (Rinaudo, 2008). Independente de sua composição, a propriedade mais importante do alginato é a sua capacidade de formação de gel, quando em contato com íons metálicos divalentes. Nesse caso, sua interação com estes íons se dá devido ao ácido α-L-gulurônico (Phillips, 2000).

O gel de alginato tem como propriedade interessante ter sua formação independente de temperatura, e isso faz com que o alginato possa ser utilizado na maioria das vezes sob a forma de gel. No entanto, uma parte significativa das aplicações do alginato o utiliza na forma líquida, seja como aditivo para tintas, ou em alimentos onde a viscosidade e a estabilização de misturas, dispersões e emulsões precisem ser melhoradas. Recentemente, descobriu-se que a molécula de alginato, com toda sua variedade de composição química e peso molecular, tem diferentes efeitos em sistemas biológicos e proporciona diferentes

propriedades em fase líquida, função da proporção entre os seus dois ácidos componentes (Phillips, 2000).

Dentre as aplicações na área médica, o alginato tem sido utilizado na liberação controlada de fármacos, como, por exemplo, nifedipina (Ramesh Babu, 2007). Primeiramente, são produzidas microesferas de alginato, reticuladas com glutaraldeído. Em seguida, o fármaco é incorporado à microesfera. Os resultados mostraram que o fármaco se dispersou de forma uniforme na microesfera, e estas permaneceram até 12 horas no organismo, liberando a nifedipina de forma controlada.

Na mesma área, o alginato tem sido utilizado também, como proteção para ferimentos. São produzidas fibras com os sais de alginato e essas são aplicadas sobre o ferimento, ajudando na cicatrização e protegendo contra contaminações. Neste caso, as fibras também podem conter fármacos incorporados à sua estrutura (Qin, 2008).

Outra área onde o alginato é utilizado de forma extensa é no campo alimentício. O alginato apresenta propriedades que possibilitam sua utilização como estabilizante, espessante e emulsificante, nos mais variados alimentos: cerveja, sorvete, derivados de leite, pães, massas, etc. (Brownlee, 2005).

3.5. ASPECTOS GERAIS DO COBRE (PROCOBRE, 2007)

O cobre é um material puro e natural. Segundo os historiadores, foi o primeiro metal utilizado pelo homem, e seu descobrimento se dá por volta de 13.000 AC., quando foi encontrado em sua forma pura. Posteriormente veio a substituir a pedra como ferramenta de trabalho, e em sua evolução foi utilizado em armas, objetos de decoração e utensílios domésticos. Descobriram-se objetos feitos em cobre na China, datadas por volta de 6.500 AC; e nas regiões situadas entre o rio Tigre e Eufrates, no Oriente Médio. Seu uso se torna constante pelos

séculos seguintes, marcando presença na evolução tecnológica do homem. As propriedades físicas e químicas do cobre e seus derivados, como o bronze e o latão, pela sua durabilidade e alta resistência à corrosão, os tornaram de significativa utilidade e funcionalidade. O uso do cobre se intensificou na Idade Média, Revolução Industrial, Idade Moderna, até os dias atuais. Sua real contribuição para o desenvolvimento industrial se processou a partir de 1831, quando Faraday descobriu o gerador elétrico. Mas já durante o século XIV, a Inglaterra, como maior produtora de cobre, motivou a abertura de novas minas, o que posteriormente ocorreu também nos EUA, Chile, África do Sul, Canadá e Brasil (Bahia).

O cobre não é magnético e pode ser utilizado puro ou em ligas com outros metais que lhe conferem excelentes propriedades químicas e físicas. Pode ser utilizado nas mais variadas áreas, desde biologia, meio ambiente, energia, metalurgia, entre outras.

O cobre, por exemplo, pode ser utilizado como agente sanificador, garantindo a higiene, devido às suas propriedades antimicrobianas, funcionando como agente estático com uma eficácia ou taxa dependente das condições do ambiente, a concentração de íons de cobre e o tipo de microorganismos. De fato, muitas espécies de bactérias indesejáveis, mofo, algas e fungos são desativados, e outros têm uma taxa de 0% de sobrevivência. Esta propriedade apóia o uso de cobre como superfície higiênica.

A literatura científica cita a eficácia do cobre para inativar muitos tipos de micróbios entre os quais se incluem:

a) fungos: *Actinomucor elegans, Aspergillus níger, Penicillium chrysogenum, Rhizopus niveus*;

b) bactérias: *Campylobacter jejuni, Proteus, Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Streptococcus* grupo D, e *Pseudomonas aeruginosa. Bacterium linens, Bacillus megaterium, Bacillus subtilis, Brevibacterium erythrogenes, Achromobacter fischeri, Photobacterium phosphoreum*;

c) leveduras: *Candida utilis, Candida albicans, Saccharomyces mandshuricus, Saccharomyces cerevisiae, Torulopsis utilis;*

d) vírus: poliovírus, rotavírus.

Durante os últimos anos, os estudos de eficácia antimicrobiana em diferentes superfícies de contato demonstraram claramente que o cobre e certas ligas de cobre deixam inativos vários dos tipos mais potentes de micróbios. Os mecanismos antimicrobianos do cobre são complexos e ocorrem em diferentes formas, tanto dentro das células quanto nos espaços intersticiais entre as mesmas. Um fator crítico responsável pelas propriedades antimicrobianas do cobre é a capacidade deste metal de aceitar ou doar facilmente seus elétrons devido à sua alta oxidação catalítica e alto potencial de redução. Isto faz com que os íons de cobre alterem as proteínas dentro das células dos micróbios para que as estas já não possam realizar suas funções normais. Os cientistas também observaram que o cobre é responsável por inibir o transporte eletrônico nas interações da parede celular, ligando o DNA e desordenando as estruturas helicoidais.

Sob condições específicas, o cobre pode eliminar micróbios ou evitar seu crescimento adicional. Sua eficácia e taxa de inatividade microbiana dependem da temperatura, da umidade, da concentração de íons de cobre e do tipo de microorganismo com o qual está em contato. Sob condições ótimas, quando estiveram em contato com o cobre, obtiveram-se taxas de sobrevida de 0% em alguns micróbios.

Em conseqüência do anterior, o cobre é um ingrediente ativo em diferentes tipos de produtos antimicrobianos. Na agricultura, o sulfato de cobre, o cobre-8-quinolato, o octoato de cobre, o óxido de nanocobre e o arsenato de cobre amoniacal são usados para combater fungos em lavouras e no tratamento de produtos têxteis e madeiras. Nos ambientes marinhos, as pinturas baseadas em cobre e o revestimento de cobre nos barcos têm potentes propriedades antiincrustações.

Para os consumidores, o cobre é um ingrediente ativo em enxágües bucais, creme dental e medicamentos. Estudos experimentais extensivos realizados durante os últimos anos confirmaram que o cobre e certas ligas de cobre deixam os micróbios patogênicos inativos ao contato, tanto a temperatura ambiente quanto a temperaturas de esfriamento.

Nos edifícios modernos de hoje, a preocupação da exposição a microorganismos tóxicos criou uma grande necessidade de se melhorar as condições higiênicas dos sistemas de ar condicionado, ventilação e aquecimento, os quais se acreditam que são causadores de mais de 60% das enfermidades nos edifícios (por exemplo, demonstrou-se que as palhetas de alumínio nos sistemas de ar condicionado, ventilação e calefação são uma fonte importante de populações microbianas).

Nas pessoas imunocomprometidas, a exposição a potentes microorganismos provenientes dos sistemas de ar condicionado, ventilação e calefação pode causar infecções severas, possivelmente causando a morte. O uso do cobre antimicrobiano em vez de materiais biologicamente inertes nos tubos do trocador de calor, nas palhetas, nos filtros e nos dutos, é um meio viável e de baixo custo, para ajudar a controlar o crescimento de bactérias e fungos que se desenvolvem nestes sistemas.

No caso dos hospitais, práticas de higiene inadequadas causaram um grande aumento na incidência de infecções durante os últimos 20 anos, apesar dos significativos avanços no entendimento de como micróbios patogênicos causam enfermidades e mortes. A habilidade intrínseca do cobre para inativar certas bactérias e o recente descobrimento de sua capacidade para inativar a bactéria MRSA (que chegou a ser a maior preocupação dos administradores de saúde em todo mundo), abre a possibilidade de que a substituição das superfícies de contato com ligas de cobre nas instalações de saúde, em conjunto com boas práticas higiênicas, possam ajudar a reduzir a incidência das infecções microbianas oriundas de superfícies poluídas.

Os exemplos de produtos sanitários que se beneficiariam das superfícies de contato de ligas de cobre higiênicas incluem as maçanetas, ferrolhos de porta, trilhos de cama, corrimão, torneiras, toalheiros, cadeiras de visita e tecidos (uniformes, lençóis, pijamas de pacientes), cabos de instrumentos, postes para infusões endovenosas, e equipamentos de exercícios e reabilitação.

CAPÍTULO 4

MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO DE QUITOSANA

Uma solução 1% em massa foi preparada pela dissolução de 5g de quitosana extraída de casca de caranguejo (adquirida da Sigma – EUA, com no mínimo 85% de desacetilação), em 495ml de solução acética 3% em massa. Os flocos foram dispersos por agitação e mantidos por uma semana a 4^{o}C para completa solubilização. A solução viscosa foi filtrada a vácuo para remoção do material insolúvel, obtendo-se um filtrado límpido e homogêneo. Esta solução foi estocada sob refrigeração (5^{o}C) em um frasco de polietileno para posterior utilização.

4.2. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO DE ALGINATO

Uma solução 1% em massa foi preparada pela dissolução de 5g de alginato de sódio (adquirido da Vetec), em 495ml de solução 0,1M de hidróxido de sódio. A mistura foi deixada em repouso por 4 dias, e após esse tempo foi agitada para homogeneização e completa solubilização. Obteve-se uma solução límpida e sem partes insolúveis, que foi estocada sob refrigeração em frasco de polietileno, para posterior utilização.

4.3. PREPARAÇÃO DAS MEMBRANAS

4.3.1. MEMBRANA DE QUITOSANA

A solução de quitosana foi espalhada sobre placas de Petri e colocadas em estufa a 50 ± 3^{o}C para evaporação do solvente, até que não mais se observasse alteração na massa de quitosana, obtendo-se assim uma película transparente e com boa resistência mecânica. Estas películas foram imersas em uma solução de NaOH 1M, a 25^{o}C, por 24h, para neutralização dos grupos amino da quitosana. Em seguida foram lavadas com água durante 10 minutos para a remoção do NaOH, e estocadas em água Milli-Q, a 5^{o}C (Beppu, 1999).

4.3.2. MEMBRANA DE ALGINATO

A solução de alginato foi espalhada sobre placas de Petri e estas colocadas em estufa a 50 ± 3^{o}C para evaporação do solvente, até que não mais se observasse alteração na massa de alginato, obtendo-se assim uma película opaca. Estas películas foram imersas em uma solução de acido sulfúrico 0,1M, em água e etanol 1:1 (v/v), a 25^{o}C, por 24h, para neutralização dos grupos hidroxila do alginato. Em seguida, foram lavadas com água para a remoção do acido sulfúrico e do etanol, e estocadas em água Milli-Q, a 5^{o}C.

4.3.3. MEMBRANA COMPOSTA

A produção da membrana composta de quitosana e alginato foi baseada no método *layer-by-layer* de produção de membranas multicamadas, com a diferença

de que neste caso cada camada de solução polimérica foi obtida por espalhamento da solução em placa de Petri, na horizontal, e não por imersão na posição vertical. Além disso, as membranas produzidas têm maiores dimensões na seção transversal (espessura e área superficial) do que aquelas produzidas pela técnica *layer-by-layer* propriamente dita.

Assim como na técnica *layer-by-layer,* a formação da membrana se deu através da interação eletrostática entre as cadeias poliméricas: a quitosana se comporta como um policátion, devido aos grupos amino, e o alginato se comporta como um poliânion, devido aos grupos hidroxila presentes (Simsek-Ege, 2003).

A produção das membranas iniciou-se com o espalhamento da solução de quitosana sobre a placa de Petri. Escolheu-se iniciar a produção da membrana com a quitosana, por sabermos, de trabalhos anteriores, que este polímero possui boa aderência ao vidro. A quantidade utilizada foi suficiente para cobrir toda a superfície da placa com uma fina película (12 ml para uma placa de 9 cm de diâmetro). Esta foi então colocada em estufa a 50^{o}C para evaporação do solvente. A secagem foi interrompida antes que a película formada se soltasse da placa, pois tal ocorrência não é desejada, uma vez que impossibilitaria a deposição satisfatória de outra camada polimérica. O controle do ponto ótimo da secagem foi feito pesando-se a placa, e identificando-se, aproximadamente, qual era o ponto ideal de interrupção da secagem.

Em seguida, espalhou-se a solução de alginato sobre a camada de quitosana seca, também em quantidade suficiente para se cobrir a placa com uma fina camada de solução (10 ml para uma placa de 9 cm de diâmetro). A placa foi novamente levada à estufa para evaporação do solvente, e da mesma forma a secagem foi interrompida antes da membrana se soltar da placa.

Após a secagem da camada de alginato temos a formação de uma bicamada (uma camada de cada polímero). Em nosso estudo foram produzidas membranas com 2 e 4 bicamadas. As membranas prontas foram colocadas em uma solução de ácido sulfúrico 0,1M, em solução água e etanol 1:1 (v/v), por 24h, para neutralização dos grupos funcionais. A membrana neutralizada foi lavada

com água para remoção de resíduos, e armazenada em água Milli-Q sob refrigeração. As quantidades subseqüentes de solução de quitosana e alginato foram de 10 ml.

4.4. INCORPORAÇÃO DE COBRE ÀS MEMBRANAS

Foi preparada uma solução de cobre 1000ppm, através da dissolução de 0,5 g de sulfato de cobre em 500 ml de água Milli-Q. Esta solução foi usada para incorporar o cobre às membranas. O processo de incorporação de cobre às membranas foi realizado através da imersão das membranas na solução de cobre, por 48 h. O cobre foi incorporado às membranas compostas, de quitosana e de alginato.

Trabalhos anteriores neste grupo de pesquisa mostraram que o cobre é um metal com grande capacidade de interação com polímeros naturais (Beppu, 2004; Vieira, 2008), cuja dessorção não ocorre facilmente com eluentes comuns. Além disso, o cobre, com o seu histórico de utilização desde tempos mais antigos (PROCOBRE, 2007), pode ser um agente bacteriostático menos nocivo à saúde humana, em comparação a outros metais utilizados para este fim, como por exemplo, sais de prata.

4.5. CARACTERIZAÇÃO DAS MEMBRANAS

As membranas obtidas foram caracterizadas por MEV (microscopia eletrônica de varredura), EDX (espectroscopia de energia dispersiva de Raios-X), DRX (difração de Raios-X), FTIR-ATR (espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier, utilizando-se o aparato de reflexão total atenuada) e EXAFS (estrutura fina estendida de absorção de Raios-X). Além destas

caracterizações, foram realizados também ensaios de difusão de íons e testes de capacidade bacteriostática.

4.5.1. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

No presente trabalho, as amostras foram congeladas com nitrogênio líquido, para a produção de criofraturas, de forma a analisarmos a seção transversal das mesmas. Após esta etapa, procedeu-se com o recobrimento com carbono. Foi utilizada, para observação, uma tensão de 20kV, e a microscopia foi realizada utilizando um microscópio *Leica*, modelo Leo440i, do Laboratório de Recursos Analíticos e de Calibração (LRAC) da FEQ/UNICAMP.

4.5.2. ESPECTROSCOPIA DE ENERGIA DISPERSIVA DE RAIOS-X (EDX)

Utilizou-se a técnica de EDX para fazer o mapeamento dos elementos cobre nas membranas produzidas, após a etapa de incorporação do cobre às mesmas. O mapeamento foi feito no Laboratório de Recursos Analíticos e de Calibração (LRAC) da FEQ/UNICAMP, no microscópio eletrônico de varredura da *Leica*, modelo Leo440i com detector de EDX da Oxford modelo 7060 (Goldstein, 1992). Os parâmetros para análise foram 20kV de tensão, para um tempo de mapeamento de 10 minutos.

4.5.3. DIFRAÇÃO DE RAIOS-X (XRD)

Para a realização das análises de difração de Raios-X foi utilizado o equipamento X-Ray Diffractometer da Rigaku, da Faculdade de Engenharia

Mecânica – FEM/UNICAMP. A análise foi feita usando-se radiação CuKα_1 = 0,1542nm, 40kV, 40mA. As varreduras foram feitas em intervalos 2θ variando de 5^o a 90^o, com uma velocidade de varredura de 0,5 grau 2θ/min.

4.5.4. ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

A absorção de radiações eletromagnéticas por parte de átomos ou moléculas exige que estas apresentem energia apropriada e que haja um mecanismo de interação que permita a transferência de energia. O mecanismo apropriado à excitação vibracional é proporcionado pela variação periódica de dipolos elétricos na molécula durante as vibrações; a transferência de energia ocorre, então, por interação destes dipolos oscilatórios com o campo elétrico oscilatório da luz (radiação infravermelha) desde que a freqüência com que ambos variam seja a mesma.

No espectro de infravermelho é habitual, ao invés de se representar absorbância como nos espectros de ultravioleta e visível, traçar a percentagem de luz transmitida em função do comprimento de onda (ou, do número de ondas por cm).

O espectro infravermelho de polímeros pode ser considerado simples levando-se em consideração o grande número de átomos envolvidos (Billmeyer, 1984). A análise vibracional de polímeros fornece informações sobre três importantes características estruturais:

- A composição química;
- A estrutura configuracional e conformacional;
- As forças interatômicas associadas às ligações de valência ou interações intermoleculares.

Devido à sua praticidade, o infravermelho é a ferramenta espectroscópica preferida na caracterização de polímeros e biopolímeros (Kroschwittz, 1985). As amostras podem ser preparadas de diversas maneiras (pastilhas, filmes, fitas, etc.). Os dados obtidos podem ser tratados com subtração, adição, análise de fatores, deconvolução espectral e podem ser usados quantitativamente (Koenig, 1979).

No presente trabalho, foram realizadas análises FTIR das membranas produzidas, com e sem cobre. Além disso, o aparato de ATR (*attenuated total reflection* – reflexão total atenuada), de cristal de germânio foi utilizado em conjunto com o espectrômetro de infravermelho da Nicolet, modelo Protegé 460. Todas as análises das membranas foram realizadas do lado que estava em contato com o ar, quando da produção das mesmas.

4.5.5. ESTRUTURA FINA ESTENDIDA DE ABSORÇÃO DE RAIOS-X (EXAFS) (Mazali, 1998)

Atualmente, a espectroscopia de absorção de raios X tem sido vastamente utilizada em diversas áreas, principalmente na química do estado sólido, na ciência dos materiais, catálise, na química bio-inorgânica, além de outras áreas que atuam em sistemas desordenados, como em vidros e líquidos.

Um espectro de absorção de raios X (XAS) fornece informações a respeito das transições eletrônicas nos níveis mais internos de um átomo, sendo que o processo básico consiste na excitação dos elétrons localizados em níveis 1s ou 2p através da absorção de raios X.

O espectro ilustrado na Figura 4.5.5.1, pode ser descrito dividindo-o em três regiões principais:

- região de pré-borda (*pre-edge*): refere-se a transições eletrônicas com absorção de energia menor que a energia de ligação, as quais ocorrem apenas quando o átomo absorvedor possui estados desocupados ou parcialmente desocupados. Tais transições têm poucas probabilidades e, portanto, produzem somente pequenas oscilações no espectro de absorção. A posição exata do pico depende de detalhes de estado de oxidação, sítio de simetria e da natureza da ligação;
- borda de absorção (*egde*): região caracterizada pelo aumento abrupto da absorção quando a energia absorvida é suficiente para retirar elétrons do átomo absorvedor;
- transições para o estado do contínuo: correspondem a absorção de energias maiores que a energia de ligação, ocorrendo transições para o estado do contínuo, não localizados no átomo absorvedor e o excesso de energia é carregado pelo fotoelétron na forma de energia cinética. Esta região é subdividida em:
    - região de XANES (*X-ray absorption near edge structure*): está compreendida na faixa de até 50 eV acima da borda de absorção, a qual apresenta variações estreitas e intensas da absorção. O espectro XANES trabalha na região onde o comprimento de onda do fotoelétron é da ordem das distâncias interatômicas e, portanto, o seu livre caminho médio é longo o suficiente para que possam ocorrer espalhamentos múltiplos antes que ele retorne ao átomo central. Dessa maneira, o espectro XANES envolve espalhamentos múltiplos e transições para níveis desocupados, sendo rico em informações cristaloquímicas do átomo absorvedor, como o estado de oxidação, a densidade de estados desocupados e a estrutura cristalina em que está inserido o átomo absorvedor.
    - região de EXAFS (*Extended X-ray absorption fine structure*): a absorção de energia ocorre na faixa de 50 a 1000 eV acima da borda de absorção e apresenta oscilações mais suaves na absorção. No espectro EXAFS estão envolvidos apenas dois átomos, um

absorvedor e outro retroespalhador, ocorrendo o chamado espalhamento simples, sendo possível obter informações a respeito da distância e do número de vizinhos ao redor do átomo central. Nesta região, o caminho livre médio do fotoelétron é curto e os espalhamentos múltiplos se tornam improváveis.

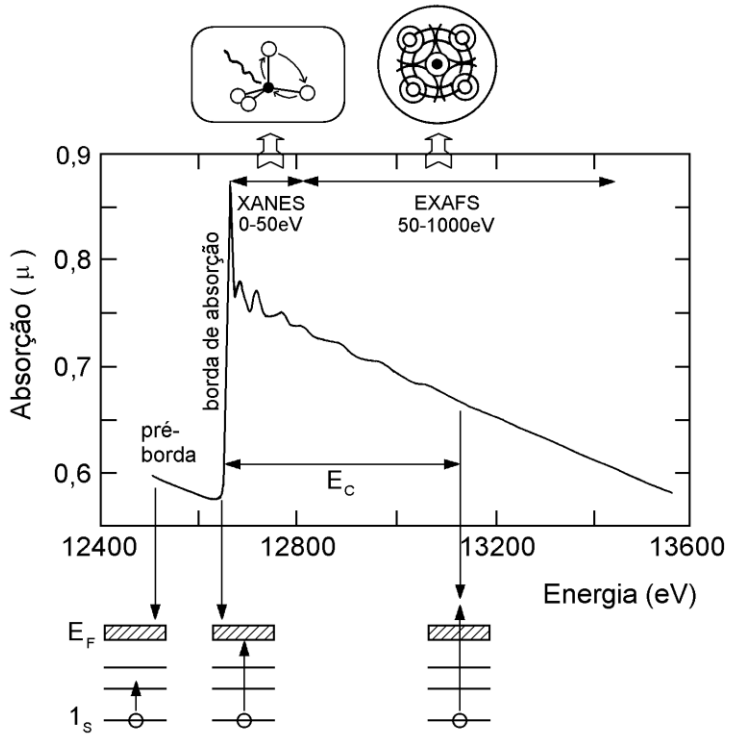

Figura 4.5.5.1: Representação esquemática do espectro de absorção de Raios-X e das transições eletrônicas que correspondem às características básicas do espectro.

Basicamente, o processo físico que envolve as oscilações de absorção na região de EXAFS é a interferência entre a onda emitida pelo átomo emissor e a onda retroespalhada pelo átomo vizinho. As modulações no coeficiente de absorção surgem ao considerarmos uma molécula diatômica AB. O fotoelétron emitido por A é suficientemente rápido para ser tratado como um elétron livre e sua função de onda pode ser considerada como uma onda quase plana. Quando atinge o potencial do átomo vizinho B, a onda é espalhada em todas as direções com uma amplitude f(α,k), a qual depende da direção e da energia cinética do elétron. A onda retroespalhada (α=π) retorna ao átomo absorvedor A com uma

diferença de fase total dada pelo caminho óptico percorrido até B (ida e volta), mais uma diferença de fase causada por atravessar duas vezes o potencial do átomo central A.

As oscilações observadas no espectro de absorção resultam da interferência (construtiva e destrutiva) entre a onda emitida e a onda retroespalhada, medida na posição do átomo emissor. As oscilações χ(k) produzidas pelas diferentes camadas atômicas em torno do átomo absorvedor somam-se para produzir o sinal total de EXAFS. De acordo com a aproximação de ondas planas, a expressão geral, válida para a excitação de estados de simetria s (isto é, borda K de absorção) e para sistemas orientados aleatoriamente no espaço, é a seguinte:

$$\chi(k) = \frac{\mu - \mu_o}{\mu_o} = -\sum_i \frac{N_i}{kR_i^2} |f_i(\pi, k)| \sin(2kR_i + \psi) * e^{-2\sigma_i^2 k^2} * e^{\frac{-2R_i}{\lambda_i(k)}}$$

Onde: μ_o - absorção do átomo absorvedor isolado;

μ - coeficiente de absorção atômico para uma energia E;

k - vetor de onda do fotoelétron, dado por: $k = \sqrt{\frac{2m}{\hbar^2} * (E - E_o)}$, sendo m a massa do elétron e h a constante de Planck. O valor E0 corresponde à origem da energia cinética do elétron, a qual é próxima da energia da borda de absorção, mas não necessariamente coincide com esse valor. E é a energia do fotoelétron incidente;

ψ - defasagem total produzida no processo de retroespalhamento: ψ = 2δ(k) + θ(k), sendo δ a defasagem devida ao átomo absorvedor e θ a defasagem devida ao átomo vizinho;

R: é a distância do átomo absorvedor ao átomo retroespalhador;

f(π,k) : amplitude do retroespalhamento;

N: número de átomos vizinhos

As oscilações χ(k) carregam informações a respeito da ordem local ao redor do átomo absorvedor, como o número de coordenação e distância aos vizinhos nas camadas mais próximas.

Podemos enumerar algumas características da espectroscopia de absorção de raios X que a tornam uma ferramenta única para estudos estruturais:

- A energia de ligação dos elétrons mais internos é característica de cada átomo e, portanto, XAS (XANES e EXAFS) é uma técnica que possui seletividade atômica, desde que se disponha de uma fonte de raios X sintonizável em energia, o que é possível com fontes de luz síncrotron;
- XAS testa apenas a estrutura na vizinhança em torno do átomo excitado, isto é, o ordenamento a curto alcance;
- É possível estudar a estrutura local em torno de átomos em uma matriz, mesmo que este se encontre em concentrações muito baixas;
- Devido ao seu caráter local, o formalismo do retroespalhamento é aplicável tanto para materiais no estado gasoso quanto para matéria condensada, esteja ela no estado líquido, vítreo ou cristalino.

A coleta de dados na espectroscopia EXAFS é realizada por dois modos principais: transmissão e fluorescência. Um dos fatores de escolha é a concentração do elemento a ser sondado na amostra e a possibilidade de se obter filmes finos. O modo de transmissão é mais utilizado para amostras concentradas enquanto a fluorescência, para amostras diluídas ou extremamente finas. O efeito de espessura é a fonte mais comum de imprecisão em medidas de EXAFS, sendo a espessura ótima em torno de 2,55mm. Um esquema da montagem de uma linha EXAFS está ilustrado na Figura 4.5.5.2.

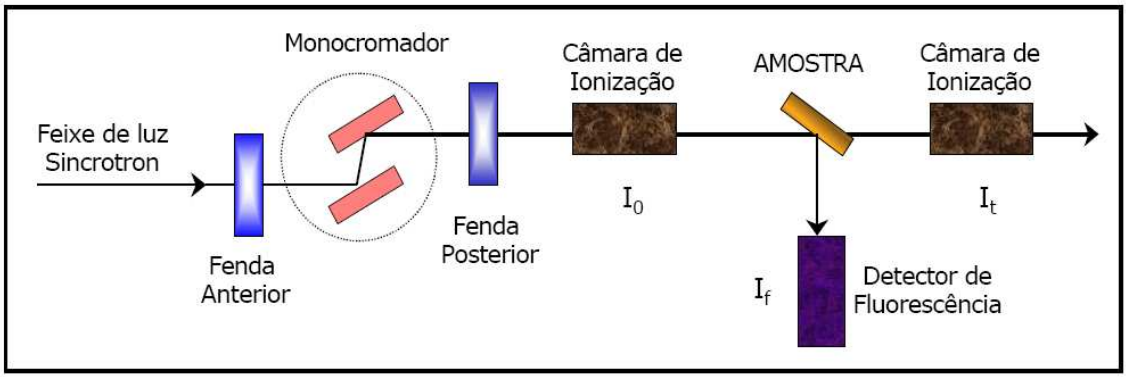

Figura 4.5.5.2: Esquema de montagem da linha de EXAFS.

Em nosso trabalho, a técnica de EXAFS foi utilizada para entendermos como o cobre se liga às cadeias poliméricas de quitosana e alginato, obtendo-se informações sobre distância de ligação, e a quais átomos da cadeia o cobre se liga. As medidas foram realizadas na linha de luz D04B - XAS do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), com as seguintes especificações técnicas: Fonte de luz: imã defletor D04B (15º), y = 0,222mm; Feixes na amostra (dimensões e fluxo): vertical : 0,5 - 1,5 mm e horizontal : 1,0 - 10,0 mm, Fluxo na amostra: 3 x 109 fótons/(s.mrad.100mA) 6 keV; Monocromador: cristal sulcado de silício Si(111) (2d = 6,271 Å): 3 000 - 12 000 eV, Si(220) (2d = 3,840 Å): 5 000 - 24 000 eV; Resolução em energia (E/_ E): 5.000 - 10.000; Detectores: câmaras de ionização, detector de elétrons em atmosfera de He, cintilador para altas contagens, detector de estado sólido Si(Li), detector de estado sólido Ge (15 elementos);

4.5.6. DIFUSÃO DE ÍONS

A fim de que fosse possível se observar diferenças entre as membranas produzidas, com e sem cobre, foram realizados ensaios de difusão de íons. Para tanto, utilizou-se uma célula de difusão (Figura 4.5.6.1), acoplada a um sistema que consistia em uma bomba peristáltica e um medidor de condutividade (Figura

4.5.6.2). A difusão de íons pode ser medida através da medida da concentração destes nos dois compartimentos da célula em função do tempo, sendo que entre os dois compartimentos coloca-se a membrana, a qual se deseja medir a difusividade.

Para tanto, foi feita uma curva de calibração de condutividade *versus* concentração para cada solução salina usada. Utilizamos a bomba peristáltica, e o condutivímetro e o software da BioRad Biologic Controller e Workstation para medir a condutividade da solução no compartimento onde se injetava água ultrapura Millli-Q®, A quantidade de sal no outro compartimento era então calculada a partir de um balanço de massa, desprezando-se a membrana como fase participante do equilíbrio iônico .

Os termos geométricos da célula podem ser agrupados em uma constante β denominada “constante da célula”:

$$\beta = A * \left(\frac{1}{V1} + \frac{1}{V2}\right)$$

Onde: A – área de transferência;

V1, V2 – volume de solução em cada um dos compartimentos.

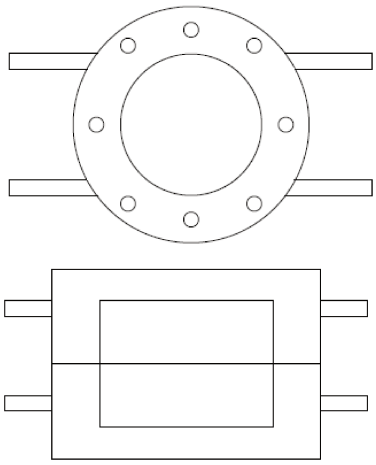

Figura 4.5.6.1. Esquema da célula de difusão.

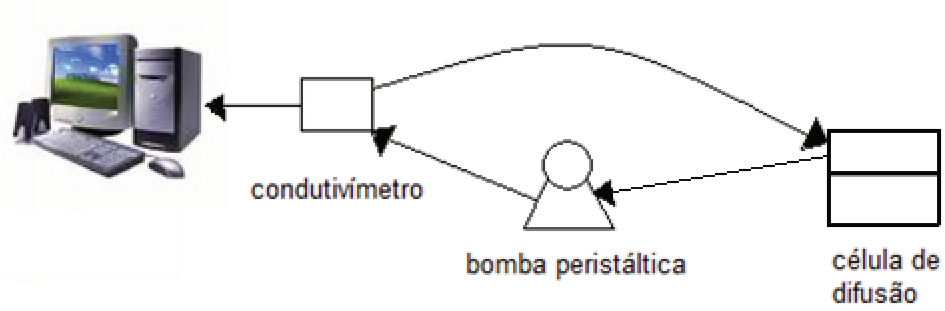

Figura 4.5.6.2. Montagem do sistema de difusão de íons.

Através do balanço de massa e da equação de Fick, chega-se à equação que relaciona as concentrações iniciais e finais em relação ao tempo:

$$\ln\left(\frac{C_f^1 - C_f^2}{C_o^1 - C_o^2}\right) = -\frac{\beta}{L} Dt$$

Onde: C – concentração final ou inicial nos compartimentos;

L – espessura da membrana;

D – coeficiente de difusão;

t – tempo de difusão;

β – constante da célula.

Através das equações acima, torna-se possível obter D para cada membrana. O experimento foi realizado com cloreto de sódio 1M, para cada um dos tipos de membranas obtidas. De trabalhos anteriores neste grupo de pesquisa, sabemos que o cobre incorporado às membranas não possui tendência de ser liberado para a solução salina (Beppu, 2004; Vieira, 2008). Assim, o experimento de difusão de íons não corre, a princípio, o risco de ter os seus

resultados influenciados pela liberação de cobre, anteriormente incorporado à membrana, para a solução salina.

4.6. AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE BACTERIOSTÁTICA

Grande quantidade de técnicas de laboratório têm sido usadas para medir a susceptibilidade de uma bactéria a agentes antimicrobianos. Estas incluem difusão em disco e diluição em ágar, entre outras.

Testes de susceptibilidade são indicados em dois casos: o primeiro, quando a vulnerabilidade de uma bactéria a um determinado agente não é conhecida, mais freqüentemente quando esta bactéria é de uma espécie capaz de possuir mecanismos de resistência, produzindo substâncias que inativam os agentes antimicrobianos, por exemplo.

O segundo caso se dá quando se deseja testar um novo produto, a fim de se avaliar sua capacidade antimicrobiana. Ao pesquisar a atividade antimicrobiana de um produto desconhecido, o ensaio é geralmente realizado em 3 etapas: 1) atividade inibitória; 2) determinação de MIC (Concentração Inibitória Mínima) e CMM (Concentração Microbicida Mínima); e 3) *Time-Kill* (determinação de Valor D, teste de redução decimal ou curva de morte microbiana) (Block, 2001).

A atividade inibitória, que é o primeiro ensaio realizado, é medida pela capacidade do produto em inibir o crescimento microbiano. Para os produtos sólidos, é utilizada a técnica do halo de inibição, e em produtos líquidos miscíveis em água, é utilizada a técnica da diluição seriada em tubos, denominada MIC. Esta metodologia é seguida pelas Farmacopéias (Americana, Brasileira, Européia, etc.) e pelo NCCLS (2003), sendo utilizada para a avaliação de antibióticos e produtos que controlam o crescimento microbiano.

Produtos sólidos, em gel, ou insolúveis em água são avaliados pela técnica de halo de inibição, que pode ser realizada sobre corpos de prova ou em poços em ágar, sendo o método atestado pelo INCQS Fiocruz.

O segundo método permite determinar o tempo de contato e redução decimal, e é conhecido como Teste em Suspensão, Teste de Redução Decimal ou *Time-Kill Test* (Block, 2001).

Para o presente trabalho, foram preparadas amostras com as membranas de quitosana, alginato e composta, com e sem cobre. Utilizando a técnica do halo de concentração inibitória, conforme preconizado pelo INCQS (1988), as amostras foram caracterizadas quanto à atividade antimicrobiana. A ausência de crescimento sobre o corpo de prova indica presença de atividade inibitória. A formação de halos de inibição indica que o agente antimicrobiano pode migrar através do meio de cultura, inibindo o crescimento microbiano nesta região.

As amostras foram depositadas sobre meio solidificado, inoculado com os microrganismos teste. A incubação das placas foi realizada a 32^{o}C por 48 horas. Foram utilizados um representante das bactérias Gram-Negativas (*Escherichia coli*) e outro representante das bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus*).

CAPÍTULO 5

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. PREPARAÇÃO DAS MEMBRANAS

Neste trabalho foram produzidos 4 tipos diferentes de membranas:

- Membrana de quitosana;
- Membrana de alginato;
- Membrana com 2 bicamadas quitosana-alginato;
- Membrana com 4 bicamadas quitosana-alginato.

Todas as membranas foram produzidas seguindo-se o mesmo procedimento, de evaporação do solvente (*casting*), seguida por uma etapa de neutralização, conforme já descrito anteriormente.

Tanto a membrana de quitosana quanto a membrana de alginato foram produzidas utilizando-se o mesmo volume inicial de solução polimérica. As membranas de quitosana, após a etapa de neutralização se mostraram resistentes do ponto de vista mecânico, podendo ser manuseadas sem problemas. As membranas de alginato, antes da neutralização, se apresentavam quebradiças, de forma que não era possível retirá-las da placa de Petri. Após a neutralização, a membrana de alginato se mostrou estável, insolúvel em água, mas com uma resistência mecânica baixa.

Também é interessante notar que apesar do volume de solução utilizado ser o mesmo, com a mesma concentração, a espessura das membranas resultantes foi diferente. As membranas de quitosana apresentaram espessura de 0,1 ± 0,01 mm, e as membranas de alginato, espessura de 0,07 ± 0,01 mm.

As membranas compostas foram produzidas de acordo com o que já foi descrito anteriormente. A criticidade na produção destas membranas está na determinação do ponto ótimo de secagem, quando a deposição de uma nova camada polimérica será promovida. Não é desejado que a camada polimérica anterior à deposição esteja completamente seca, uma vez que este fato provocará deformação na membrana e o desprendimento da placa de Petri. Assim, a determinação do ponto ótimo foi feita através de controle do peso da placa com solução polimérica. Este controle garantiu que a quantidade de solvente evaporada fosse a ideal, para que nova camada de solução polimérica pudesse ser adicionada, sem causar deformações ou perda da membrana.

A quantidade de solução polimérica utilizada para cada camada foi igual para cada polímero, mas variou entre a primeira bicamada e as demais. Na primeira camada de quitosana foi preciso utilizar um volume 20% maior de solução.

Tal fato pode ser explicado, já que a primeira camada é colocada diretamente sobre a placa e a interação entre o polímero do qual a placa é feita e a solução polimérica (no caso, a quitosana) deve ser menor do que a interação entre os polímeros quitosana e alginato. Essa interação está relacionada às cargas disponíveis em cada um dos polímeros, já que a quitosana tem disponibilidade de cargas positivas, e o alginato tem disponibilidade de cargas negativas, nas soluções em seus pH`s utilizados (Simsek-Ege, 2003).

A deposição de camadas consecutivas, umas sobre as outras, proporciona a formação de uma membrana espessa e rígida, com grande resistência mecânica. Após a neutralização, a membrana se torna mais maleável, mas sua resistência mecânica permaneceu inalterada. A membrana de 2 bicamadas apresentou espessura de 0,23 ± 0,01 mm, enquanto que a de 4 bicamadas apresentou espessura de 0,37 ± 0,01 mm. Tais medidas foram obtidas através do cálculo da média aritmética de cinco medidas realizadas em pontos diferentes de cada amostra, úmida, utilizando-se um micrômetro Mitutoyo, série 103.

Cada membrana se comportou de forma diferente, após a incorporação de cobre: as membranas de quitosana ficaram menos flexíveis., enquanto que as membranas de alginato apresentaram um aumento na resistência mecânica ao manuseio. A espessura de todas as membranas (incluindo as multicamadas), diminuiu com a incorporação do cobre.

5.2. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

A morfologia das membranas produzidas, com ou sem incorporação de cobre, pode ser analisada por microscopia eletrônica de varredura. Foram realizadas micrografias das superfícies e também de criofraturas produzidas nas membranas. A superfície das membranas não forneceu nenhuma informação relevante, ao contrário das superfícies de fraturas.

As membranas de quitosana com e sem cobre, não apresentaram diferenças que pudessem ser observadas por MEV. No caso das membranas de alginato, as micrografias mostram que a membrana com cobre possui morfologia diferente daquela sem o metal. Observa-se uma grande quantidade de poros formados na superfície da membrana, após a adição de cobre (Figura 5.2.1). A formação destes poros se dá devido ao rearranjo das cadeias de alginato, ao entrar em contato e interagir com os átomos de cobre. Este comportamento do alginato quando em contato com íons divalentes é conhecido como efeito *"egg-box"* (Phillips, 2000).

Observou-se também a formação das membranas compostas, com camadas bem definidas de quitosana e alginato, tanto para a membrana com duas ou quatro bicamadas. Além disso, pode-se observar também, que mesmo sendo utilizado o mesmo volume de polímero para cada camada da membrana composta, a espessura das mesmas é diferente, dependendo do polímero. As camadas de quitosana são mais espessas que as camadas de alginato (Figura

5.2.2), por causa da diferença de densidade entre as soluções; a solução de quitosana tem densidade maior do que a solução de alginato.

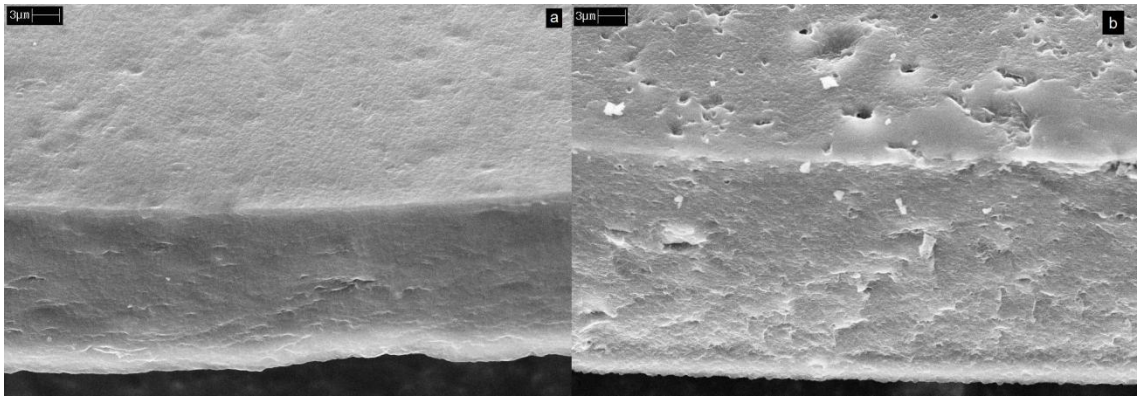

Figura 5.2.1. Micrografia da superfície e superfície de fratura da membrana de alginato sem cobre (a) e com cobre (b).

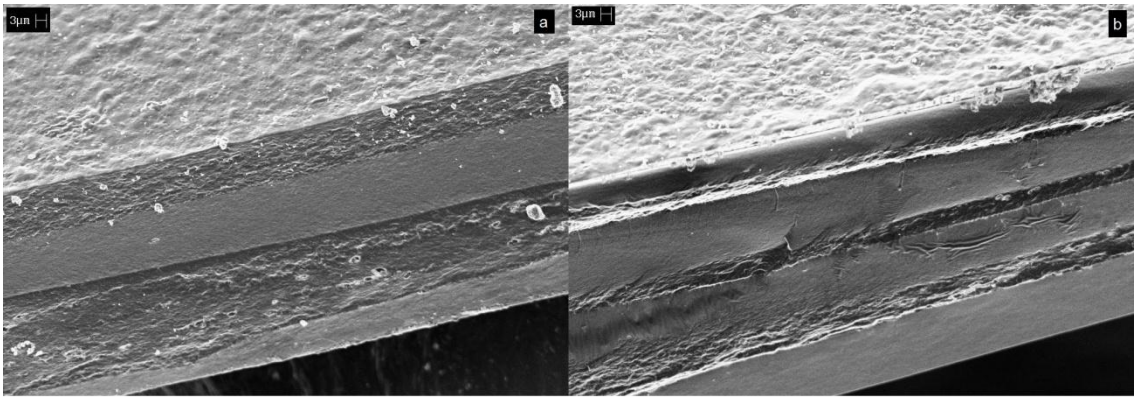

Figura 5.2.2. Micrografia da superfície de fratura da membrana de 2 bicamadas (a) e 4 bicamadas (b) de quitosana e alginato.

5.3. ESPECTROSCOPIA DE ENERGIA DISPERSIVA DE RAIOS-X (EDX)

Utilizando-se a técnica de EDX, foi possível fazer um mapeamento dos íons de cobre adsorvidos às membranas, tanto na superfície quanto em suas seções transversais. Inicialmente, utilizando a microscopia eletrônica de varredura, foram obtidas as imagens, e com o analisador de Raios-X, pôde-se mostrar como os íons estão distribuídos, no campo correspondente. As figuras 5.3.1 (a), (b) e 5.3.2 (a), (b) mostram a micrografia obtida utilizando-se detector de elétrons secundários e o mapeamento utilizando Raios-X, em quitosana e alginato, respectivamente. Pode–se observar que a distribuição do cobre em ambas as membranas é uniforme.

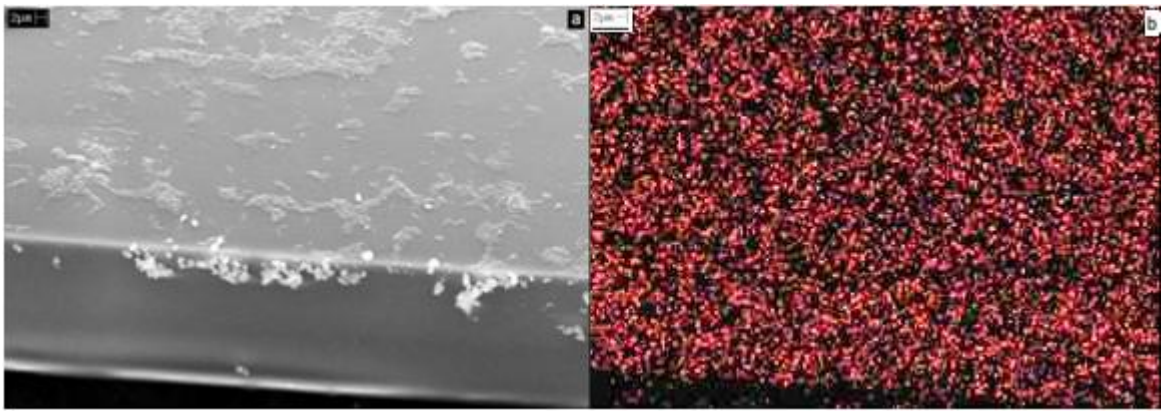

Figura 5.3.1. Micrografia da superfície da membrana de quitosana (a) e mapeamento de íons cobre correspondente (b).

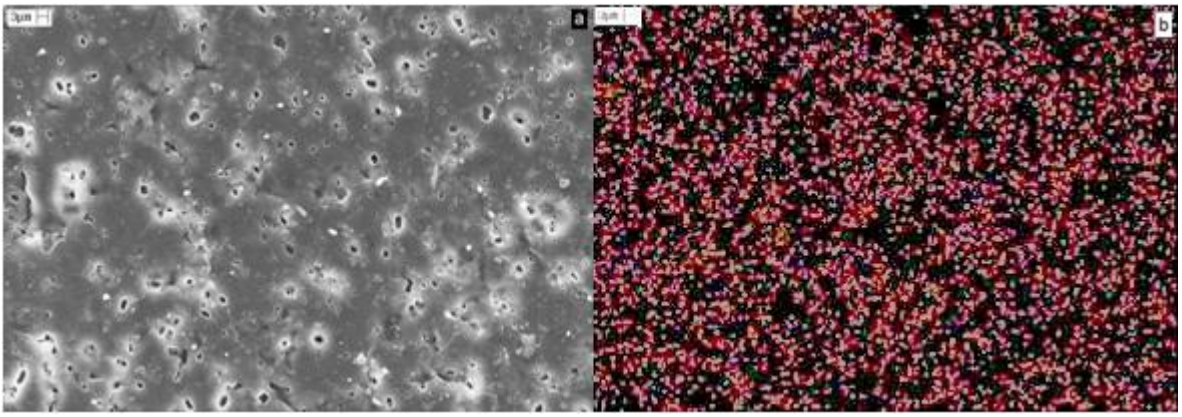

Figura 5.3.2. Micrografia da superfície da membrana de alginato (a) e mapeamento de íons cobre correspondente (b).

As figuras 5.3.3 (a), (b) e 5.3.4 (a), (b) mostram a micrografia obtida e o mapeamento para as membranas de 2 e 4 bicamadas, respectivamente. Observou-se que no caso das membranas compostas, o cobre se encontra em maior quantidade nas camadas de alginato. Comparando-se com este, a quitosana apresenta uma quantidade de cobre bem menor.

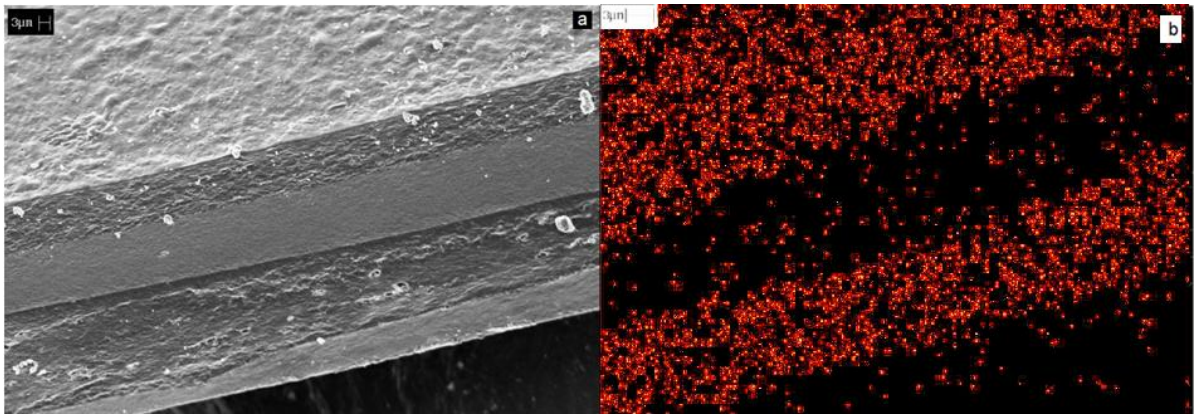

Figura 5.3.3. Micrografia da superfície de fratura da membrana de 2 bicamadas (a) e mapeamento de íons cobre correspondente (b).

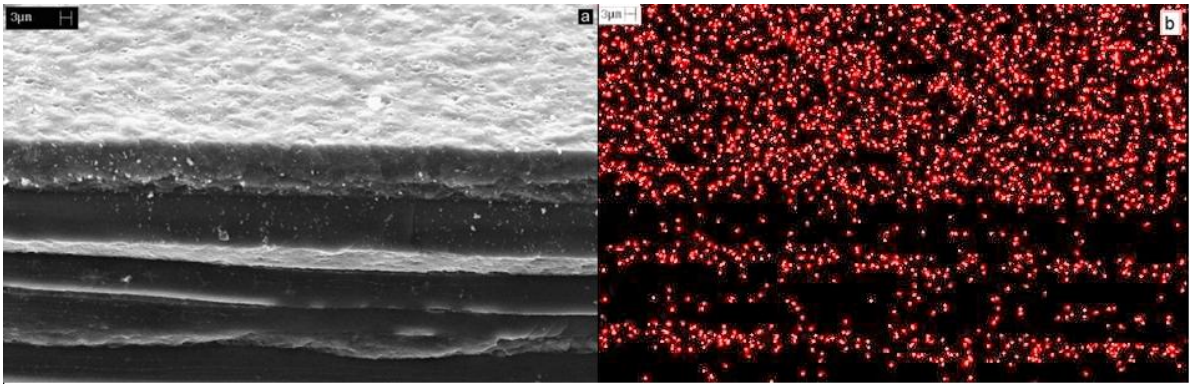

Figura 5.3.4. Micrografia da superfície da fratura da membrana de 4 bicamadas (a) e mapeamento de íons cobre correspondente (b).

5.4. DIFRAÇÃO DE RAIOS-X

A caracterização por difração de Raios-X foi realizada para todas as membranas, com e sem cobre. Em geral, polímeros possuem caráter predominantemente amorfo, e desta forma não é esperado que seus difratogramas sejam semelhantes a de outros compostos cristalinos e inorgânicos, com picos bem definidos.

No entanto, a análise de DRX das membranas produzidas mostra a presença de halos, seja na amostras com ou sem cobre. Por exemplo, nas membranas de quitosana sem cobre, pode-se identificar halos principais localizados em 2θ = 11° e 20°, e halos menores em 2θ = 32° e 44°. Na membrana sem cobre, estes halos desaparecem, e os dois primeiros estão presentes novamente, porém com intensidade bem menor (Figura 5.4.1).

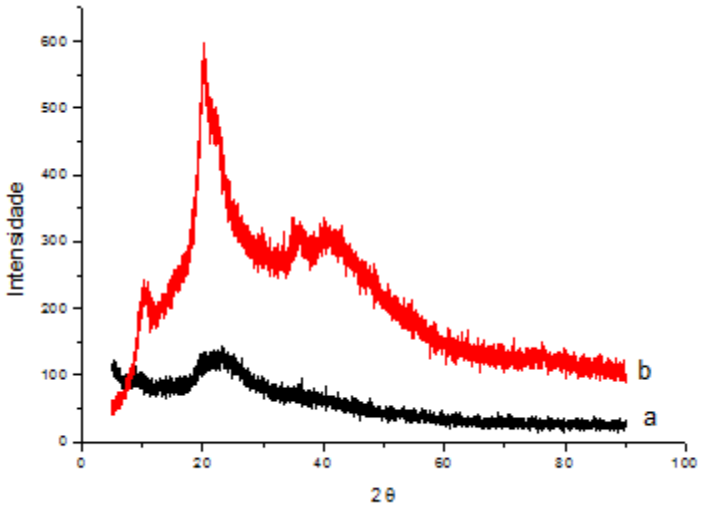

Figura 5.4.1. Difratograma da membrana de quitosana com (a) e sem cobre (b).

Na membrana de alginato sem cobre, temos presença de halos em 2θ = 15º, 21º e 39º. Na membrana com cobre, os halos continuam presentes, mas ocorre uma diminuição significativa na intensidade destes picos (Figura 5.4.2).

Nas membranas compostas, o mesmo comportamento observado nas membranas de quitosana e alginato se repetiu. Na membrana de 2 bicamadas sem cobre, há a presença de halos em 2θ = 11º, 15º, 19º, 24º e 36º, enquanto que na membrana com cobre, os mesmos halos estão presentes, mas com intensidades bem menores, de forma que o pico em 2θ = 11º se torna imperceptível (Figura 5.4.3). Na membrana com 4 bicamadas, sem cobre, notamos halos em 2θ = 13º, 20º e 28º, e na membrana com cobre, os halos citados ocorrem com menor intensidade (Figura 5.4.4). As distâncias interplanares, em angstrom (Å), relativas aos halos encontrados em cada membrana estão na tabela 5.4.1. Estas distâncias foram calculadas pela equação de Bragg (nλ=2dsenθ, onde d é a distância interplanar, λ é o comprimento de onda do feixe de Raios-X, igual a 1,54 Å).

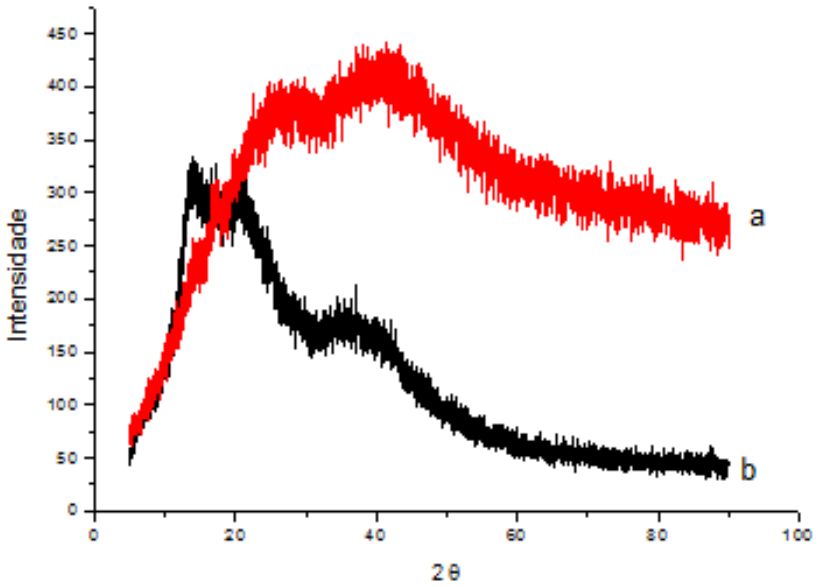

Figura 5.4.2. Difratograma da membrana de alginato com (a) e sem cobre (b).

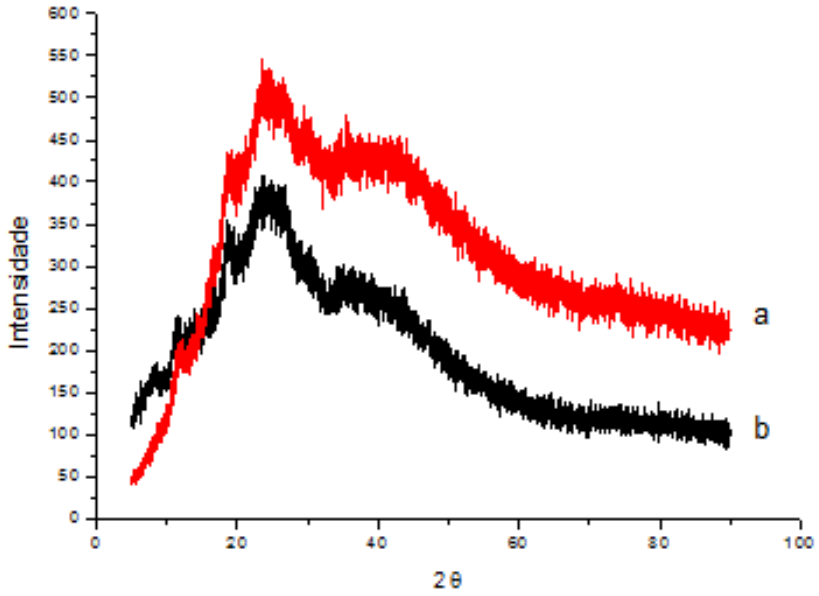

Figura 5.4.3. Difratograma da membrana de 2 bicamadas quitosana-alginato com (a) e sem cobre (b).

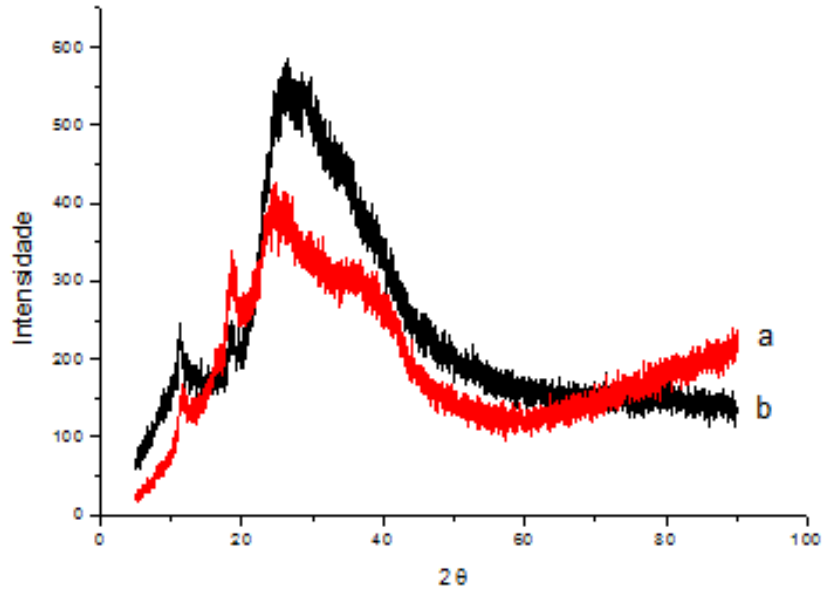

Figura 5.4.4. Difratograma da membrana de 4 bicamadas quitosana-alginato com (a) e sem cobre (b).

Tabela 5.4.1. Distâncias interplanares relacionadas aos halos cristalinos das membranas

QUITOSANA				ALGINATO			
SEM COBRE		COM COBRE		SEM COBRE		COM COBRE	
2θ	d (Å)	2θ	d (Å)	2θ	d (Å)	2θ	d (Å)
11	8,04	11	8,04	15	5,90	15	5,90
20	4,43	20	4,43	21	4,23	21	4,23
32	2,79			39	2,31	39	2,31
44	2,06						

2 BICAMADAS				4 BICAMADAS			
SEM COBRE		COM COBRE		SEM COBRE		COM COBRE	
2θ	d (Å)	2θ	d (Å)	2θ	d (Å)	2θ	d (Å)
11	8,04	15	5,90	13	6,80	13	6,80
15	5,90	19	4,67	20	4,43	20	4,43
19	4,67	24		28	3,18	28	3,18
24	3,70	36					
36	2,50						

Em todas as membranas, a adição de cobre fez a intensidade dos halos diminuir, mas não proporciona a formação de novos halos. Isto mostra que a incorporação de cobre diminui o caráter cristalino das amostras, provavelmente localizando-se entre as cadeias poliméricas, ligando-se aos grupos funcionais da quitosana e do alginato, e assim provocando maior desordem entre as cadeias dos polímeros. Vale ressaltar ainda que não podemos falar de cristalinidade nas amostras tendo por base análises de outros materiais reconhecidamente cristalinos, já que polímeros são predominantemente possuidores de caráter amorfo.

5.5. ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER

A conformação molecular das membranas foi estudada através de espectroscopia de infravermelho. Os espectros podem ser observados nas figuras abaixo. Na membrana de quitosana sem cobre (Figura 5.5.1), foi possível identificar os picos característicos, como as vibrações relativas à amida, amina, ligações C-N (Nosal, 2005). Os picos mais representativos estão relacionados na tabela 5.5.1. A membrana de quitosana com cobre apresentou os mesmos picos, exceto aquele localizado na faixa de 1050-1150 cm^{-1}. Este pico está relacionado às vibrações da ligação C-N, e sua ausência na membrana com cobre nos dá uma idéia de que o metal se liga preferencialmente aos átomos de nitrogênio da cadeia de quitosana. Os demais picos estão presentes, mas com intensidade menor.

Na membrana de alginato também foi possível identificar picos característicos, relacionados à sua estrutura molecular (Tabela 5.5.2) (Lawrie, 2007). Da mesma forma que na quitosana, os picos presentes na amostra de alginato com cobre são basicamente os mesmos, mas com uma intensidade menor (Figura 5.5.2).

O mesmo acontece com as membranas compostas (2 e 4 bicamadas), onde os picos presentes nas amostras com e sem cobre são os mesmos (Tabela 5.5.3), porém com menor intensidade naquelas que contém o metal (Figuras 5.5.3 e 5.5.4). Nas membranas compostas, temos também, com intensidade baixa, picos em aproximadamente 1415 cm^{-1}, que estão relacionados à interação entre os grupos amino da quitosana e os grupos carboxila do alginato (Charoenthai, 2007).

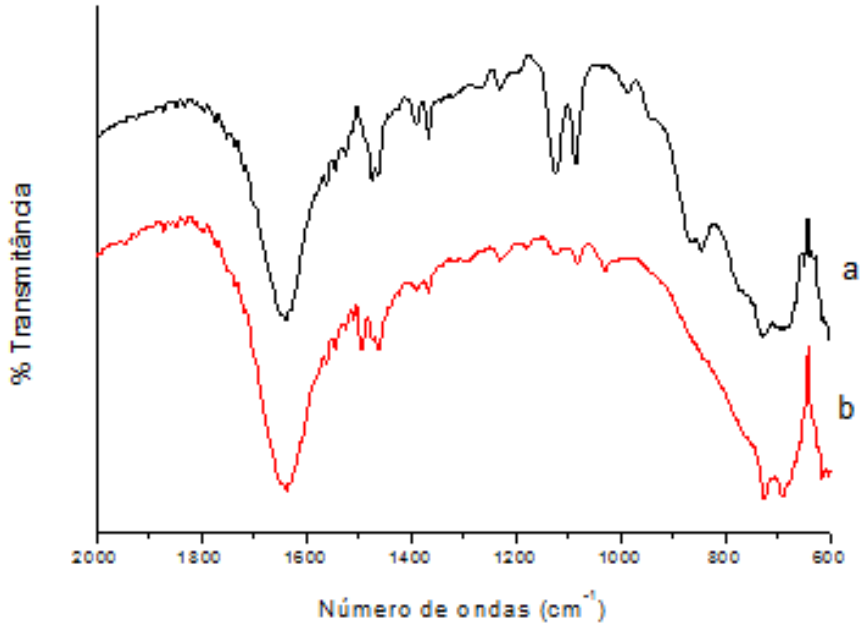

Figura 5.5.1. Espectro de infravermelho da membrana de quitosana com (a) e sem cobre (b).

Tabela 5.5.1. Principais picos da quitosana.

Posição (cm^{-1})	Ligação
1650	Vibração C-N-H
1500	Deformação C-N
1450	Vibração CH_2
1375	Deformação CH_3
1200	C-N
1150	C-O
1100	C-O

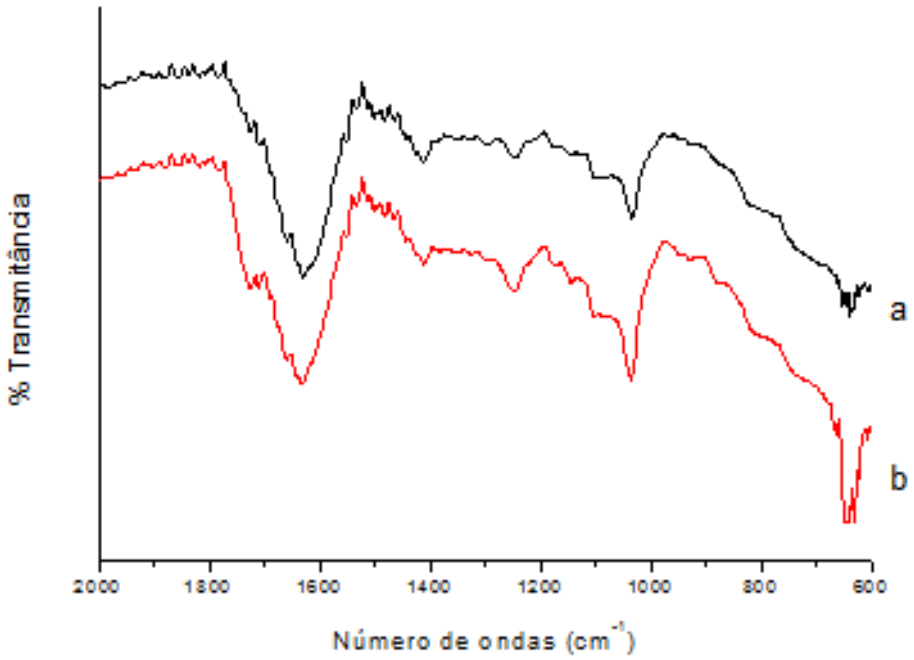

Figura 5.5.2. Espectro de infravermelho da membrana de alginato com (a) e sem cobre (b).

Tabela 5.5.2. Principais picos do alginato.

Posição (cm^{-1})	Ligação
1750	Estiramento C=O
1650	Estiramento COO^- assimétrico
1400	Estiramento COO^- simétrico
1200 – 1250	Estiramento C-O
1100	Estiramento C-C
1050	O-H

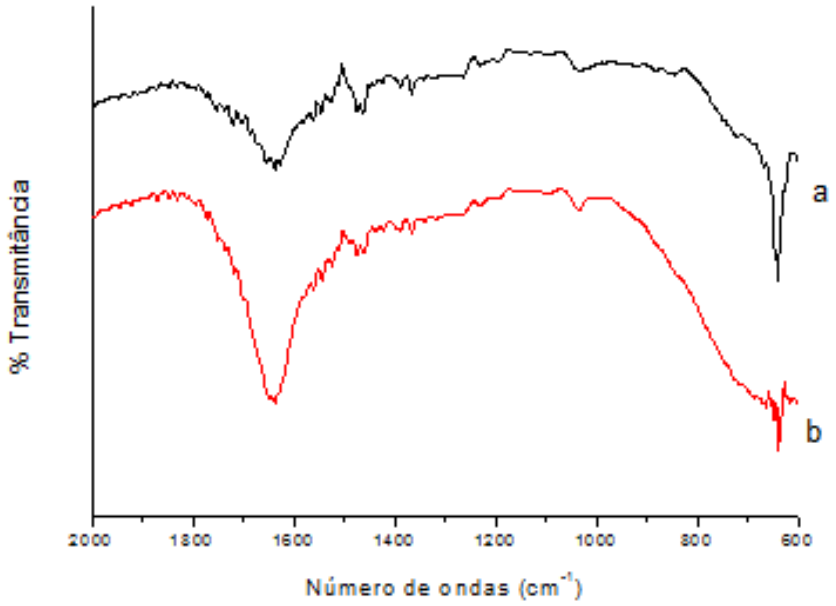

Figura 5.5.3. Espectro de infravermelho da membrana de 2 bicamadas quitosana-alginato com (a) e sem cobre (b).

Tabela 5.5.3. Principais picos da membrana de 2 e 4 bicamadas quitosana-alginato.

Posição (cm^{-1})	Ligação
1650	Sobreposição : Estiramento C=O/ Vibração amida C-N-H
1475	Vibração CH_2
1415	Interação amina (quitosana)/carboxila (alginato)
1375	Deformação CH_3 simétrica
1240	Estiramento C-O
1060	Estiramento O-H

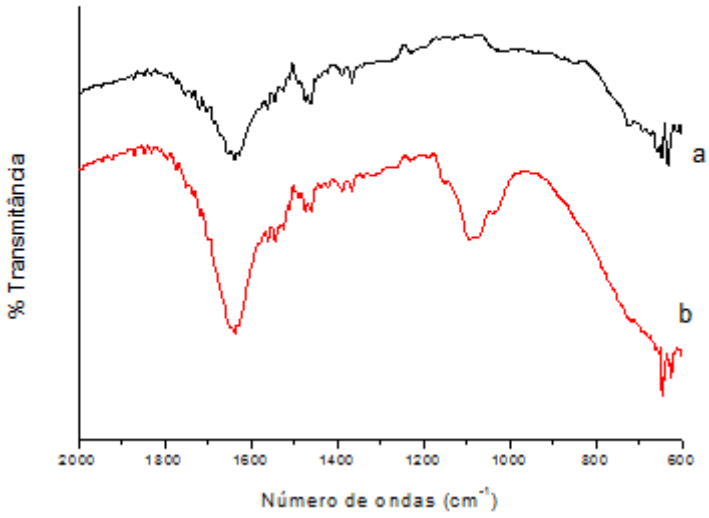

Figura 5.5.4. Espectro de infravermelho da membrana de 4 bicamadas quitosana-alginato com (a) e sem cobre (b).

Em todas as amostras, a adição de cobre à membrana acarretou na diminuição das intensidades das vibrações relativas aos picos característicos de cada um dos polímeros. Isso se deve, pois o cobre, ao ser incorporado à membrana, interage de forma eletrostática com os grupos característicos (em especial –OH e –NH), provocando uma substancial reorganização das freqüências vibracionais. Desta forma, o cobre cria novas interações entre as cadeias, como se fosse uma reticulação (Qi, 2004).

5.6. ESTRUTURA FINA ESTENDIDA DE ABSORÇÃO DE RAIOS-X (EXAFS)

A análise de EXAFS foi realizada fazendo-se medidas em triplicata, e o tratamento dos dados começou com o cálculo da média das triplicatas. Estas médias dos espectros de absorção brutos, μ(E), sem nenhum tipo de ajuste das

medidas (espaço (k)) e as funções de distribuição radial (FDR), para cada tipo de membrana, são mostrados nas figura 5.6.1.

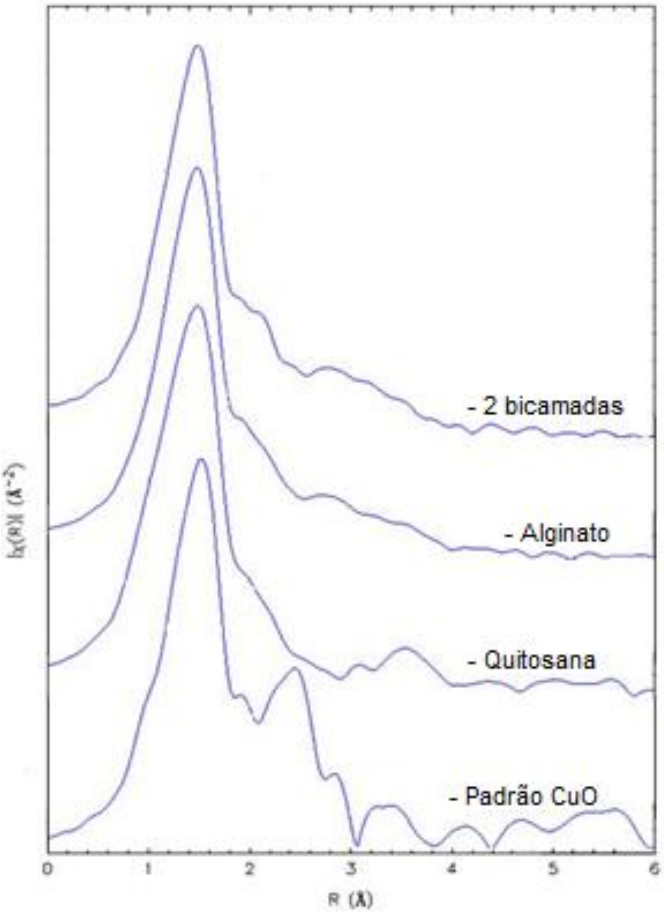

Figura 5.6.1. Função de distribuição radial (FDR) para as membranas com cobre e padrão CuO.

A absorção teórica da borda K do metal Cu ocorre à energia de 8970 eV. Os valores experimentais para as bordas de absorção, representados pelos picos ou saltos nos espectros de absorção foram 8986,96; 8989,99; 8982,26 eV, para as membranas de alginato, composta e de quitosana, respectivamente (Figura 5.6.2). O tratamento inicial dos dados obtidos foi feito com o software ATHENA, do pacote IFFEFIT. A análise dos resultados de EXAFS é baseada em comparação com compostos padrões, e neste estudo foi utilizado o óxido de cobre como padrão.

Fazendo a análise dos sinais obtidos, e comparando-se com o padrão, no gráfico de FDR (Figura 5.6.1) podemos notar picos em distâncias de 1,9; 2,1 e 2,2 Å, sendo que estes se repetem para os três tipos de membranas analisadas. Utilizando o software ARTEMIS para a comparação dos dados com o padrão, podemos notar que o cobre se liga preferencialmente aos átomos de oxigênio das cadeias poliméricas, uma vez que todas as ligações identificadas nas membranas são do tipo Cu-O. A menor distância de R refere-se à primeira esfera de coordenação (distância de ligação de 1,9 Å), enquanto que as outras duas distâncias são da segunda esfera de coordenação (distâncias de ligação de 2,1-2,2 Å). Na função de distribuição radial do Óxido de Cobre, notamos picos mais definidos nas posições R entre 2 e 2,5 Å. Isso se deve ao fato de este ser um composto inorgânico, com cristalinidade substancialmente maior, quando comparado às membranas estudadas.

Entretanto, em análises de EXAFS os átomos de nitrogênio e oxigênio são dificilmente diferenciados, devido ao comprimento de ligação ser muito similar (Kramareva, 2004). Assim, podemos admitir que no caso da quitosana e da membrana composta, os picos podem estar relacionados tanto a ligações Cu-O quanto a ligações Cu-N.

Baseado nestes resultados é possível dizer que os átomos de cobre incorporados às membranas se ligam aos grupos amino e hidroxila (quando presentes). Além disso, não é possível afirmar que a morfologia da membrana (camada única ou composta) interfere na interação do cobre com as cadeias poliméricas.

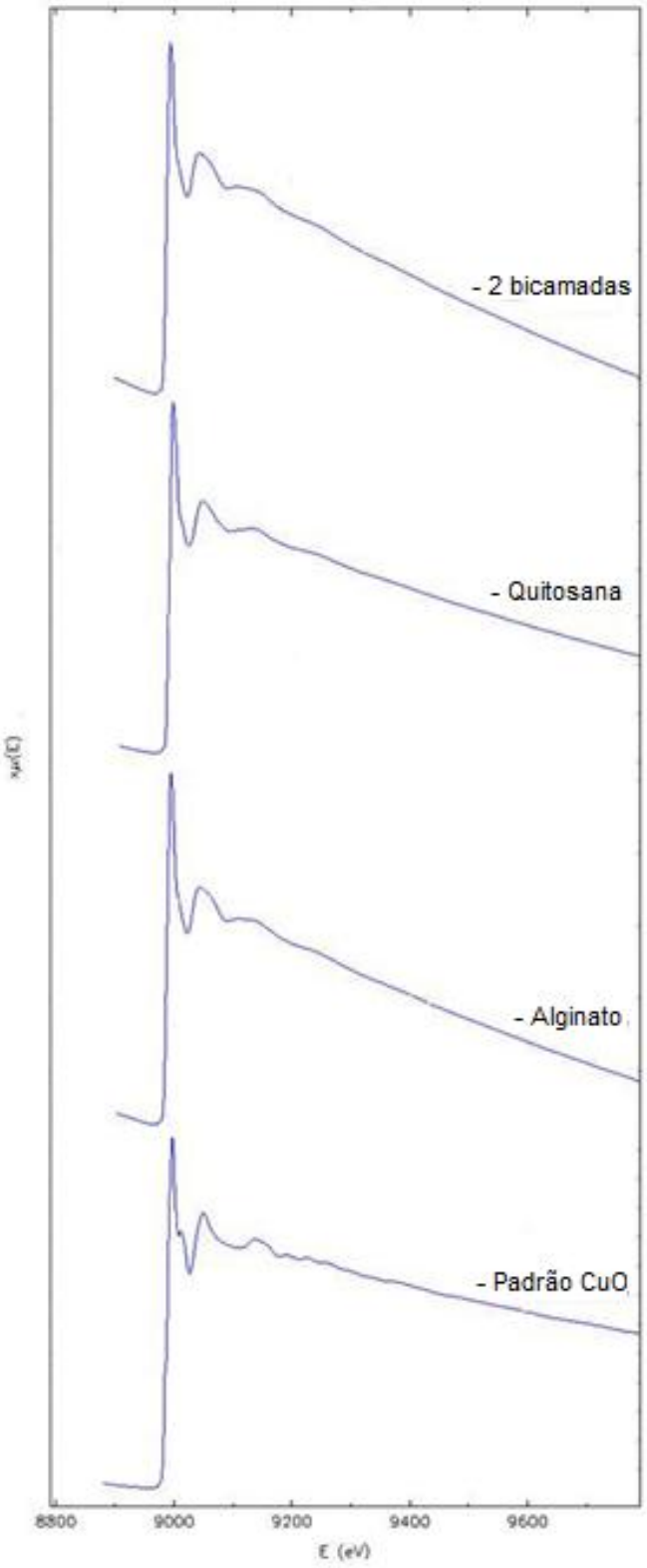

Figura 5.6.2. Espectro de absorção de EXAFS para as membranas com cobre e padrão CuO.

5.7. DIFUSÃO DE ÍONS

Com a utilização de um micrômetro marca Mitutoyo, série103, foi obtida a espessura média das membranas usadas no experimento de difusão de cloreto de sódio. (Como já descrito anteriormente, o valor de espessura é obtido através do cálculo da média aritmética das medidas realizadas em cinco pontos diferentes na mesma amostra, úmida).

Tabela 5.7.1. Espessura das membranas usadas no experimento de difusão.

Membrana	Espessura
Quitosana sem cobre	0,10 ± 0,01 mm
Quitosana com cobre	0,09 ± 0,01 mm
Alginato sem cobre	0,07 ± 0,01 mm
Alginato com cobre	0,05 ± 0,01 mm
2 bicamadas sem cobre	0,23 ± 0,01 mm
2 bicamadas com cobre	0,20 ± 0,01 mm
4 bicamadas sem cobre	0,32 ± 0,01 mm
4 bicamadas com cobre	0,37 ± 0,01 mm

Os ensaios foram realizados com solução 1M de NaCl na parte inferior da câmara de difusão, e água Milli-Q na parte superior, à temperatura ambiente. Com a membrana de alginato sem cobre não foi possível realizar o ensaio, pois a membrana não suportou a pressão osmótica. Foram realizadas várias tentativas, variando-se a espessura da membrana, mas como já descrito anteriormente, a membrana de alginato sem cobre é frágil, com baixa resistência mecânica. O comportamento da difusão nas membranas está mostrado na figura 5.7.1 e a tabela 5.7.2 apresenta o cálculo do coeficiente de difusão.

Tabela 5.7.2. Dados para o cálculo do coeficiente de difusão através das membranas (onde C_f^1 é a concentração final no compartimento 1 e C_f^2 é a concentração final no compartimento 2 da célula de difusão).

Membrana	Tempo(h)	Espessura (cm)	C_f^1	C_f^2	Coeficiente de difusão (cm^2/s)
4 bicamadas com cobre	85,6	0,032	51,48	7,02	$3,58.10^{-8}$
4 bicamadas sem cobre	117,0	0,037	30,77	27,73	$3,26.10^{-7}$
2 bicamadas com cobre	101,1	0,020	38,96	19,54	$7,62.10^{-8}$
2 bicamadas sem cobre	74,8	0,023	33,81	24,69	$1,99.10^{-7}$
Alginato com cobre	139,3	0,005	30,42	28,08	$4,03.10^{-8}$
Alginato sem cobre	ND	ND	ND	ND	ND
Quitosana com cobre	142,8	0,009	30,65	27,85	$6,69.10^{-8}$
Quitosana sem cobre	127,4	0,010	30,48	28,02	$8,68.10^{-8}$

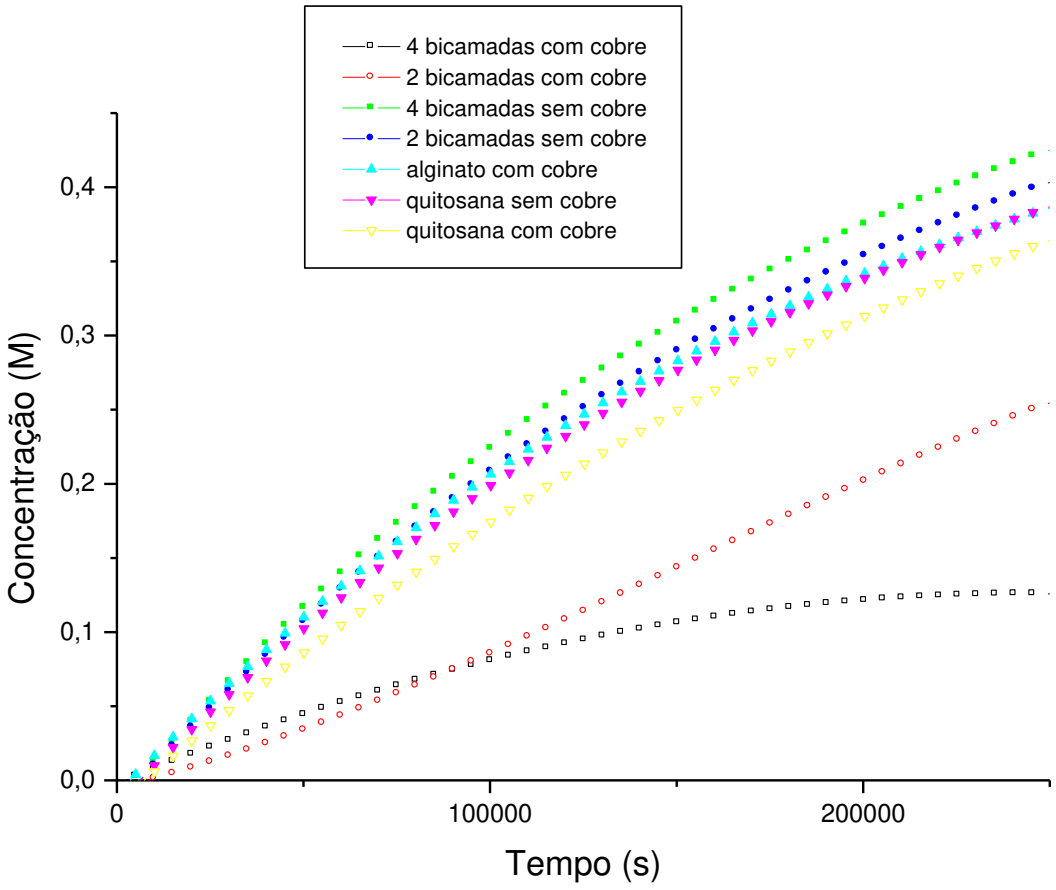

Figura 5.7.1. Gráfico de concentração de cloreto de sódio na parte superior da câmara de difusão versus tempo de difusão para as membranas.

Nota-se que as membranas com cobre apresentam coeficiente de difusão menor do que aquelas sem o metal. Isso mostra que a adição de cobre à membrana provoca uma reticulação química, acarretando em uma maior rigidez e menor mobilidade das cadeias poliméricas, e conseqüente maior dificuldade para a difusão da solução salina através da membrana.

Podemos perceber que todas as amostras apresentam uma tendência a atingir o equilíbrio entre os dois compartimentos da célula de difusão (curva assintótica), mas especificamente na membrana de duas bicamadas com cobre só

conseguimos observar esta tendência em tempos de difusão maiores que os tempos para as demais amostras (Figura 5.7.2).

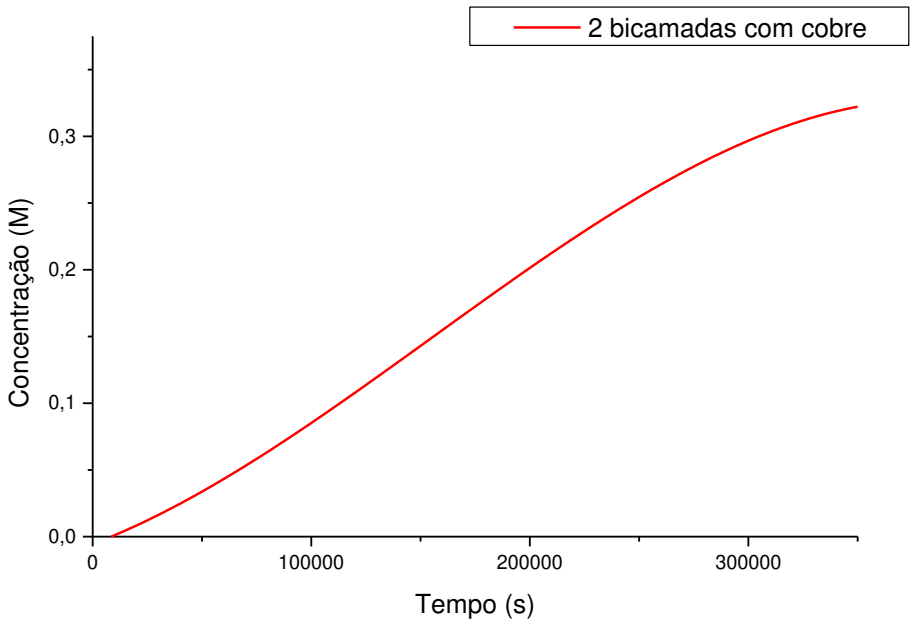

Figura 5.7.2. Gráfico concentração de cloreto de sódio na parte superior da câmara de difusão *versus* tempo de difusão para a membrana de 2 bicamadas com cobre.

Percebe-se que, para as membranas compostas com cobre (2 e 4 bicamadas), o equilíbrio entre os dois compartimentos da célula de difusão (e a conseqüente diminuição no fluxo de solução salina através da membrana) é atingido em concentrações de valor abaixo do que seria esperado, e diferente do que ocorre com as outras membranas. Como já explicado anteriormente, os átomos de cobre incorporados à membrana provocam um rearranjo das cadeias e limita o fluxo de solução através da mesma. Além disso, podemos inferir que à medida que a difusão acontece, possivelmente ocorre uma saturação da membrana, com ancoragem de íons sódio, provenientes da solução salina.

Na membrana com cobre, com menor mobilidade das cadeias, este fenômeno pode ter sua ocorrência favorecida, e por isso o fluxo de solução é

diminuído, antes que o equilíbrio de concentrações entre os dois compartimentos da célula de difusão seja atingido.

Os resultados mostraram que o coeficiente de difusão das membranas com cobre é menor do que o coeficiente das mesmas membranas sem cobre, e assim a sua permeabilidade fica comprometida, não se tornando uma estrutura eficiente para difusão de íons.

Para a difusão, várias características da membrana devem ser levadas em consideração: número de bicamadas, presença de cobre, material (quando em membranas formadas por um polímero apenas). Nota-se que a presença de cobre provoca uma reticulação das cadeias poliméricas, tornando a membrana mais rígida, com menos espaços vazios entre as cadeias, e não permitindo a mobilidade dos íons presentes na solução salina.

Na membrana sem cobre, percebemos que o coeficiente de difusão é maior, uma vez que esta tem mais espaços vazios e maior mobilidade das cadeias poliméricas, permitindo um fluxo mais livre para os íons da solução salina, até que a concentração atinja o equilíbrio entre os dois compartimentos da célula de difusão.

Nas membranas compostas, a presença de íons cobre tem um efeito muito mais pronunciado na queda da difusividade, quando comparadas com aquelas constituídas por apenas um polímero. Tal fato nos leva a crer que, além da presença de cobre, outra característica que interfere na difusividade é a interação entre as cadeias de quitosana e alginato, com a produção de novas ligações, que tende a aumentar em quantidade, com o aumento do número de camadas presentes na membrana. Na medida em que aumenta o número de camadas, maior é a diferença na difusividade entre as amostras com e sem cobre, devido ao aumento no número de ligações entre as cadeias dos dois polímeros e devido à espessura da membrana.

5.8. AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE BACTERIOSTÁTICA

Os testes de caracterização da capacidade bacteriostática das membranas produzidas foram feitos com as membranas de quitosana, alginato e composta, com e sem cobre.

Os resultados para cada uma das amostras está mostrado na tabela 5.8.1, e as fotografias referentes às análises são apresentadas no Anexo 1.

Tabela 5.8.1. Resultados dos testes de caracterização bacteriostática referentes a cada uma das amostras.

Amostra	**Resultado**	
	Teste com *Escherichia Coli*	**Teste com *Staphylococcus Aureus***
Quitosana sem cobre (disco)	Ausência de halo de inibição, crescimento intenso sobre o corpo de prova (Nível 4)	Ausência de halo de inibição, crescimento intenso sobre o corpo de prova (Nível 4)
Quitosana sem cobre (flocos)	Ausência de halo de inibição, crescimento intenso sobre o corpo de prova (Nível 4)	Ausência de halo de inibição, crescimento intenso sobre o corpo de prova (Nível 4)
Alginato sem cobre (disco)	Formação de halo discreto, sem crescimento sobre o corpo de prova (Nível 0)	Ausência de halo de inibição, crescimento fraco sobre o corpo de prova (Nível 2)
Alginato sem cobre (flocos)	Ausência de halo de inibição, crescimento fraco sobre o corpo de prova (Nível 2)	Ausência de halo de inibição, crescimento intenso sobre o corpo de prova (Nível 4)
Composta sem cobre (disco)	Ausência de halo de inibição, crescimento intenso sobre o corpo de prova (Nível 4)	Ausência de halo de inibição, crescimento intenso sobre o corpo de prova (Nível 4)

CONTINUA NA PRÓXIMA PÁGINA

Amostra	Resultado	
	Teste com *Escherichia Coli*	**Teste com *Staphylococcus Aureus***
Composta sem cobre (flocos)	Formação de halo discreto, sem crescimento sobre o corpo de prova (Nível 0)	Ausência de halo de inibição, crescimento moderado sobre o corpo de prova (Nível 3)
Quitosana com cobre (disco)	Ausência de halo de inibição, crescimento ausente sobre o corpo de prova (Nível 0)	Ausência de halo de inibição clara. Houve formação de uma zona de inibição, possivelmente pela difusão dos ativos através do ágar. Crescimento ausente sobre o corpo de prova (Nível 0)
Quitosana com cobre (flocos)	Formação de halo de inibição discreto. Houve formação de uma zona de inibição, possivelmente pela difusão dos ativos através do ágar. Crescimento ausente sobre o corpo de prova (Nível 0)	Formação de halo de inibição discreto. Houve formação de uma zona de inibição secundária, possivelmente pela difusão dos ativos através do ágar. Crescimento ausente sobre o corpo de prova (Nível 0)
Alginato com cobre (disco)	Formação de halo discreto, sem crescimento sobre o corpo de prova (Nível 0) Obs: Não foi possível mensurar o tamanho do halo pois o polímero ficou gelificado sobre o meio de cultura	Formação de halo discreto, sem crescimento sobre o corpo de prova (Nível 0)Obs: Não foi possível mensurar o tamanho do halo pois o polímero ficou gelificado sobre o meio de cultura
Alginato com cobre (flocos)	Formação de halo discreto, sem crescimento sobre o corpo de prova (Nível 0).O tamanho do halo não pode ser mensurado por ter espalhado sobre o meio, impossibilitando a visualização das bordas.	Ausência de halo de inibição clara. Houve formação de uma zona de inibição, possivelmente pela difusão dos ativos através do ágar. Crescimento ausente sobre o corpo de prova (Nível 0)
Composta com cobre (disco)	Formação de halo 3 mm, sem crescimento sobre o corpo de prova (Nível 0)	Ausência de halo de inibição clara. Houve formação de uma zona de inibição, possivelmente pela difusão dos ativos através do ágar. Crescimento ausente sobre o corpo de prova (Nível 0)
Composta com cobre (flocos)	Formação de halo de inibição discreto. Houve formação de uma zona de inibição secundária, possivelmente pela difusão dos ativos através do ágar. Crescimento ausente sobre o corpo de prova (Nível 0)	Formação de halo de inibição discreto. Houve formação de uma zona de inibição, possivelmente pela difusão dos ativos através do ágar. Crescimento ausente sobre o corpo de prova (Nível 0)

Onde:

- Nível 0 = crescimento ausente,
- Nível 1 = traços de crescimento,
- Nível 2 = crescimento fraco,
- Nível 3 = crescimento moderado, e
- Nivel 4 = crescimento intenso.

A quitosana é um polímero que tem como uma de suas principais características a capacidade antibacteriana, assim como o cobre, que desde a antiguidade é usado como material antimicrobiano. Os testes de avaliação da capacidade bacteriostática foram realizados com bactérias Gram-negativas e Gram-positivas.

Os resultados mostraram que as amostras (membranas de quitosana, alginato e composta) sem cobre não tiveram resultado satisfatório no que diz respeito a inibição de crescimento bacteriano. Os resultados variaram de crescimento intenso sobre o corpo de prova, no caso da quitosana, a ausência de crescimento, no caso do alginato. Apesar disso a membrana composta não apresentou comportamento inibitório, em se tratando da proliferação das colônias sobre o corpo de prova.

Ao se adicionar cobre às membranas, independente da morfologia das amostras (discos ou flocos, quitosana, alginato ou composta), nota-se que o crescimento é completamente inibido, e em nenhum caso há o crescimento sobre o corpo de prova. Na maioria das amostras houve também a formação de uma zona de inibição, indicando que provavelmente os ativos que impedem o crescimento da colônia de bactérias se espalharam ao redor do corpo de prova.

As análises mostraram que mais do que a composição da membrana, o fator que definiu com maior clareza se a amostra possui caráter antibacteriano é a presença de cobre; em amostras com cobre o comportamento foi semelhante, e em todas houve ausência de crescimento bacteriano. Por outro lado, nas amostras

sem cobre, não foi possível detectar um padrão estabelecido que determine o crescimento ou não de bactérias sobre o corpo de prova.

Especificamente sobre a quitosana, apesar de vários autores enfatizarem suas boas propriedades antibacterianas, em nosso trabalho não foi possível comprovar tal característica. Isso se deve à forma como a quitosana foi moldada (em forma de membranas), e principalmente devido às modificações químicas necessárias para a produção da membrana (neutralização em hidróxido de sódio). A quitosana na forma heterogênea não é um material apropriado para inibição do crescimento bacteriano, uma vez que a sua capacidade de inativação de bactérias é atribuída à sua capacidade em interagir com as paredes celulares dos microorganismos e, sob a forma de membrana, íntegra e quimicamente estável, essa interação fica comprometida (Costa Silva, 2006).

CAPÍTULO 6

DISCUSSÃO GERAL

6.1. PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DAS MEMBRANAS

Para que seja possível obter membranas constituídas por camadas organizadas e sobrepostas de polímeros, como neste trabalho, é importante que os polímeros apresentem cargas opostas em solução, já que a força motriz para a união dos mesmos é a atração eletrostática gerada pela diferença de cargas (Chen, 1997).

Além de ser fundamental para a dissolução dos polímeros em solução aquosa, o controle do pH das soluções poliméricas torna possível ajustar a densidade de cargas das cadeias de quitosana e alginato (Yuan, 2007). Em nosso trabalho, este ajuste do pH foi realizado através da dissolução da quitosana e do alginato em ácido acético e hidróxido de sódio, respectivamente. Assim, a quitosana adquiriu carga positiva, funcionando como um policátion, enquanto que o alginato agiu como um poliânion.

Outro ponto a ser ressaltado é a ordem de deposição das camadas poliméricas. Caso o alginato fosse escolhido como o polímero constituinte da primeira camada, provavelmente a constituição da membrana não seria comprometida, já que a primeira camada de polímero (em contato com a placa de Petri) tem maior volume de solução, e assim a adesão não seria prejudicada.

Os espectros obtidos por FTIR mostraram que houve interação entre as cadeias de quitosana e alginato, especificamente entre os grupos funcionais dos

dois polímeros. A adesão foi obtida de forma plena, possibilitando a obtenção de uma membrana íntegra e estável. Problemas relacionados à deficiência na interação entre os dois polímeros, como desfoliação da membrana, por exemplo, não foram observados. A organização das membranas em camadas sobrepostas dos dois polímeros pôde ser confirmada através das micrografias obtidas por MEV. Além disso, as micrografias mostraram também que a espessura das camadas de cada polímero não variou em função da quantidade de camadas já depositadas na membrana.

Também se pode observar que para cada polímero a espessura final foi diferente: as camadas de quitosana apresentaram espessura maior que as de alginato, o que pode ser atribuído à uma somatória das influências da concentração no volume usado de solução e da densidade de cada polímero. Estas duas análises mostraram que a forma como as soluções poliméricas foram produzidas contribuiu para que houvesse cargas opostas necessárias e suficientes entre os dois polímeros, para garantir interação entre as cadeias, e a conseqüente formação da membrana.

A posterior adição de cobre provocou uma espécie de reticulação das cadeias poliméricas e ligações entre os grupos funcionais, o que fica evidenciado pela diferença entre os espectros de uma mesma amostra, com e sem cobre. Apesar disso, a morfologia das membranas não foi alterada.

Através da caracterização por EDX, foi possível perceber que o cobre interage preferencialmente com o alginato, sendo encontrado em quantidade muito maior nas camadas deste polímero, quando comparado com as camadas de quitosana.

A maior afinidade do cobre pelo alginato pode ser explicado, principalmente, devido ao efeito "*egg-box*", presente neste polímero. Este é causado pela alta afinidade do alginato por íons metálicos divalentes, onde as cadeias do polímero mudam a sua conformação, passando de cadeias lineares para um arranjo tridimensional, após a interação com o íon divalente, formando

estruturas cada vez mais complexas e ampliando a possibilidade de mais íons metálicos interagirem com o polímero (Phillips, 2000).

Tais resultados nos mostram que podemos, por exemplo, utilizar estas membranas para adsorção seletiva de íons, onde apenas um dos polímeros constituintes do sistema irá interagir com o íon, e o outro polímero pode ser usado como elemento estrutural. Além disso, pode-se controlar o volume de solução para cada camada, uma membrana com camadas de espessuras iguais, uniformes ao longo da seção transversal da membrana, ou de acordo com a finalidade para a qual a membrana será utilizada.

Explorando-se esta característica encontrada na membrana multicamada, podemos sugerir sistemas onde o metal será adsorvido em apenas um dos polímeros. Sendo ambos os polímeros biodegradáveis, este sistema poderia ser utilizado em uma situação onde se deseja uma liberação controlada do metal.

6.2. ANÁLISE ESTRUTURAL

A incorporação de íons cobre às membranas nos leva a investigar como ocorre a interação do metal com as cadeias poliméricas, e qual o efeito resultante, sob o ponto de vista estrutural e de cristalinidade. Tais informações podem ser obtidas através das caracterizações por DRX e EXAFS.

Polímeros são substâncias com caráter predominantemente amorfo, sem a presença de picos cristalinos bem definidos. Por outro lado, há a presença de halos, que evidenciam um sistema com organização intermediária (Qi, 2004). Nas membranas estudadas, a inclusão de íons cobre provocou mudanças na estrutura das cadeias poliméricas, o que pode ser comprovado pelos difratogramas gerados pela análise de DRX.

As membranas sem cobre apresentam halos característicos dos polímeros constituintes, tanto em posição quanto em intensidade. A adição de cobre provoca um novo rearranjo das cadeias, de forma a se ajustarem à inclusão do íon.

Podemos notar, nos difratogramas, que os picos característicos dos polímeros continuam presentes, mas as suas intensidades se tornam menores.

Do cálculo de distâncias interplanares podemos também perceber que a adição de cobre faz com que os picos referentes às menores distâncias são os que mais perdem intensidade, chegando a desaparecer em algumas amostras. Isso mostra que o íon cobre, por ser grande em relação aos átomos constituintes das cadeias poliméricas, provoca grande desorganização ao seu redor, e dessa forma, as cadeias deixam de estar alinhadas, perdendo o caráter cristalino. Para maiores distâncias interplanares, este efeito também é notado, mas com menor extensão.

A fim de complementar a análise estrutural das membranas com cobre, a caracterização por EXAFS nos permite dizer como o íon cobre está ligado à cadeia polimérica, ou seja, em qual átomo da cadeia do polímero o íon se liga.

Analisando-se os resultados obtidos, podemos inferir que os íons cobre estão preferencialmente ligados aos grupos amino (na quitosana) e hidroxila (no alginato), com distâncias de ligação em torno de 2 Å. O fato de termos distâncias de ligação relacionadas às duas esferas de coordenação distintas, não significa necessariamente que temos uma estrutura organizada em cela unitária, com distâncias de ligação regularmente distribuídas. Dos espectros de EXAFS podemos concluir que as principais ligações entre o cobre e os polímeros tem distância em torno de 2 Å, variando entre os valores encontrados na função de distribuição radial.

Comparando os espectros de EXAFS das membranas obtidas com o padrão de Óxido de Cobre, pode-se perceber que assim como no padrão, os átomos de cobre se ligam preferencialmente aos átomos de oxigênio presentes nas cadeias poliméricas. No entanto, em análises de EXAFS, ligações envolvendo átomos de oxigênio e nitrogênio se confundem. No caso das membranas de quitosana, que possuem átomos de nitrogênio em seus grupos funcionais, podemos admitir que os átomos de cobre se ligam a estes átomos de nitrogênio presentes na quitosana.

6.3. APLICABILIDADE

A principal vantagem da utilização de membranas multicamadas para incorporação de cobre é a possibilidade de modulação da concentração de cobre em cada uma das camadas, através da escolha dos polímeros apropriados. Neste trabalho, quitosana e alginato possuem diferentes graus de afinidade com este metal (apesar de os dois polímeros terem boa capacidade de interação com metais), e, por isso, a concentração de cobre em cada uma das camadas é diferente.

Para uma futura aplicação de sistemas multicamadas é possível tirar proveito desta característica, para criar um ambiente onde ocorra liberação controlada dos íons cobre sobre o substrato. Como quitosana e alginato são polímeros biodegradáveis, na medida em que as camadas de alginato vão sendo degradadas, ocorre a liberação do cobre (mais presente neste polímero), inibindo o crescimento da colônia de bactérias. Outra liberação de cobre em grande quantidade só ocorrerá após o final da degradação da camada de quitosana, quando a próxima camada de alginato for degradada. A liberação controlada é mais vantajosa que a liberação contínua, pois é mais eficiente, com ação e desempenho otimizados, e evita efeitos colaterais indesejados, reduzindo a toxicidade (Uhrich, 1999).

Em sistemas onde a liberação controlada não é desejada, pode-se utilizar a membrana multicamada como um sistema de proteção contra crescimento bacteriano; uma vez que não há proliferação de bactérias sobre a membrana, esta pode, provavelmente, ser empregada para revestir superfícies que necessitam apresentar propriedade bacteriostática.

Estudos em nosso laboratório (Vieira, 2008), foi demonstrado que o cobre, uma vez adsorvido pela quitosana, dificilmente é dessorvido por eluentes comuns, o que garantiria que a liberação de cobre somente ocorre em paralelo com a eventual degradação da membrana. Entretanto, enquanto não é liberado, o cobre

é capaz de cumprir bem o papel de agente bacteriostático imobilizado em fase sólida, com vantagens evidentes sobre os agentes utilizados hoje, comercialmente, como os conhecidos sais de prata.

Como já citado anteriormente, o método de obtenção de membranas multicamadas estudado neste trabalho permite que uma considerável quantidade de substâncias diferentes sejam utilizadas para a produção destas estruturas. Basicamente, o único pré-requisito é que os componentes possuam cargas opostas em suas moléculas, e assim teremos um cátion e um ânion.

Além disso, há ainda a possibilidade de se incorporar outras espécies químicas na membrana, como por exemplo, um íon metálico. Isto também permite a utilização em situações onde a presença de íons metálicos traga benefícios (evitando proliferação de bactérias em regiões do corpo de pacientes em pós operatório, por exemplo (Lee, 2005)).

Para tratamento de feridas na pele (Cárdenas, 2008), a membrana multicamadas pode ser de grande utilidade, uma vez que com o devido tratamento prévio (esterilização e umidificação), ela pode contribuir para uma cicatrização mais rápida, além de atenuar estas cicatrizes. Este efeito pode ainda ser potencializado, com a membrana contendo íons metálicos, o que contribuiria para a assepsia do ferimento, evitando inflamações enquanto a cicatrização ocorre.

Outra interessante aplicação, possível para membranas multicamadas, em especial, é a imobilização de anticorpos, favorecida pela forma como a membrana é construída. Neste caso, ao invés de quitosana e alginato com cobre, teríamos uma membrana com os mesmos polímeros, mas contendo a substância tal que se deseja armazenar. A estrutura da membrana contribui tanto para uma melhor “ancoragem” do anticorpo na cadeia polimérica, quanto para a liberação controlada do mesmo, aumentando a vida útil do sistema (Yuan, 2007).

Especialmente no caso de tratamento de água, as membranas multicamadas mostram-se boas alternativas, uma vez que foi possível observar a afinidade do cobre pelos polímeros constituintes da membrana, em especial o alginato. A utilização desta membrana com cobre seria uma alternativa aos

processos empregados atualmente, como, por exemplo, os sais de prata, que quando comparados ao cobre, são mais tóxicos e, portanto, prejudiciais à saúde humana. Além disso, a prata é um metal encontrado em menor quantidade na natureza, e por isso a aplicação de substâncias derivadas deste metal se torna menos vantajosa, do ponto de vista financeiro.

As membranas multicamadas estudadas neste trabalho apresentam, após incorporação de cobre, propriedades antibacterianas que as tornam interessantes como revestimentos e para tratamentos onde tal propriedade é importante.

CAPÍTULO 7

CONCLUSÕES

Deste trabalho podemos concluir que:

- A produção de membranas multicamadas foi bem sucedida, validando a adaptação do método *"layer-by-layer"*. Este método permite não somente a obtenção de membranas de quitosana e alginato, mas sim a combinação de uma enorme gama de polímeros, proteínas, etc., adequadas a uma função específica, com as propriedades desejáveis;

- A incorporação de cobre se dá de forma eficiente e distinta na quitosana e no alginato; além disso, a estrutura cristalina das membranas é modificada após a adsorção dos íons cobre, tornando-as mais amorfas e desorganizadas, como mostrado pelo DRX. A caracterização química também mostra um rearranjo das interações entre as cadeias, após a inserção do cobre, que provoca uma reticulação;

- Através da caracterização por EXAFS podemos afirmar que os átomos de cobre se ligam preferencialmente aos grupos funcionais de quitosana e alginato, mais precisamente aos átomos de nitrogênio e oxigênio presentes em cada grupo funcional, respectivamente. Tal identificação foi possível através de comparação com o espectro do padrão óxido de cobre; por outro lado, não é possível fazer uma análise quantitativa a respeito destas ligações (grupo onde o cobre faz mais interações, por exemplo);

- A difusão de íons através da membrana é prejudicada pela adição de íons cobre, que somada ao número de camadas da membrana, interfere de forma significativa na difusividade, diminuindo-a;

- Mais importante do que a composição da membrana, a adsorção ou não de cobre é fator que define a capacidade bacteriostática da membrana e garante aplicações diversas onde tal característica é necessária.

NOTA: O método de obtenção de membranas multicamadas proposto e estudado nesta dissertação está em processo de patenteamento.

CAPÍTULO 8

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Estudar a redução dos íons cobre incorporados à membrana composta e seu efeito;
- Caracterizações mecânicas, de forma a avaliar o aumento da resistência após a incorporação de cobre;
- Medidas de solubilidade de quitosana e alginato em solução salina e em água;
- Desenvolvimento de um novo método de secagem das membranas, em um ambiente controlado, com circulação de ar e maior homogeneidade de temperatura;
- Medidas de quantidade de cobre incorporada à membrana;
- Produção de membranas com maior número de bicamadas;
- Estudo da variação de espessura das camadas poliméricas, à medida em que se aumenta o número de bicamadas;
- Estudos de resistência à lixiviação: sabe-se de trabalhos anteriores, que a quitosana possui notável resistência à lixiviação, e para a membrana multicamada, não se sabe se esta característica está presente.

CAPÍTULO 9

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Beppu, M. M. Estudo da calcificação "in vitro" de quitosana. Tese de Doutorado, UNICAMP, Faculdade de Engenharia Química, 1998.
- Beppu, M. M., Arruda, E. J., Vieira, R. S., Santos, N. N. (2004). Adsorption of Cu(II) on porous chitosan membranes functionalized with histidine. Journal of Membrane Science, 240 (2004) 227-235.
- Billmeyer, F. W. Textbook of Polymer Science. Cingapura: John Wiley and Sons, 1984.
- Block, S. S. Disinfection, Sterilization and Preservation, Lippincott Williams and Wilkins, 5th Ed, 2001.
- Brownlee, I. A., Allen, A. Pearson, J. P., Dettmar, P. W., Havler, M. E., Atherton, M. R., Onsoyen, E. Alginate as a Source for Dietary Fiber. Critical Reviews of Food Science and Nutrition , 45 (2005) 497-510.
- Cárdenas, G. A. Anaya, P., von Plessing, C., Rojas, C., Sepulveda, J. Chitosan Composite Films. Biomedical Applications. Journal of Materials Science: Materials in Medicine , 19 (2008) 2397-2405.
- Charoenthai, N. K., Kleinebudde, P., Puttipipatkhachorn, S. Use of Chitosan-Alginate as Alternative Pelletization Aid to Microcrystalline Cellulose in Extrusion/Spheronization. Journal of Pharmaceutical Sciences , 96 (2007) 2469-2484.
- Chen, W. M., McCarthy, T. Layer-by-layer Deposition: a Tool for Polymer Surface Modification. Macromolecules , 30 (1997) 78-86.

- Chu, K. H. Removal of Copper from Aqueous Solution by Chitosan in Prawn Shell: Adsorption Equilibrium and Kinetics. Journal of Hazardous Materials , B90 (2002) 77-95.
- Costa Silva, H. S. R., dos Santos, K. S. C. R., Ferreira, E. I. Quitosana: Derivados Hidrossolúveis, Aplicações Farmacêuticas e Avanços. Química Nova, 29 (2006) 776-785.
- Decher, G. S., Schlenoff, J. B. Multilayer Thin Films: Sequential Assembly of Nanocomposite Materials. Weinheim: Wiley-VCH, 2002.
- Dimitriu, S. Polysaccharides: Structural Diversity and Functional Versatility. New York: Marcel Dekker, 2005.
- Joly, S.; Kane, R.; Radzilowski, L.; Wang, T.; Wu, A.; Cohen, R. E.; Thomas, E. L.; Rubner, M. F. Multilayer Nanoreactors for Metallic and Semiconducting Particles. Langmuir 16 (2000) 1354-1359.
- Kaminski, W. T., Tomczak, E., Jaros, K. Interactions of Metal Ions Sorbed on Chitosan Beads. Desalination , 218 (2008) 281-286.
- Kim, S. G., Lee. K. S., Lee, K. H. Pervaporation Separation of Sodium Alginate/Chitosan Polyelectrolyte Complex Composite Membranes for the Separation of Water/Alcohol Mixtures: Characterization of the Permeation Behaviour with Molecular Modeling Techniques. Journal of Applied Polymer Science , 103 (2007) 2634-2641.
- Koenig, J. L., Kormos, D. Quantitative Infrared Spectroscopy Measurements of Mixtures Without External Calibration. Applied Spectroscopy , 33 (1979) 349-350.
- Kramareva, N. V., Stakheev, A. Y., Tkachenko, O. P., Klementiev, K. V., Grunert, W., Finashina, E. D., Kustov, L. M. Heterogenized Palladium Chitosan Complexes as Potential Catalysts in Oxidation Reactions: Study of the Structure. Journal of Molecular Catalysis A: Chemical , 209 (2004) 97-106.

- Kroschwittz, J. I. Encyclopedia of Polymer Science and Engineering . New York: John Wiley and Sons, 1985.
- Kumar, M. N. A Review of Chitin and Chitosan Applications. Reactive and Functional Polymers , 46 (2000) 1-27.
- Kurita, K. Chitin and Chitosan: Functional Biopolymers from Marine Crustaceans. Marine Biotechnology , 8 (2006) 203-226.
- Lawrie, G., Keen, I., Drew, B., Chandler-Temple, A., Rintoul, L., Fredericks, P., Grondahl, L. Interactions Between Alginate and Chitosan Biopolymers Using FTIR and XPS . Biomacromolecules 8 (2007) 2533-2541.
- Lee, D. C., Cohen, R. E., Rubner, M. F. Antibacterial Properties of Ag Nanoparticle Loaded Multilayers and Formation of Magnetically Directed Antibacterial Microparticles. Langmuir , 21 (2005) 9651-9659.
- Liu, Y. L., Yu, C. H., Lee, K. R., Lai, J. Y. Chitosan/Poly(tetrafluoroethylene) Composite Membranes Using in Pervaporation Dehydration Processes. Journal of Membrane Science , 287 (2007) 230-236.
- Mazali, I. O. EXAFS Como Técnica da Caracterização Estrutural de Materiais: Fundamentos Teóricos e Aplicações. Seminário de Doutorado, Instituto de Química, UNICAMP, 1998.
- Mladenovska, K., Cruaud, O., Richomme, P., Belamie, E., Raicki, R. S., Venier-Julienne, M. C., Popovski, E., Benoit, J. P., Goracinova, K. 5-ASA Loaded Chitosan-Ca-Alginate Micorparticles: Preparation and Physicochemical Characterization. International Journal of Pharmaceutics , 345 (2007) 59-69.
- Moon, G. Y., Pal, R., Huang, R. Y. M. Novel two-ply Composite Membranes of Chitosan and Sodium Alginate for the Pervaporation Dehydration of Isopropanol and Ethanol. Journal of Membrane Science , 156 (1999) 17-27.
- Mulder, M. Basic Principles of Membrane Technology. Boston: Kluwer Academic Publishers, 1991.

- Nosal, W. H., Thompson, D. W., Yan, L., Sarkar, S., Subramanian, A., Woollam, J. A. Infrared Optical Properties and AFM of Spin-Cast Chitosan Films Chemically Modified With 1,2 Epoxy-3-phenoxy-propane. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces , 46 (2005) 26-31.
- Phillips, G. O. Handbook of Hydrocolloids. Boca Raton: CRC Press, 2000.
- PROCOBRE. (2007). *PROCOBRE*. Acesso em 20/10/2007, disponível em PROCOBRE: http://www.procobre.org/pr/pdf/
- Qi, L., Xu, Z., Jiang, X., Hu, C., Zou, X. Preparation and Antibacterial Activity of Chitosan Nanoparticles. Carbohydrate Research , 339 (2004) 2693-2700.
- Qin, Y. Alginate Fibers: an overview of the production processes and applications in wound management. Polymer International , 57 (2008) 171-180.
- Ramesh Babu, V. S., Sairam, M., Hosamani, K. M., Aminabhavi, T. M. Preparation of sodium alginate-methylcellulose blend microshperes for controlled release of nifedipine. Carbohydrate Polymers , 69 (2007) 241-250.
- Rinaudo, M. Main Properties and Current Applications of Some Polysaccharides as Biomaterials. Polymer International , 57 (2008) 397-430.
- Shahidi, F. A., Arachchi, J. K. V., Jeon, Y. J. Food Applications of Chitin ans Chitosans. Trends in Food Science & Technology , 10 (1999) 37-51.
- Simsek-Ege, F. A., Bond, G. M., Stringer, J. Polyelectrolyte Complex Formation Between Alginate and Chitosan as a Function of pH. Journal of Applied Polymer Science , 88 (2003) 346-351.
- Srinivasa, P. C., Tharanathan, R. N. Chitin/Chitosan - Safe, Ecofriendly Packaging Materials with Multiple Potential Uses. Food Review International, 23 (2007) 53-72.

- Vieira, R. S. Adsorção competitiva do íons cobre e mercúrio em membranas de quitosana natural e reticulada. Tese de Doutorado, UNICAMP, Faculdade de Engenharia Química, 2008.
- Wan, Y. C., Creber, K. A. M., Peppley, B., Tam Bui, V. Chitosan-based Electrolyte Membranes II: Mechanical Properties and Ionic Conductivity. Journal of Membrane Science, 284 (2006) 331-338.
- Wong, Y. C., Szeto, Y. S., Cheung, W. H., McKay, G. Effect of Temperature, Particle Size and Percentage Deacetylation on the Adsorption of Acid Dyes on Chitosan. Adsorption ,14 (2008) 11-20.
- Xu, Y. X., Kim, K. M., Hanna, M. A., Nag, D. Chitosan-starch Composite Film: Preparation and Characterization. Industrial Crops and Products, 2004.
- Yuan, W., Dong. H., Li, C. M., Cui, X., Yu, L., Lu, Z., Zhou, Q. pH-Controlled Construction of Chitosan/Alginate Multilayer Film: Characterization and Application for Antibody Immobilization. Langmuir , 23 (2007) 13046-13052.

ANEXO 1 - Fotografias dos resultados dos testes de avaliação bacteriostática.

Figura 9.1. Amostra 1: Quitosana sem cobre em discos (teste com E. coli).

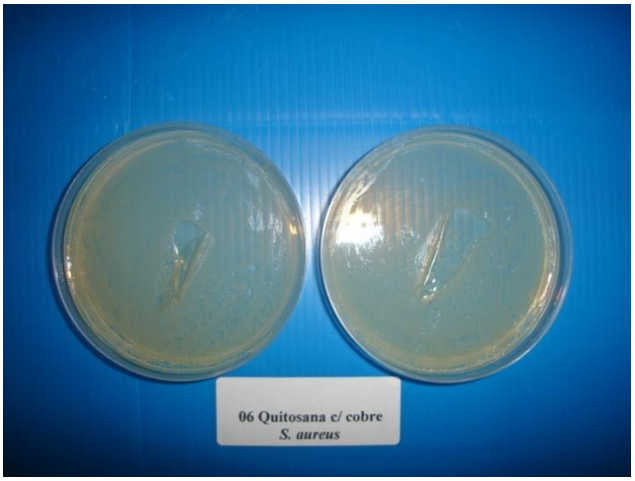

Figura 9.2. Amostra 1: Quitosana sem cobre em discos (teste com S. aureus).

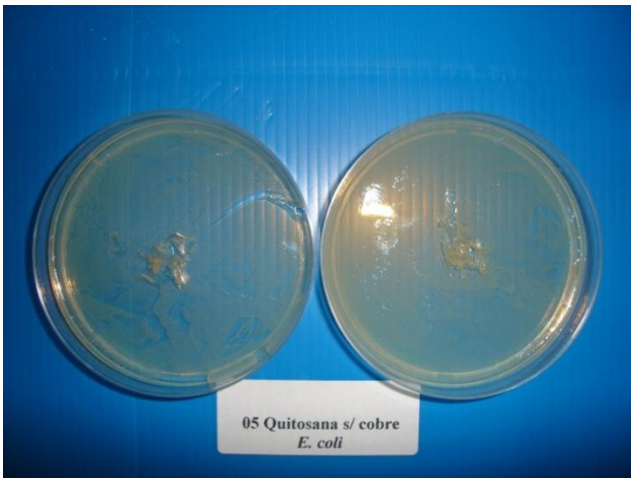

Figura 9.3. Amostra 2: Quitosana sem cobre em flocos (teste com E. coli).

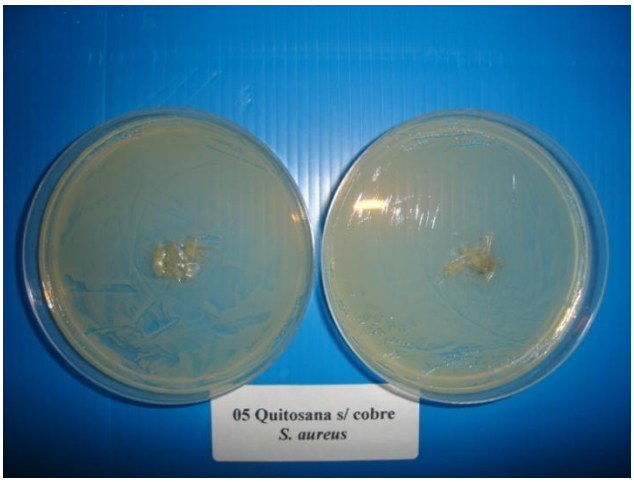

Figura 9.4. Amostra 2: Quitosana sem cobre em flocos (teste com S. aureus).

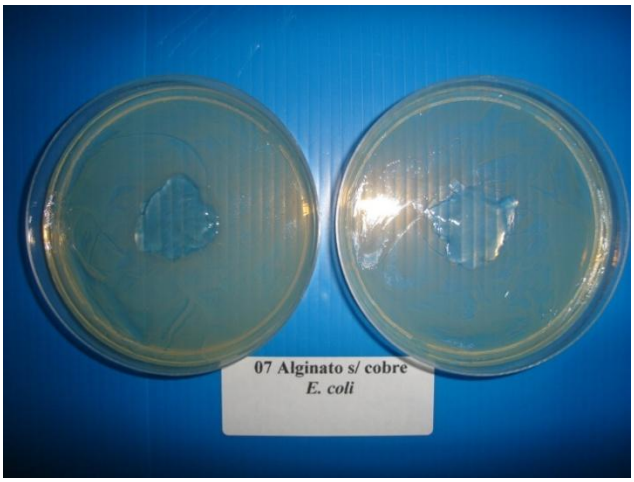

Figura 9.5. Amostra 3: Alginato sem cobre em discos (teste com E. coli).

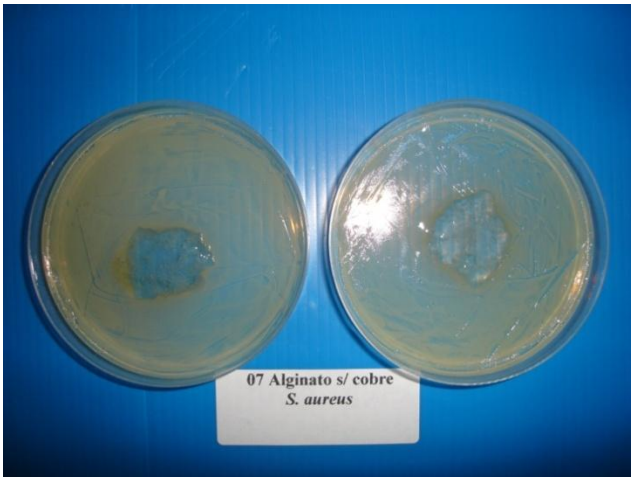

Figura 9.6. Amostra 3: Alginato sem cobre em discos (teste com S. aureus).

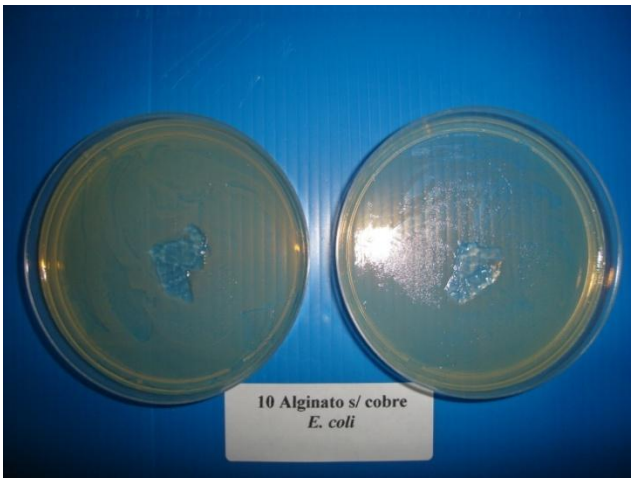

Figura 9.7. Amostra 4: Alginato sem cobre em flocos (teste com E. coli).

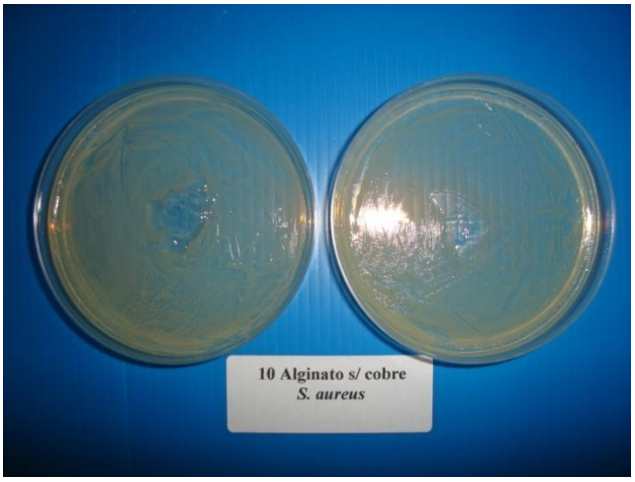

Figura 9.8. Amostra 4: Alginato sem cobre em flocos (teste com S. aureus).

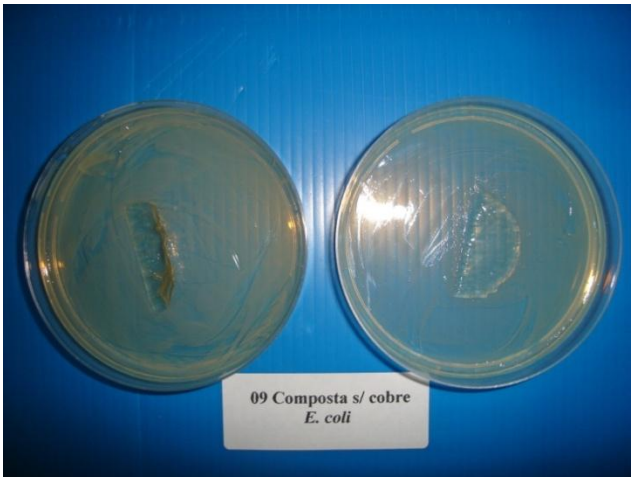

Figura 9.9. Amostra 5: Composta sem cobre em discos (teste com E. coli).

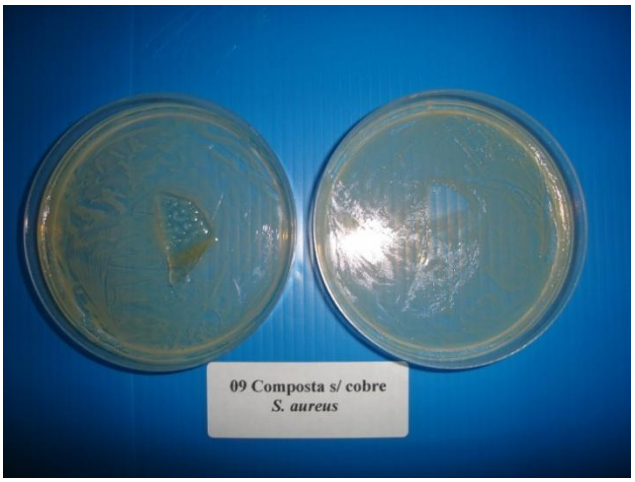

Figura 9.10. Amostra 5: Composta sem cobre em discos (teste com S. aureus).

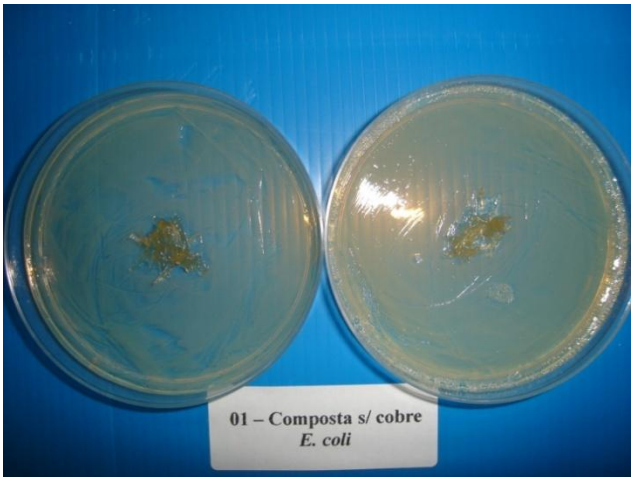

Figura 9.11. Amostra 6: Composta sem cobre em flocos (teste com E. coli).

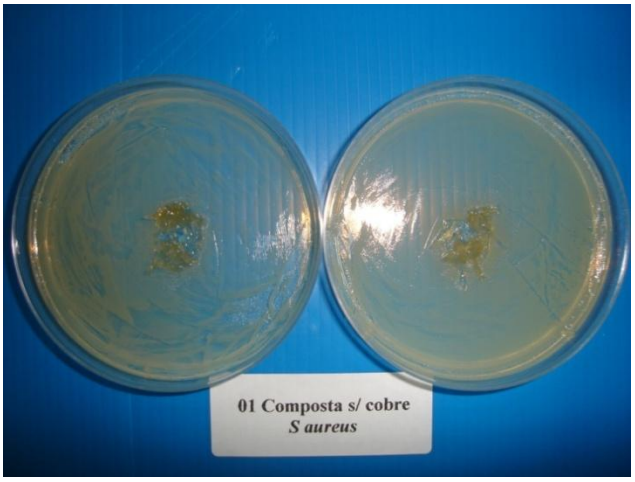

Figura 9.12. Amostra 6: Composta sem cobre em flocos (teste com S. aureus).

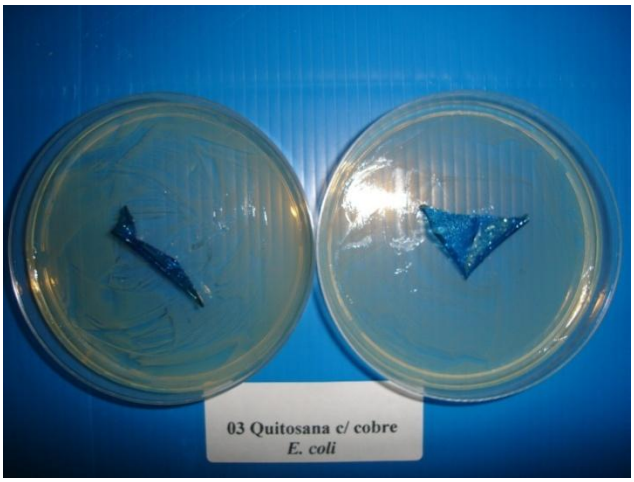

Figura 9.13. Amostra 7: Quitosana com cobre em discos (teste com E. coli).

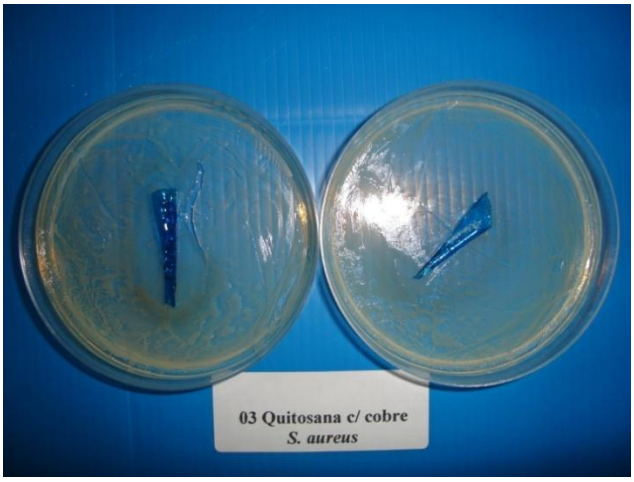

Figura 9.14. Amostra 7: Quitosana com cobre em discos (teste com S. aureus).

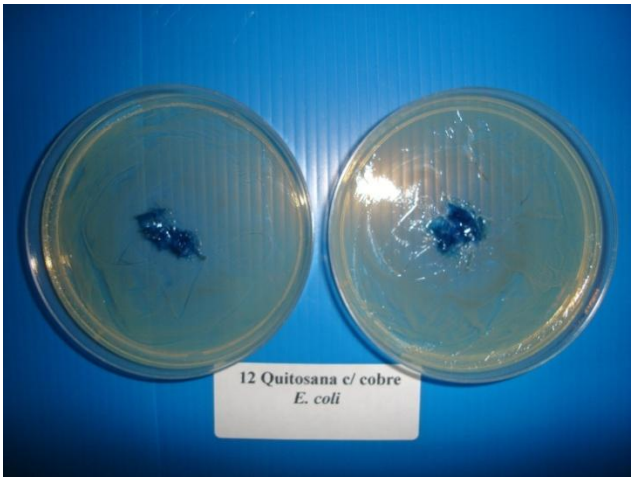

Figura 9.15. Amostra 8: Quitosana com cobre em flocos (teste com E. coli).

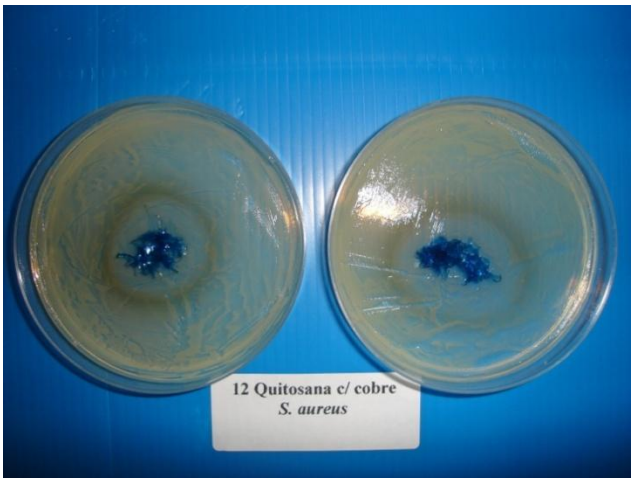

Figura 9.16. Amostra 8: Quitosana com cobre em flocos (teste com S. aureus).

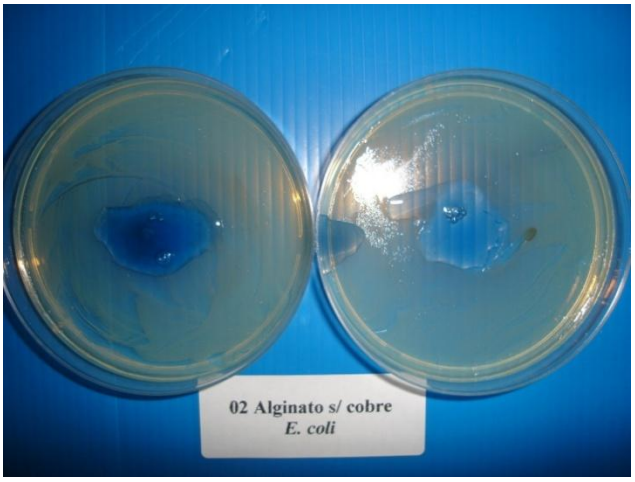

Figura 9.17. Amostra 9: Alginato com cobre em discos (teste com E. coli).

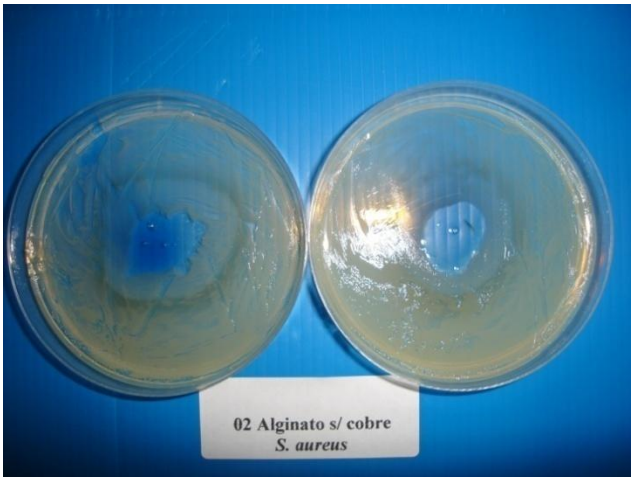

Figura 9.18. Amostra 9: Alginato com cobre em discos (teste com S. aureus).

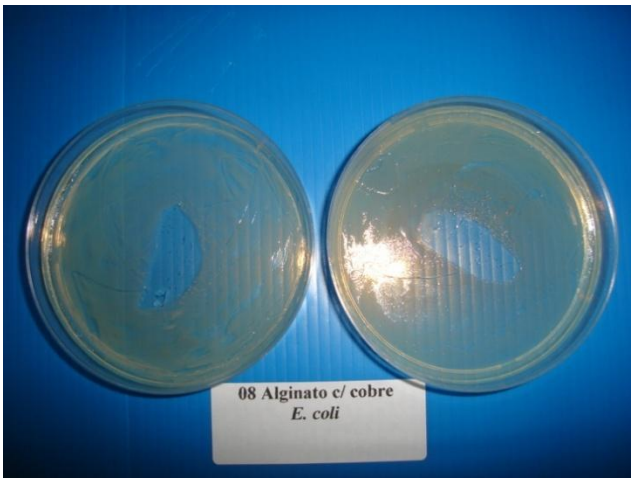

Figura 9.19. Amostra 10: Alginato com cobre em flocos (teste com E. coli).

Figura 9.20. Amostra 10: Alginato com cobre em flocos (teste com S. aureus).

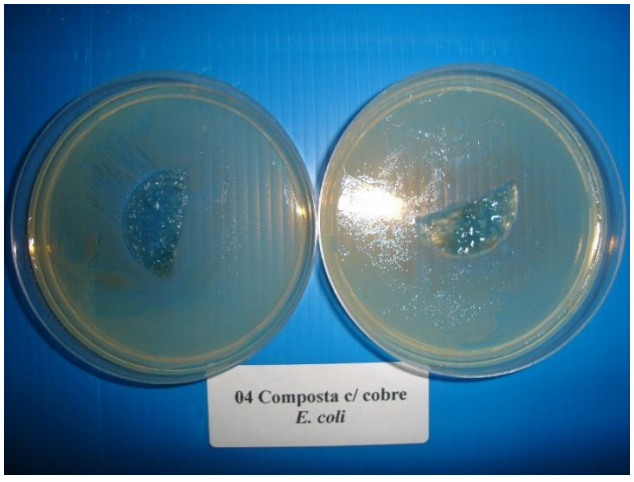

Figura 9.21. Amostra 11: Composta com cobre em discos (teste com E. coli).

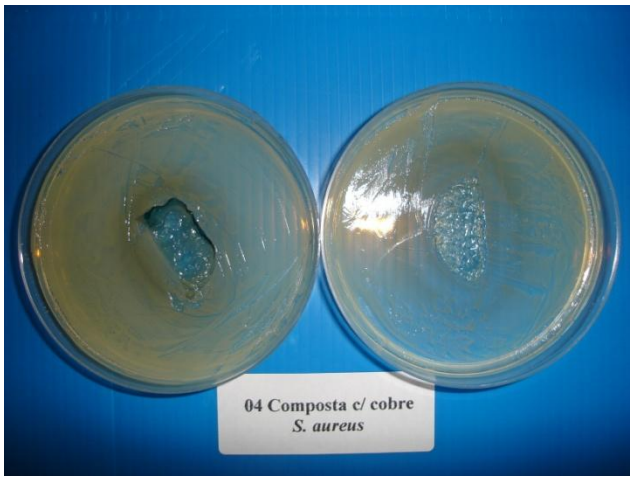

Figura 9.22. Amostra 11: Composta com cobre em discos (teste com S. aureus).

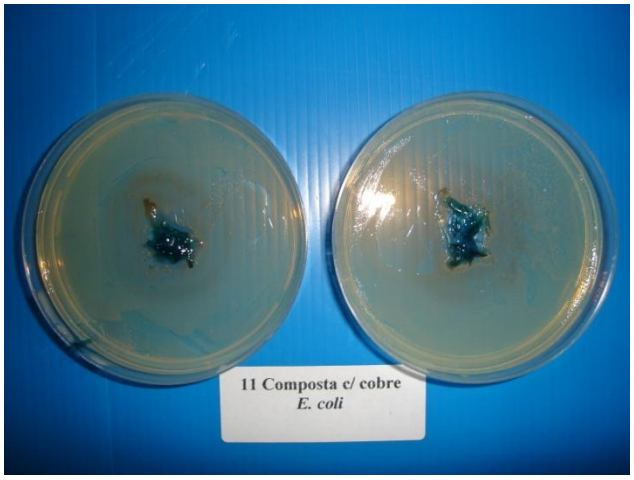

Figura 9.23. Amostra 12: Composta com cobre em flocos (teste com E. coli).

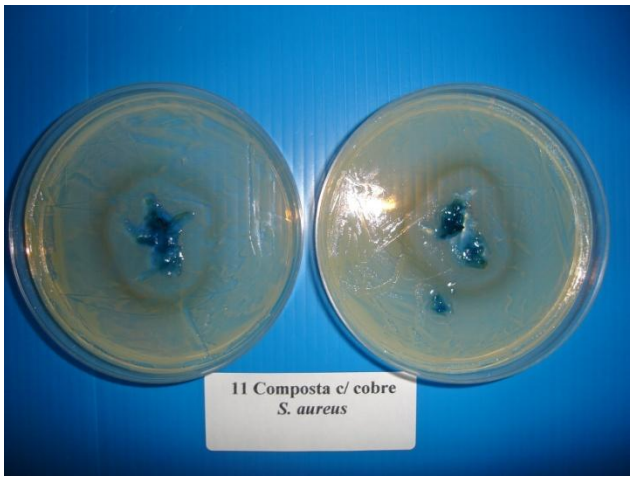

Figura 9.24. Amostra 12: Composta com cobre em flocos (teste com S. aureus).